

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	DNA二重鎖切断修復に関わるXRCC4/DNA ligase IV複合体の制御機構に関する研究
Title(English)	
著者(和文)	福地 命
Author(English)	Mikoto Fukuchi
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第9922号, 授与年月日:2015年5月31日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松本 義久,小栗 慶之,河野 俊之,松藤 成弘,岩崎 博史
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第9922号, Conferred date:2015/5/31, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

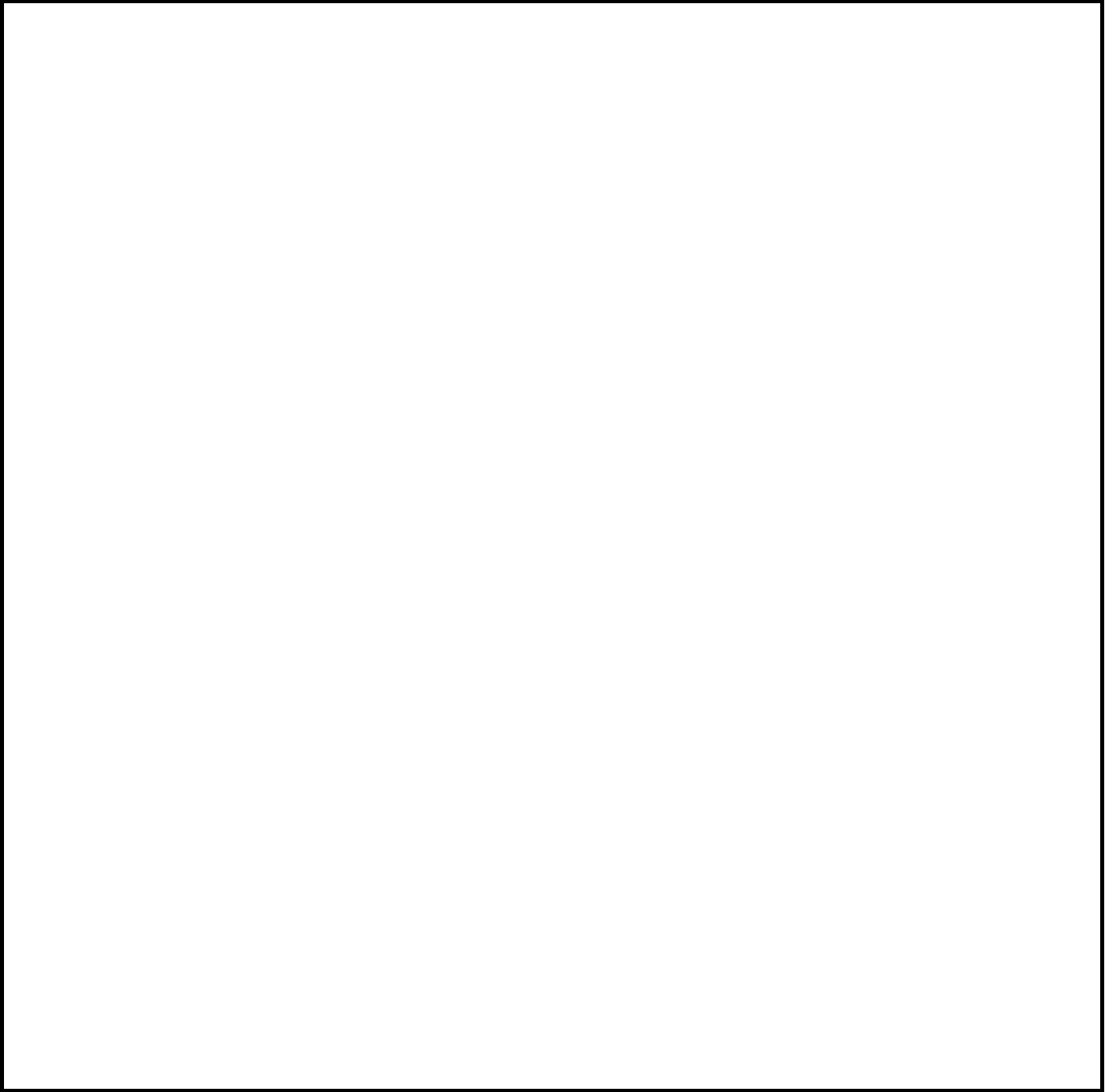
論 文 要 旨 (和文2000字程度)

(Summary)

報告番号	乙 第	号	氏 名	福地 命
(要 旨) 放射線によって生じるさまざまなDNA損傷の中で、DNA二重鎖切断(DSB)は最も重篤なものであり、その生物作用に最も密接に関わると考えられている。真核生物において、DSB の 修 復 は 主 と し て 二 つ の 機 構 で 行 わ れ る 。 一 つ は 相 同 組 換 え (Homologous recombination, HR)、もう一つは非相同末端結合 (Non-homologous end-joining, NHEJ)である。NHEJはHRに比べて、誤りを起こしやすいと考えられるが、HRがS期後半からG2期に限定されるのに対し、NHEJはG0期、G1期およびS期の前半でも機能する。ヒトはじめ哺乳類細胞では、DNAの中でタンパク質をコードしている領域は少なく、多少の塩基の欠失や挿入は許容される場合が多いこと、また、大部分の細胞がG0期あるいはG1期にあることから、NHEJの重要性が高いと考えられる。NHEJは抗体やT細胞受容体の多様性を生み出すV(D)J組換えにも関与している。NHEJにおいては、Ku70、Ku86、DNA-PKcs、XRCC4、DNA ligase IV、XLFが中心的な役割を担うと考えられている。この中で、DNA ligase IVはDSBを最終的に結合する酵素であり、XRCC4はDNA ligase IVの機能を調節すると考えられている。XRCC4はDNA-PKおよびカゼインキナーゼIIによってリン酸化調節を受けることが報告されている。本研究は、XRCC4とDNA ligase IVの新たな調節機構を見出すことを目的として行った。 まず、アセチル化、SUMO化、ユビキチン化修飾部位となりうるリジンに着目し、ヒトXRCC4とトリXRCC4の間で保存されているリジンをアルギニンに置換した変異体のシリーズを作製した。変異体cDNAはpEGFP-C1ベクターに挿入したヒトXRCC4遺伝子を鋳型として、PCRによって作製した。これらの変異体cDNAの塩基配列を確認した後、XRCC4遺伝子を欠損するマウス細胞M10に導入し、安定発現株を樹立した。コロニー形成法によってγ線照射後の細胞生存率を測定した結果、正常XRCC4を発現させた細胞 (M10-GFP-XRCC4^{WT}) に比べて、187番目のリジンをアルギニンに置換した変異体を発現させた細胞 (M10-GFP-XRCC4^{K187R}) および271番目のリジンをアルギニンに置換した変異体を発現させた細胞 (M10-GFP-XRCC4^{K271R}) が著しい放射線感受性を示した。このことから、XRCC4^{K187R}およびXRCC4^{K271R}はDNA修復機能が低下していると考えられた。 K271は核移行シグナル部位に位置する。蛍光顕微鏡観察の結果、GFP-XRCC4^{K271R}細胞質への局在が認められた。このことから、GFP-XRCC4^{K271R}のDSB修復機能低下は、核移行が正常に行われなためであると結論した。 一方、K187はDNA ligase IVとの結合領域に位置する。そこで、免疫沈降法を行った結				

果、Ligase IVとの相互作用が失われていることが分かった。さらに、 γ H2AXに対する抗体を用いた免疫蛍光染色、コメット電気泳動法による検討の結果、M10-GFP-XRCC4^{K187R}はM10-GFP-XRCC4^{WT}に比べてDNA二重鎖切断修復能力が低下していることが分かった。さらに、DNA損傷に対するXRCC4の時空間的な挙動を観察した。具体的には、共焦点顕微鏡のマイクロレーザーを用いて局所的なDNA損傷を起こし、GFP-XRCC4^{WT}とGFP-XRCC4^{K187R}のDNA損傷への集積を比較した。いずれのXRCC4もDNA損傷部位への集積が認められた。また、界面活性化剤を用いた細胞分画法によっても、XRCC4^{K187R}がXRCC4^{WT}と同様にクロマチンに結合することが分かった。このことから、XRCC4^{K187R}は、DSB部位へ動員されるものの、DNA ligase IVとの結合に異常があるためにDSB修復機能が低下していると結論した。遺伝子データベースを調べたところ、K187に相当するリジンは酵母からヒトに至る真核生物で広く保存されており、現時点においてアルギニンになっているものはなかった。以上のことから、K187はXRCC4とDNA ligase IVとの複合体を形成、維持するために、真核生物において普遍的に重要なアミノ酸であると考えられた。

以上、本研究で得られた成果は、DNA二重鎖切断修復の分子機構に新たな知見を与えるとともに、新規放射線増感剤の分子設計の手がかりとなることも期待される。



(論文博士)

論 文 要 旨 (英 文)

(300語程度)

報告番号	乙 第	号	氏 名	福地 命
(要 旨) DNA double-strand break (DSB) is considered the most critical type of DNA damage. DSB is thought to be repaired mainly through homologous recombination (HR) and non-homologous end-joining (NHEJ) in eukaryotic cells. In mammalian cells, Ku70, Ku86, DNA-PKcs, XRCC4, DNA ligase IV (LIG4) and XLF (also known as Cernunnos) are thought to play critical roles. LIG4 ligates two DNA ends at the final step of NHEJ and XRCC4 is considered an essential regulator of LIG4. It has been reported that XRCC4 undergo phosphorylation by DNA-PK and casein kinase II. This study aimed to find a new mechanism regulating the complex of XRCC4/LIG4. First, I created a series of XRCC4 mutants, in which conserved lysine residues were changed into arginine, and inserted into pEGFP-C1 vector to express it as GFP-tagged protein in mammalian cells. The resulted vectors were introduced them into murine leukemia-derived XRCC4-deficient cell M10 and stable transformants were established. I evaluated the radiosensitivity of these transformants by colony formation assay. It was found that two mutants, in which lysine 187 or lysine 271 were changed into arginine (K187R and K271R, respectively), were radiosensitive, indicating possible important roles of these lysine residues in DSB repair. K271 is located within the putative nuclear localization signal. Fluorescent microscopic analysis showed defective nuclear localization of XRCC4^{K271R}. On the other hand, K187 is located in the putative LIG4 binding region. Immunoprecipitation analysis revealed that XRCC4^{K187R} was defective in the interaction with Lig4. Reduced DSB repair ability of XRCC4^{K187R} was also demonstrated by neutral comet assay and immunofluorescence of γH2AX. Furthermore, it was shown that XRCC4^{K187R} was capable of binding to chromatin and accumulating at DNA damage. In DNA data base search, the residue corresponding to K187 was found to be completely conserved in XRCC4 from all the eukaryotic organisms hitherto identified. These results in the aggregate indicated that K187 is critically important residue to maintain XRCC4/LIG4 complex. This study provides an important insight into the molecular mechanisms of DSB repair through NHEJ and also a new clue for medical application, e.g., development of new radiosensitizer.				