

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	DNA修復におけるDNAリン酸化・脱リン酸化酵素PNKPの制御機構
Title(English)	
著者(和文)	塚田海馬
Author(English)	Kaima Tsukada
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11906号, 授与年月日:2021年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:松本 義久,片渕 竜也,鷹尾 康一郎,塚原 剛彦,木村 宏
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11906号, Conferred date:2021/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	要約
Type(English)	Outline

令和二年度 博士論文

# DNA 修復における DNA リン酸化・脱リン酸化酵素 PNKP の制御機構

東京工業大学 環境・社会理工学院 融合理工学系  
原子核工学コース 松本義久研究室

塚田 海馬

指導教員 松本義久 准教授

令和 3 年 1 月 18 日



# 目次

第 1 章 .....	5
序論 .....	5
1.1 放射線による細胞・生体への影響 .....	6
1.1.1 放射線による生物影響 .....	6
1.1.2 放射線の標的分子 DNA .....	8
1.1.3 放射線による DNA 損傷 .....	9
1.2 DNA 損傷に対する細胞・生体の応答 .....	10
1.2.1 細胞内における働き .....	10
1.2.2 細胞内における DNA 損傷応答機構 .....	11
1.2.3 種々の DNA 損傷修復機構 .....	15
1.2.4 DNA 修復因子と遺伝性疾患 .....	20
1.3 DNA 修復とがん治療 .....	22
1.3.1 DNA 修復を標的としたがん治療法 .....	22
1.3.2 既存のがん治療法の問題点 .....	24
1.4 Polynucleotide Kinase Phosphatase(PNKP) とは .....	25
1.4.1 PNKP とは .....	25
1.4.2 PNKP の酵素活性と DNA 修復への寄与 .....	26
1.4.3 PNKP と関連研究の現状 .....	28
1.5 本研究の目的 .....	30
第 2 章 .....	31
原理・実験材料・実験方法 .....	31
2.1 原理と実験材料 .....	32
2.1.1 細胞 .....	32
2.1.2 実験・解析装置 .....	35
2.1.3 プラスミド DNA とその構築方法 .....	38
2.1.4 細胞へのプラスミド DNA の導入(トランスフェクション) .....	47
2.1.5 バイオイメーjingと蛍光タンパク質 .....	50
2.1.6 RNA 干渉による目的タンパク質の発現抑制 .....	51
2.1.7 CRISPR/Cas9 を用いた PNKP ノックアウト(KO) 細胞株の作製 .....	52
2.1.8 薬品・溶液データ .....	55

2.1.9	抗体データ .....	56
2.1.10	プライマー・siRNA データ .....	57
2.2	実験方法 .....	59
2.2.1	細胞準備 .....	60
2.2.2	細胞処理 .....	61
2.2.3	処理後の培養 .....	63
2.2.4	サンプル回収 .....	63
2.3.1	Western Blotting 法 (WB).....	64
2.3.2	蛍光免疫染色法 (Immunofluorescence staining: IF) .....	66
2.3.3	生細胞における蛍光観察(ライブセルイメージング).....	67
2.3.4	Image J Software による蛍光挙動解析 .....	68
2.3.5	Laser micro-irradiation 法 .....	69
2.3.6	フローサイトメトリー法 (Flowcytometry: FCM).....	70
2.3.7	アガロースゲル電気泳動 .....	71
2.3.8	免疫沈降法 (Immunoprecipitation: IP) .....	72
2.3.9	コロニーアッセイによる細胞生存率測定.....	73
2.3.9	WST-8 法による細胞生存・増殖率測定 .....	74
2.4	実験の流れ.....	75
第3章	.....	77
ライブセルイメージングによる PNKP 細胞内局在制御機構の解析.....		77
3.1	第3章の目的 .....	78
3.2	GFP-PNKP の細胞内局在解析 .....	79
3.3	PNKP の細胞内局在を制御する領域解析 .....	81
3.4	核内移行シグナル(NLS)の同定 .....	87
3.5	PNKP 核内移行の DNA 修復への寄与.....	96
3.6	FHA ドメインと PNKP の核小体内移行.....	102
3.7	第3章のまとめ.....	112
第4章	.....	114
Laser micro-irradiation 法を用いた DNA 損傷部位への PNKP 集積動態解析 ....		114
4.1	第4章の目的 .....	115
4.2	Laser micro-irradiation 法による DNA 損傷応答の可視化.....	116
4.3	PNKP の DNA 損傷部位への集積に必要なアミノ酸の同定 .....	121
4.4	PNKP のタンパク質間相互作用による DNA 損傷部位への集積 .....	127

4.5	リン酸化による PNKP DNA 損傷応答の制御.....	133
4.6	Arg35 と Arg48 の DNA 修復・ゲノム安定性維持における重要性.....	140
4.7	第 4 章のまとめ.....	152
第 5 章	.....	156
	リンカー領域内の新規リン酸化部位の同定と DNA 修復・複製における役割.....	156
第 6 章	.....	157
結論	.....	157
6.1	まとめ.....	158
6.2	本研究の将来展望.....	160
謝辞	.....	163
参考文献	.....	165

# 第 1 章

## 序論

## 1.1 放射線による細胞・生体への影響

### 1.1.1 放射線による生物影響

1895年にX線がレントゲンによって発見されて以来、放射線は人類の生活様式に大きな変革をもたらしてきた[1]。例えば、現在、世界のがん治療の分野において、放射線治療は外科治療、抗がん剤治療と並び、がん治療の三本柱の一つとして重要な役割を担っている。しかし一方で、広島・長崎における原子爆弾や東海村臨海事故などの事例が示すように、放射線が人体にとって重篤な影響を及ぼす場合もある。本章では放射線による生物影響に関して述べる。

放射線の生物作用を考える場合、「吸収線量」という定義がよく使われる。吸収線量は単位質量の物質に与えられるエネルギーのことを表しており、単位はグレイ(Gy)を用い、以下の式で定義される。

$$1\text{Gy} = 1\text{J/kg}$$

また、実際の放射線影響効果の尺度として、半数致死線量(LD<sub>50/60</sub>)というものがある。これはヒトが全身に4Gyの放射線を浴びた場合、無菌治療、骨髄移植などの適切な処置を施さなければ、60日以内にその半数が死に至ると言われる線量である。この4Gyという放射線量をグラム当たりのカロリーに換算すると、以下のようになる。

$$4 \times 0.24 \div 1000 \approx 0.001[\text{cal/g}]$$

ヒトの身体の大部分(およそ70%)は水であるため、身体の比熱は水とほぼ等しいとすれば、半数致死線量は、体温をわずか0.001°C上昇させるために必要な熱エネルギーほどしかない。このことから、放射線は極めて低いエネルギーで、生体・生物に大きな影響をもたらすことがわかる。

我々ヒトの体は様々な組織、臓器から構成される。そして、組織、臓器ごとに放射線の影響の受けやすさ(「放射線感受性」と呼ばれる)が異なる。一般に、細胞分裂が盛んな細胞・組織ほど放射線感受性が高く、細胞分裂をほとんどしない細胞・組織は放射線感受性が低いと言われている。この現象は、1906年にベルゴニーとトリボンドーによって報告され、ベルゴニー・トリボンドーの法則と呼ばれている。また、体内で最も放射線に敏感なのは白血球であり、0.25Gy以上の放射線を浴びると数時間後から顕著な白血球数の減少が認められる。さらに、生殖組織、消化管も放射線の影響を受けやすい。生殖組織では、男性は0.15Gy以上、女性は0.65Gy以上の放射線

を被ばくすると一時不妊を生じると言われており、細胞増殖が盛んな消化管においては、一度に 10~15Gy の放射線を被ばくすると、2~3 週間以内に消化管の傷害に起因する感染や出血で死亡すると言われている。一方で、細胞増殖をしていない筋肉組織、神経組織などは放射線の影響を受けにくいことが知られている [2-4]。

これらのことから、放射線は極めて小さいエネルギーで、細胞の増殖能力に著しい影響を与えるということが分かる。しかしこれは、放射線が増殖に関連したある標的にエネルギーを付与することで効率的に生体への影響を与えているとも解釈できる。そして、この標的というものが遺伝情報を担う DNA であると考えられている。

### 1.1.2 放射線の標的分子 DNA

放射線は物質にエネルギーを付与し、その物質の分子を励起・電離することが知られている。生体を構成する分子は水が大部分を占めるが、その他に DNA、RNA、タンパク質、脂質などがある。そして、放射線はこれらすべての分子を励起、または電離することができ、特に DNA 分子の励起・電離は、他の分子に比べて細胞の恒常性維持へと大きな影響を与えると考えられている。

その理由として、“DNA が生命の設計図”ということが挙げられる。細胞内において DNA が正確に残ってさえいれば、RNA やタンパク質は正しく作られ、機能を果たすことができる。しかし、放射線によって DNA が壊されると、これらの分子を作ることができなくなり、細胞の生存が脅かされる。

さらに、“DNA は細胞内で唯一の存在”であり、同じものは存在しない。ヒトには 46 本の染色体があり、半分を父親、残りの半分を母親から受け継ぐ。男性の性染色体以外はほぼ同じものが二つ存在するが、わずかに異なるもの(相同染色体)と、DNA を複製してできた全く同じもの(姉妹染色体)がある。このような特別な場合を除けば、基本的に DNA は同じものが二つと存在しない。そのため、細胞内において唯一の存在である DNA が壊される影響は極めて大きい。

そして、“DNA は極めて長い分子”であるため、何らかの要因で切断される可能性が高い。ヒトのゲノム DNA は約 60 億塩基対から構成される。1 塩基対当たりの長さは約 0.3nm であり、全長は約 2m となる。ヒト細胞の場合、ゲノム DNA を格納する核の大きさは約 10 $\mu$ m であり、これだけ小さな核の中に 2m の DNA が収納されているということだけでも驚きである。しかし、DNA は少しでも切断されると、遺伝情報の保存・伝達に非常に重大な影響を与える。細胞は分裂時に、対極する中心体から伸びる微小管に染色体の動原体を結びつけて引っ張ることで、染色体を正しく均等に分配する。ここで DNA が少しでも切れていると、染色体の分配が正しく行われず、新生細胞において遺伝情報の過不足が生じる。その結果、細胞内で RNA やタンパク質が正常に作り出せなくなるため、細胞の生存が著しく脅かされる。

### 1.1.3 放射線による DNA 損傷

放射線によって引き起こされる DNA 損傷には様々な種類がある(図 1.1)。例えば、DNA の塩基が糖から外れる塩基脱離、塩基に異常な化学基が結合する塩基修飾、これらは塩基損傷と呼ばれる。また、DNA の同一鎖の隣り合う塩基間などで共有結合が生じる鎖内架橋(Intrastrand crosslink)、相対する鎖間で共有結合が生じる鎖間架橋(Interstrand crosslink) と呼ばれる損傷、さらに、DNA 二本鎖の内の一方が切断される一本鎖切断(Single-Strand Break : SSB)、DNA 二本鎖両方が切断される二本鎖切断(二重鎖切断ともいう、Double-Strand Break : DSB) という損傷もある。ヒト正常二倍体細胞では、放射線( $\gamma$  線、X 線) 1Gy 当たり、塩基損傷が約 1,000~3,000 個、一本鎖切断が約 1,000 個、二本鎖切断が約 20~50 個生じると考えられている。DNA 二本鎖切断は生じる量としては最少ではあるが、その損傷の具合から全ての DNA 損傷の中で最も重篤であると考えられており、放射線の生物影響を考えるにあたり重要な位置を占める[5-6]。

これらの DNA 損傷は放射線以外の様々な要因によっても発生する。例えば、細胞組織やミトコンドリアの活動などから生じる活性酸素による酸化ストレス、DNA の複製時に発生する複製エラーなどが挙げられる。DNA 損傷の修復が不完全あるいは不正確であると、細胞内で様々な障害を引き起こし、がんや他の疾患の発生につながる。また、逆にこれを利用して、様々な疾患を治療する手法も存在する。

このようなことから、細胞・生体は DNA 損傷に対する防御機構を備えていることがわかる。その防御機構には、DNA 損傷修復、細胞周期チェックポイント、アポトーシス経路など様々な種類があり、複雑な分子群によって構成される経路である。そして、細胞の恒常性維持のためにこれらは厳密に制御されている。これらの概要は 1.2.2 章にて解説する。さらに、DNA 二本鎖切断修復の機構については 1.2.3 章で詳しく解説する。

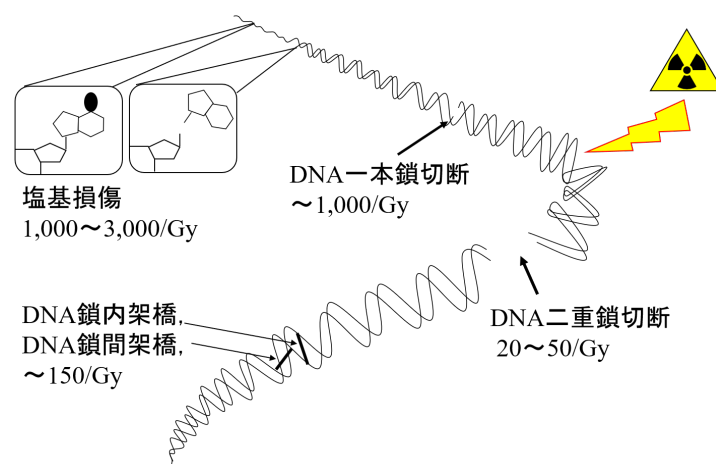


図 1.1 放射線( $\gamma$  線、X 線 1Gy) で生じる種々の DNA 損傷



## 1.2 DNA 損傷に対する細胞・生体の応答

### 1.2.1 細胞内における働き

ヒト細胞などの高等動物細胞では、細胞核内に染色体 DNA が存在し、タンパク質の合成が行われる細胞質から 2 層の核膜によって区切られている(図 1.2)。そして、細胞が生存し、その恒常性を維持するためには、細胞核と細胞質間での様々な分子の移動が行われ、細胞内での正常な働きが保たれていることが求められる。この細胞内での正常な働きとは、タンパク質が正常な状態で活動することを指す。そして、タンパク質は DNA→RNA→タンパク質という遺伝情報の流れ(セントラルドグマ)によって生産される[7]。つまり、タンパク質の設計図となる DNA が正しい形で保存されていることが細胞内の恒常性につながるのである[8]。

しかし、我々は自然放射線や紫外線、有害な化学物質など、様々な DNA 損傷を与える要因に囲まれて生活をしている。さらに、我々が日常生活を送る中でも、細胞内での代謝活動によって活性酸素種が発生し、DNA 損傷は引き起こされている。我々が、DNA 損傷が発生しても正常な細胞の状態を保つことができるのは、DNA 損傷を効率良く修復したり(DNA 損傷修復)、修復しきれない DNA 損傷をもった細胞を自主的に細胞死に誘導したり(アポトーシス)などの、細胞内の恒常性を保つための様々な細胞応答が備わっているからである。

1.2.2 章では、DNA 損傷が発生した細胞が、その恒常性を保つために引き起こす様々な応答の詳細を解説する。

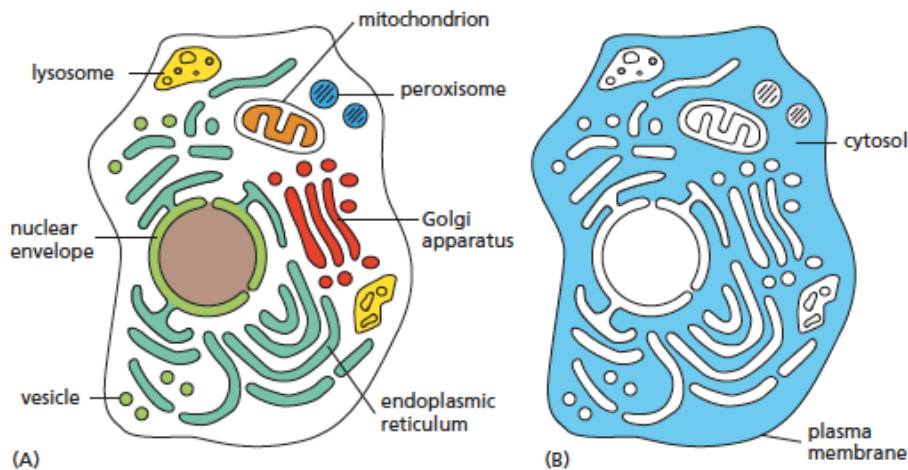


図 1.2 細胞内の構造[Essential 細胞生物学より引用]

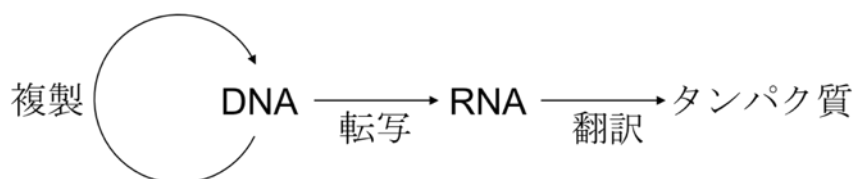


図 1.3 細胞内での遺伝情報の流れ(セントラルドグマ)

## 1.2.2 細胞内における DNA 損傷応答機構

1.1.3 章で述べたように、生体は DNA 損傷に対する様々な防御機構を備えている。この章ではそれらの、DNA 損傷応答機構について詳しく解説する。

### 1) 細胞周期チェックポイント

細胞周期チェックポイントとは、放射線などのゲノムストレスにより細胞内の DNA に損傷を受けた時に、細胞が細胞周期を停止させる機構のことを指す。まず、細胞周期とは、細胞が染色体 DNA を複製し、娘細胞に分配するために経る過程のことである。M 期(細胞分裂期) →G1 期(DNA 合成準備期) →S 期(DNA 複製期) →G2 期(細胞分裂準備期) →M 期という流れで細胞周期は進み、この細胞周期を繰り返すことによって細胞は増殖する。これらの期の進行は、様々な進行促進因子および抑制因子によって巧妙に制御されている。そして、細胞周期チェックポイントは、細胞周期を止める分子のブレーキを利用し、細胞の準備が整う前に次の過程が始まらないようにする役割がある。

細胞周期の中で G1 期と G2 期に存在するチェックポイントは極めて重要である。G1 期のチェックポイント (G1/S チェックポイント) では、S 期に入る前に外部環境に適しているか、また、DNA に損傷がないかを確認している。細胞の外部環境が細胞にとって好ましくない場合や DNA 修復が必要な場合は G1 期の進行を停止させたり、特殊な休止状態である G0 期に突入させ、細胞周期の流れを変える。また、DNA 複製期である S 期には、細胞は DNA の複製が正しく行われているか常に確認しており、異常がある場合は複製を一時的に休止させる(S 期チェックポイント)。さらに、G2 期のチェックポイント(G2/M チェックポイント) では、有糸分裂に入る前に DNA の修復と複製が完了しているかを確認する。そして、他の細胞からのシグナルに応じて細胞周期を制御するのもこれらのチェックポイントのもつ役割である。

そして、細胞周期チェックポイントは細胞周期を一度止めることで細胞にその後の細胞応答を決定させる時間を与えるとも考えられており、後述するアポトーシスや DNA 修復などの中から最適な経路の決定や DNA 修復を進行させるための猶予時間を与えるなど細胞の運命を決定する上で極めて重要な細胞応答経路である。

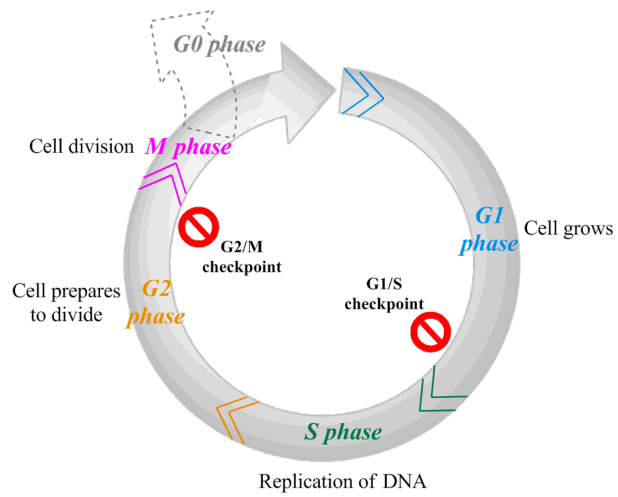


図 1.4 細胞周期チェックポイント

## 2) アポトーシス

アポトーシスとは、放射線や他の外的要因、発生の過程で修復が困難なレベルでのDNAへの損傷を受けた場合に、細胞が自発的に死ぬ(プログラム細胞死) ことである。オタマジャクシからカエルへの変態の過程で尾が消えるのも、尾の細胞がアポトーシスによって死んでいるからである。アポトーシスが発生する時、細胞の収縮、核の凝集、DNAの断片化が起こり、細胞自体がいくつかに分裂し、アポトーシス小体が形成される。そして、アポトーシスを起こした細胞は、最終的にマクロファージにより貪食される。同じ細胞死にネクローシスというものがあり、細胞の膨大、溶解、崩壊などによって細胞が消失する現象である。しかし、ネクローシスはアポトーシスとは異なり、自発的な細胞死ではなくいわば、外部要因による細胞の他殺なので、アポトーシスとは区別される。DNA損傷を受けた細胞や、がん遺伝子を活性化した異常な細胞を生体から排除する機構であるアポトーシスは、細胞のがん化を抑制する上で最も重要な機構である。

### 3) DNA 損傷修復

DNA 損傷修復とは、何らかの原因で DNA への損傷が発生した場合に、その損傷を修復する機構である。損傷を受けた DNA は、細胞内で素早く損傷の検出ができるように形状を変化させる。そして、DNA 損傷修復に関連するタンパク質群が DNA 損傷の発生している部位、またはその周辺に動員・結合し、他の分子との結合や複合体を形成することによって DNA 修復が行われる。そして、DNA には様々な種類の損傷(1.1.3 章参照)が存在し、損傷の種類によってその修復方法は異なる。

DNA 損傷修復のより詳細な解説は 1.2.3 章で行う。

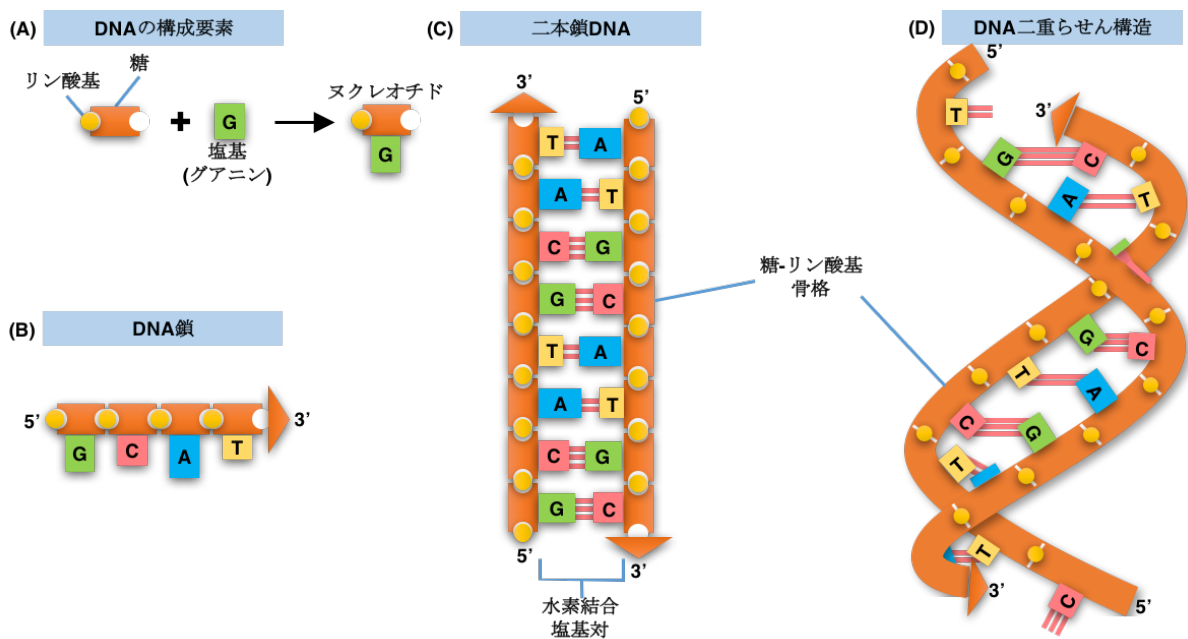


図 1.5 DNA の構造

### 1.2.3 種々の DNA 損傷修復機構

1.1.3 章で述べたように放射線は、DNA に塩基損傷、鎖切断、架橋などの様々な損傷を与える。そして、細胞内にはそれらの損傷を修復する酵素群が存在し、それらの修復酵素群の遺伝子に変異が入り、欠損することで放射線高感受性や遺伝性疾患の原因となる。ここでは、DNA 一本鎖切断、DNA 二本鎖切断の修復機構について述べる。

#### 1) DNA 一本鎖切断の修復

DNA 一本鎖切断は間接的に発生したもの(酵素活性による DNA 鎖の切断など)と直接的に発生したもの(代謝で発生した活性酸素による塩基損傷や放射線による直接的な切断など)の二種類に分けられる。

間接的に発生する DNA 一本鎖切断は、塩基損傷などの修復機構の過程で発生する。活性酸素などによって発生する塩基損傷は、放射線によって発生する DNA 損傷の中でも最も発生数が多い損傷であり、塩基損傷の修復には、DNA を切断せずに損傷した塩基を直接修復する機構と、損傷部分を切り出し除去することで修復する除去修復機構がある。除去修復の中には、損傷した塩基のみを切り出す塩基除去修復機構(Base Excision Repair: BER)と、損傷した塩基を含むより大きな範囲を切り出し、その部分の DNA を改めて合成し直すというヌクレオチド除去修復機構(Nucleotide Excision Repair: NER)がある。

DNA を切断せずに修復する機構の中では、光回復が最も代表的である。紫外線などが原因で発生するピリミジン二量体(ピリミジンダイマー) を見つけて、これに光回復酵素が結合する。そこへ可視光が当たると酵素中の受光部分が光のエネルギーを吸収し、そのエネルギーを利用しピリミジン二量体を開口して元に戻す。この修復機構は、光エネルギーを利用した極めて効率的なものだが、ヒトやマウスなどはこの機構を持っていない。

塩基除去修復機構は、損傷した塩基と糖の間の N-グリコシド結合を DNA グリコシラーゼという酵素により切断し、損傷した塩基を DNA 鎖の中から取り除く。次に塩基の取り除かれた AP 部位を除去し、DNA ポリメラーゼという酵素により新しく DNA を合成するという修復機構である。

ヌクレオチド除去修復機構は、塩基除去修復機構と異なり、損傷した塩基の周辺の広い領域を取り除き、取り除かれた領域を DNA ポリメラーゼによって合成し、DNA リガーゼによってつなげるという修復機構である。

この他にも、DNA 複製の過程で発生した 1~5 塩基対程度の対合しない領域を見つけ、修復を行うミスマッチ修復(Mismatch Repair: MMR)と呼ばれる修復機構

などがある。

これらの修復経路に関する研究は、2015年に Tomas Lindahl 博士(BER)、Paul Modrich 博士(MMR)、Aziz Sancar 博士(NER)の3氏がノーベル化学賞を受賞している。

直接的な DNA 一本鎖切断は DNA 一本鎖切断修復機構(Single Strand Break Repair: SSBR)によって直接結合される。上記の間接的に発生する DNA 一本鎖切断も最終的には SSBR によって修復される。SSBR では、まず ATR や PARP と呼ばれるタンパク質がセンサーとして一本鎖切断の認識を行う。ATR はタンパク質のリン酸化を介して他タンパク質の活性化を行い、PARP(poly ADP-ribose polymerase)複合体は PAR 化により DNA 一本鎖切断部位に他のタンパク質が正しく集積してくるための目印を作る。その後、PNKP や APE1 による切断末端の修飾が行われ、最終的には XRCC1-Ligase III 複合体により損傷末端の結合が行われる [9]。

## 2) DNA 二本鎖切断の修復

**1.1.3 章**でも述べたが、放射線による DNA 損傷の中で最も重篤だと考えられているのは、DNA 二本鎖切断である。二本ある DNA 鎖の両方が切断された場合、除去修復機構のように向かい合った正常な DNA(相補鎖 DNA) も存在しないため、正しい配列を認識できない。つまり、これらの修復には異なる機構が必要となる。

ヒトを含む真核生物において、DNA 二本鎖切断の修復は主として 2 つの機構によって修復される[9、10]。1 つ目が相同組換え(Homologous Recombination: HR)、2 つ目が非相同末端結合(Non-Homologous End-Joining: NHEJ) である(図 1.6)。

相同組換えは、DNA 二本鎖切断が起こると、DSB 部位周辺と相同な配列を探し、それを鋳型として DNA 合成・修復をする方法である。エキソヌクレアーゼ活性を持つ NBS1-MRE11-RAD50 複合体 (MRN 複合体) が DSB の位置から一方の DNA 鎖を削る(分解) ことで、一本鎖部分を作り出す。この一本鎖部分の伸長は BLM、WRN、EXO1、DNA2 などが制御し、相同配列を認識するために必要な長さを露出させる[10、11]。また、この複合体は ATM を損傷部位に動員し、細胞周期チェックポイントを活性化させることも知られている。この一本鎖 DNA に RPA、RAD51、BRCA1、BRCA2 などが結合し、RAD51 のフィラメント形成を促進する。RAD51 によって、相同鎖の探索と鎖交換が行われ、相同鎖を鋳型とした DNA 合成が行われる。最終的には、相同鎖と修復された DNA からなる 2 対の染色体が解離して修復が完了する。この修復系は相同配列間のわずかな違いを除けば、塩基レベルで正確に復元するため、正確性の高い DNA 二本鎖切断修復経路である。

非相同末端結合は、DNA 二本鎖切断が起こると、まずドーナツ型のタンパク質 Ku(Ku86 または Ku80 と Ku70 のダイマー) が、切断された DNA の末端に結合する。次に、DNA-PKcs が DNA-Ku 複合体に結合する。DNA-PKcs はタンパク質リン酸化酵素であり、自身と他の修復酵素群をリン酸化する働きを持っている。さらに必要に応じて、Artemis、XLF/Cernunnos、Pol  $\mu$  および  $\lambda$ 、PNKP などが末端の調節を行い、XRCC4-DNA リガーゼ IV 複合体が最終的に DSB 同士を結合することで修復が完了する。

非相同末端結合は、結合部位における塩基の欠失や挿入、さらに空間的に隣接する他の DNA 鎖との誤った結合(染色体欠失、逆位、転座) が発生する可能性がある。その一方で、相同組換えで用いられる相同的な DNA 鎖は相同染色体や姉妹染色体にあることが前提だが、ヒト・マウスなどの細胞では相同染色体はほとんど鋳型として機能しないため、姉妹染色体しか利用されない。つまり、相同組換えによる DNA 二本



鎖切断の修復は S 期の後半から G2 期に限定される。このように、これらの 2 つの DNA 二本鎖切断修復経路は細胞周期によって厳密に制御されている。

さらに近年 2 つの DSB 修復経路の制御において、DNA 損傷末端の処理や削り込みが極めて重要であることがわかっている[12,13]。たとえば、相同組み換え修復では鋳型となる DNA 配列を探せるように、切断末端を削り込んで一本鎖尾部を露出させるエンドリセクションと呼ばれる工程が必要であるのに対して、NHEJ では相同性を必要とせずに平滑末端を利用して再連結できる。そのため、これらの 2 つの修復経路は切断末端の形を基準に修復が進行されると考えられている。RPA 複合体や Shieldin 複合体はそれぞれ、エンドリセクションによって削り出された一本鎖 DNA の保護と、エンドリセクションの防止の為に二本鎖の DNA 切断末端を保護する役割を持つことが近年報告されている[14, 15]。そして、これらは相同組み換え修復と非相同末端結合のマスターレギュレーターである BRCA1 と 53BP1 によって適切に制御されている[16]。

また、非相同末端結合は、空間的に最も近接する末端同士を結合する反応なため、相同組換えに比べ、修復の精度が低いとされているが、ゲノムの大部分はタンパク質をコードしないため、多少の塩基の欠失、挿入などは許容される。そして、体内において G0 期あるいは G1 期の細胞の割合が多いため、ほとんどの DNA 二本鎖切断は非相同末端結合によって修復されている。そのため、特にヒトにおいては非相同末端結合の重要性が高いと考えられている。

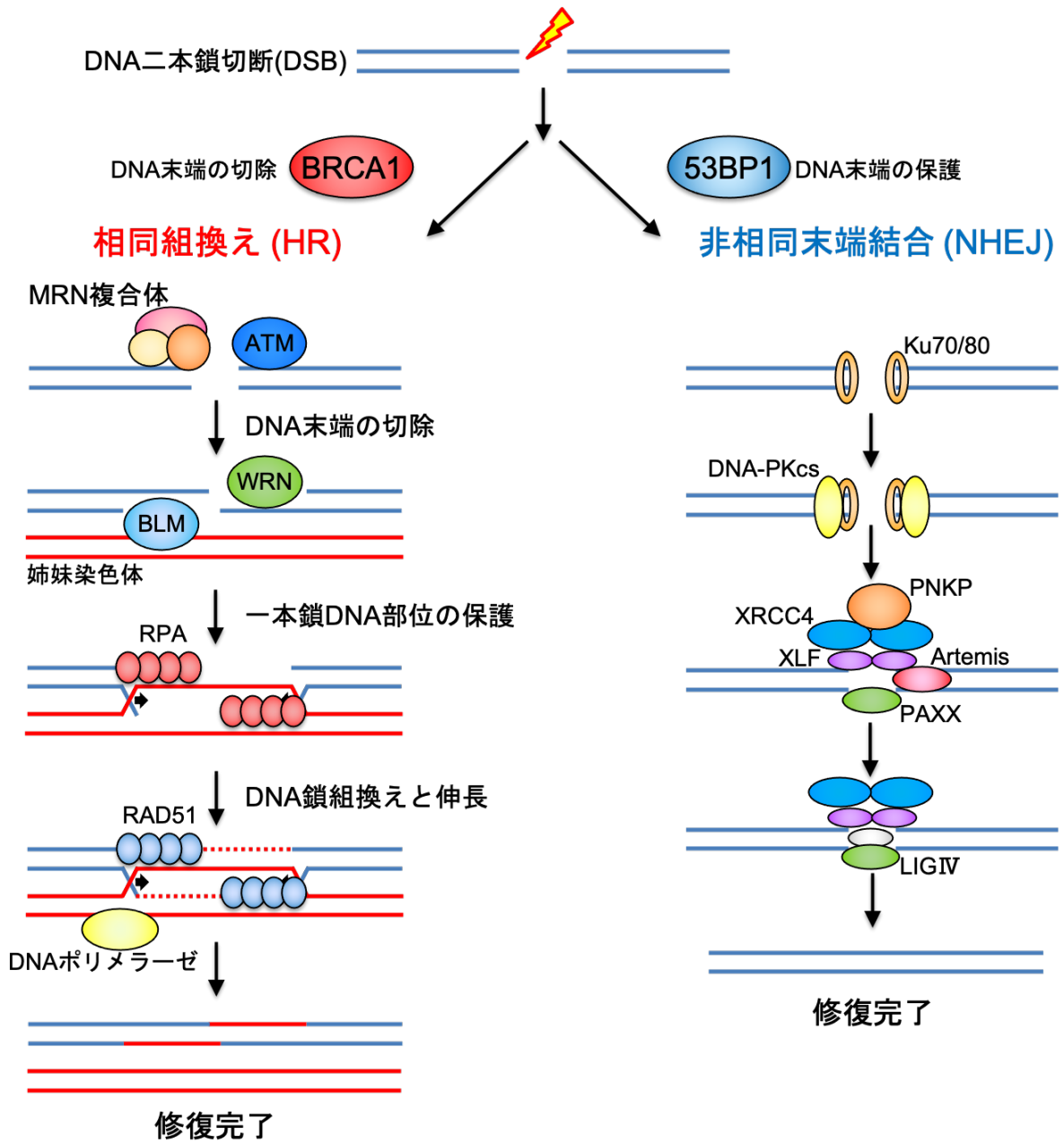


図 1.6 相同組換え(HR) と非相同末端結合(NHEJ)

#### 1.2.4 DNA 修復因子と遺伝性疾患

DNA の損傷は、細胞内における正常な代謝過程でも発生しており、一日一細胞あたり約 50000～500000 個の DNA 損傷が発生すると考えられている。そして、これらの DNA 損傷は DNA 修復によって正しく修復され、ゲノムの安定性が保たれている。DNA 修復に異常が生じると、これらの DNA 損傷が蓄積または、修復の失敗による突然変異が蓄積することで、細胞の恒常性の崩壊やゲノム不安定性に繋がり、次第に病気の症状となって現れる。また、これらの症状は遺伝子の変異に由来するため、両親から子へと受け継がれる遺伝性疾患へと繋がる。これらのことから、DNA 修復と遺伝性疾患は密接に関係していることがわかる。

実際に報告されている DNA 修復因子の変異により発症する遺伝性疾患として以下のものなどが挙げられる。

##### 1) Microcephaly and Seizure (MCSZ)

小頭症やてんかんを呈する遺伝性神経疾患であり、原因遺伝子は PNKP である [17]。MCSZ の患者細胞は DNA 一本鎖切断を誘導する薬剤に高感受性を示すことがわかっている [18]。

##### 2) Ataxia Oculomotor Apraxia 4 (AOA4)

眼球運動失調症を症状とする遺伝性神経疾患であり、原因遺伝子は PNKP である [19、20]。AOA4 の患者細胞は DNA 一本鎖切断を誘導する薬剤に高感受性を示すことがわかっている [18]。

##### 3) Charcot-Marie-Tooth Hereditary Neuropathy 2(CMT2B2)

慢性の運動・感覚多発ニューロパチー(末梢神経障害)を特徴とする遺伝性神経疾患であり、原因遺伝子は PNKP である [21、22]。

##### 4) Ataxia Oculomotor Apraxia 1 (AOA1)

眼球運動失調症を症状とする遺伝性神経疾患であり、原因遺伝子は DNA 一本鎖切断修復など広範な DNA 鎖切断修復に関わるとされる Aprataxin (APTX) である [23]。APTX は PNKP と同様に DNA 切断末端の修飾を行い、その後 DNA 末端結合を促進する役割を持つ [24]。AOA1 の患者細胞は DNA 一本鎖切断を誘導する薬剤に高感受性を示し、染色体不安定性を持つことがわかっている。

##### 5) Spinocerebellar Ataxia with Axonal Neuropathy 1 (SCAN1)

約 13 歳-15 歳と比較的遅い段階で末梢神経障害が症状として現れる遺伝性神経疾患であり、原因遺伝子は Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 1 (TDP1)である[25]。TDP1は PNKP や APTX と同様に DNA 切断末端の調整を行うことが知られている。

6) Bloom 症候群 (Bloom syndrome)

日光過敏症、免疫不全、低身長症、若年性悪性腫瘍発生率の上昇などの症状を呈する遺伝性疾患であり、原因遺伝子は相同組み換え修復(HR)による DNA 二本鎖切断修復に関わる DNA ヘリケース(DNA 二本鎖を一本鎖に解く活性を持つ酵素)BLM である[26]。DSB 修復経路選択や DNA 複製に関わることも報告されている[27-30]。

7) 毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia-Telangiectasia)

主な特徴として小脳失調、毛細血管拡張、免疫不全を呈し、患者の細胞は電離放射線などの DNA 障害因子に高い感受性を示すことが知られている遺伝性疾患である。原因遺伝子は DNA 二本鎖切断のセンサータンパク質であり、他の DNA 修復因子をリン酸化により活性化する役割を持つ ATM である[31]。

このように、DNA 修復因子と遺伝性疾患は密接に関係するが、その中でも特に本研究で注目する PNKP は 3 つの遺伝性疾患の原因として報告されていることから、細胞が持つ様々な機能に関わることを示唆されている。しかし、これらの遺伝病と PNKP の機能の関係については不明な部分が多く、遺伝病発症メカニズムの理解や治療法の開発には細胞内での PNKP の役割に関する詳細な理解が求められている。

## 1.3 DNA 修復とがん治療

### 1.3.1 DNA 修復を標的としたがん治療法

三大がん治療法である手術・放射線療法・化学療法の中でも化学療法は「手術によって切除ができないがんの治療が可能である」こと、「放射線療法と同時に放射線増感剤として併用可能である」などの様々なメリットがある。一般的に、化学療法の代表として抗がん剤治療が挙げられ、その作用機序としては、DNA 損傷、DNA 修復阻害、DNA 合成阻害、細胞分裂阻害、代謝拮抗、栄養阻害などがある。その中でも、DNA 損傷を誘導する抗がん剤は、細胞の DNA を効率的に損傷させ細胞死を誘導できることから、がん治療の標的として幅広く利用されている。

以下に DNA 損傷や修復機構を標的とした主な抗がん剤・放射線増感剤を示す。

#### 1) Camptothecin (I 型 Topoisomerase 阻害剤)

Camptothecin は一本鎖 DNA のらせん制御をする活性を持つ I 型 Topoisomerase の阻害剤である。I 型 Topoisomerase は DNA 鎖を一度切断し、結合することで DNA 鎖の絡まりを解くが、Camptothecin は切断後の DNA 末端に Topoisomerase poison と呼ばれる断片化した Topoisomerase を残存させることで DNA 一本鎖切断を結合出来なくする[32]。この Topoisomerase poison を持った DNA 一本鎖切断は、DNA 複製の際に複製フォークと衝突し、細胞への毒性の高い DNA 二本鎖切断となることから、有効な抗がん剤として使用されている。それだけでなく、細胞周期の S 期特異的に DNA 二本鎖切断を誘導することから、DNA 修復の分子メカニズム解析のツールとして分子生物学の分野では幅広く使用されている。

#### 2) Hydroxyurea (Ribonucleotide reductase 阻害剤)

Hydroxyurea (HU)は 1869 年にドイツの Dresler らによって合成された尿素誘導体である。リボヌクレオチドから DNA の構成物質であるデオキシリボヌクレオチドを作り出すために必要不可欠である Ribonucleotide reductase(リボヌクレオチド還元酵素)の阻害剤である[33]。そのため HU は、DNA の構成物質の枯渇を促し、DNA 合成阻害効果を持つ。このことから、細胞を DNA 複製フォークの停止により DNA 合成期である S 期に停滞させる事も知られている。また、DNA 構成物質の合成阻害は DNA 複製だけでなく DNA 修復にも重要であり、DNA 一本鎖切断の修復不全、それによる複製フォークとの衝突による DNA 二本鎖切断を起こすことが知られている。これらの効果により抗腫瘍効果を持つとして抗がん剤として使用されている。

### 3) Mitomycin C (DNA ポリメラーゼ阻害剤)

Mitomycin は 1955 年に北里研究所の秦藤樹らによって発見された抗腫瘍抗生物質群である [34]。その一群の中から安定性が高く、強い抗腫瘍活性を有する Mitomycin C(MMC)が協和発酵工業の若木重敏らによって分離された[35]。MMC は、様々な酵素により還元されて複数の活性代謝物となり、アルキル化、DNA への架橋形成、フリーラジカルによる DNA 鎖の切断を介して DNA の複製を阻害し、抗腫瘍効果を示すことがわかっている。

### 4) Cisplatin

Cisplatin は白金錯体に分類される抗がん剤であり、1845 年にイタリアの化学者 Michele Peyrone により錯体の研究材料として合成された。1965 年に米国の Barnett Rosenberg らが、Cisplatin が大腸菌に対する細胞分裂阻止作用を発見し、1969 年には Cisplatin が癌細胞の分裂抑制に効果を示すことがわかった。作用機序としては、DNA の構成塩基であるグアニン、アデニンに結合し、2 つの塩素原子部位で DNA と結合することで、DNA 鎖内に架橋を形成する [36]。

### 5) Olaparib (PARP1 阻害剤)

Olaparib は抗がん剤の中でも分子標的薬であり、がん細胞の増殖・浸潤・転移に関わる分子を標的として阻害することによりがん治療を行う。正常細胞へのダメージを少なくしてがん細胞のみを選択的に攻撃することを目指している。Olaparib は PARP1 という DNA 一本鎖切断修復に関わるタンパク質を標的として阻害する活性を持つ [37]。Olaparib は、合成致死という方法でがん細胞を選択的に細胞死へ誘導する。合成致死とは 2 つの因子の機能が阻害されたときのみ発生する細胞死であり、Olaparib は家族性乳がん原因遺伝子である BRCA1/2 が欠損した乳がんや卵巣がんの治療薬として使用されている。

### 1.3.2 既存のがん治療法の問題点

既存のがん治療法、特に抗がん剤や放射線増感剤の大きな問題点として薬の副作用と薬剤耐性の2つが挙げられる。近年薬の副作用の問題を解決するために、合成致死を狙った治療が流行となっており、Olaparibなどの分子標的阻害によるがん治療が正常細胞への副作用をできるだけ減らすことが可能な手法として使われている。このように、DNA修復因子を特異的に阻害するような抗がん剤は、組み合わせによって細胞の合成致死を誘導できることがしばしばあり、副作用を減らすためのターゲットとして極めて有望である。

しかし、DNA修復阻害を標的としたがん治療には薬剤耐性の問題がつきまとう。大きく分けて以下の2つの問題点が挙げられる。

1つ目の問題点は、がん細胞の由来や状態の違いによる薬剤耐性である。そもそもがん細胞はその由来により遺伝的な背景が大きく異なる。その遺伝的な背景により、効果的な抗がん剤、つまり効果的な標的因子が異なってくる。これらを考慮して抗がん剤治療の標的を決める必要があるが、そもそも遺伝的背景と効果的な標的遺伝子の組み合わせはあまりわかっておらず、名の通った抗がん剤を順番に使用しているのが現状である。また、がん細胞の遺伝的背景だけでなく、細胞周期に依存したDNA損傷耐性や、低酸素環境など腫瘍の周辺環境も抗がん剤治療の効果に影響を与える重要なファクターである。

2つ目の問題点は、治療中に発生するがん細胞の抗がん剤抵抗性の獲得である。第1.3.2章の抗がん剤・放射線増感剤などを使ったがん治療は現在よく見られるが、患者の多くは服用後しばらくしてからこれらの薬剤に対する耐性を獲得するという問題点である。DNA修復の阻害を狙っている抗がん剤である以上、DNA損傷の誘導と同時に誤ったDNA修復によるさらなる突然変異の蓄積は否めない。これらの突然変異が蓄積することでがん細胞はしばしば抗がん剤抵抗性を獲得する。抵抗のメカニズムとしては細胞外への薬の流出、薬の無効化に加え、分子的要因としては細胞死(アポトーシス)の抑圧、DNA修復の補助(通常とは異なる経路を用いたDNA修復経路が活性化し、バイパスとなることで細胞死を免れる)などが挙げられる。

これら2つの理由から、DNA損傷応答やDNA修復経路の分子メカニズムの詳細を理解することは、既存の抗がん剤、放射線増感剤の効率化や新規治療標的の探索、さらには抵抗性を示したがん細胞の新規治療標的の探索に繋がる可能性を秘めた学術的・社会的に重要な研究課題である。

## 1.4 Polynucleotide Kinase Phosphatase(PNKP) とは

### 1.4.1 PNKP とは

Polynucleotide Kinase Phosphatase(PNKP) は、ヒトでは分子量 57kDa、17 個の exon、521 個のアミノ酸から構成されるタンパク質である(図 1.7)。そして、PNKP は第 19 番染色体長腕上に存在する *PNK* 遺伝子から生産される。PNKP は 3 つのドメイン (FHA ドメイン、脱リン酸化ドメイン、リン酸化ドメイン) と非構造化領域 (リンカー領域) からなるタンパク質で、核酸末端のリン酸化・脱リン酸化活性を持つ酵素である。興味深いことに、PNKP はその酵素活性のユニークさから、前述した塩基除去修復・DNA 一本鎖切断修復・DNA 二本鎖切断修復など非常に広範な DNA 修復経路に関わることが報告されている[38-41]。また、第 1.2.4 章で言及したようにヒトにおいて PNKP の変異は小頭症やてんかんを呈する MCSZ や眼球運動症失調症である AOA4、末梢性神経障害を引き起こす CMT2B2 など、様々な遺伝性神経疾患の原因となることが報告されている。また、これらの遺伝病の原因変異としては酵素活性を司る脱リン酸化ドメイン(L176F、E326K)とリン酸化ドメイン(L399P、R462P、Q517\*、Y515\*、T408del など)に多く存在しており、FHA ドメイン(I21Hfs\*37)やリンカー領域内での報告は少ない[18]。

1.4.2 章では、細胞内において PNKP がどのように制御されるのか、1.4.3 章では PNKP に関する研究の現状について解説する。



図 1.7 PNKP のドメインマップ: PNKP タンパク質を機能・構造毎に分割したドメインマップである。PNKP は N 末端から 1~110 アミノ酸の領域は、Fork-head associated(FHA)ドメイン、146~337 アミノ酸の領域は脱リン酸化(Phosphatase)ドメイン、341~516 アミノ酸の領域がリン酸化(Kinase)ドメイン、111~145 アミノ酸領域がリンカー(非構造化)領域と呼ばれている。全長は 521 アミノ酸で、分子量は約 57kDa である。



### 1.4.2 PNKP の酵素活性と DNA 修復への寄与

図 1.8 に DNA 修復における PNKP の役割を示す。PNKP は DNA の 5'末端をリン酸化、3'末端を脱リン酸化する活性を持つ酵素である[42、43]。塩基損傷、DNA 一本鎖切断、DNA 二本鎖切断などの DNA 損傷では、その修復の過程で DNA の末端が露出する。この露出した末端を結合するためには、2つの DNA 末端がリン酸化状態と脱リン酸化状態である必要があり、PNKP の活性が重要である。そのため、放射線やその他の因子により DNA 損傷が発生した場合、XRCC1 や XRCC4 と呼ばれる足場タンパク質と結合することで、それぞれ DNA 一本鎖切断修復、非相同末端結合を介した DNA 二本鎖切断修復に関わることが報告されている[44、45]。

多数のアミノ酸が繋がったものをポリペプチド鎖といい、その両末端にあるアミノ基側を N 末端、カルボキシル基側を C 末端という。PNKP は N 末端から 1~110 アミノ酸の領域は、Fork-head associated(FHA)ドメイン、146~337 アミノ酸の領域は脱リン酸化(Phosphatase)ドメイン、341~516 アミノ酸の領域がリン酸化(Kinase)ドメインと呼ばれており、111~145 アミノ酸がリンカー(非構造化)領域である。

FHA ドメインはリン酸化タンパク質を特異的に認識し、タンパク質結合を促すドメインであり、DNA 二本鎖切断のセンサーとして働く NBS1 や、DNA 二本鎖切断が発生した場所のマーカースとして他のタンパク質のリクルートに関わる MDC1 など、多くの DNA 修復タンパク質間で共通して見られる配列である[46]。FHA ドメインの三次元構造を図 1.9 に示す。FHA ドメインはリン酸化した Threonine を特異的に認識することが知られており、よく似た役割を持つドメインとして家族性乳がん原因遺伝子 BRCA1 が持つ BRCT ドメイン(リン酸化した Serine を特異的に認識する)が挙げられる[47]。

脱リン酸化ドメインは、タンパク質ではなく核酸の脱リン酸化を制御するドメインであり、DNA 損傷 3'末端のリン酸基を取り外す酵素活性を持っている。そして、これまで PNKP の変異に由来する遺伝性神経疾患の原因変異として多く報告されており、脱リン酸化ドメインの変異は PNKP 自体のタンパク質安定性の低下を引き起こすと考えられている[17]。

リン酸化ドメインは、DNA 損傷 5'末端にリン酸基を取り付ける酵素活性を持つ領域である。脱リン酸化ドメインとともに遺伝性疾患の患者細胞において多くの変異が確認されている[18]。また、リン酸化ドメイン内の 372~379 は ATP 結合領域であり、核酸のリン酸化に必要な不可欠な領域だと考えられている。

リンカー領域は、前述したドメインとは異なり構造を持たないタンパク質領域であり、PNKP の中で一番役割のわかっていない領域である。網羅的な解析により多くの翻訳後修飾可能残基を含むことがわかっている。

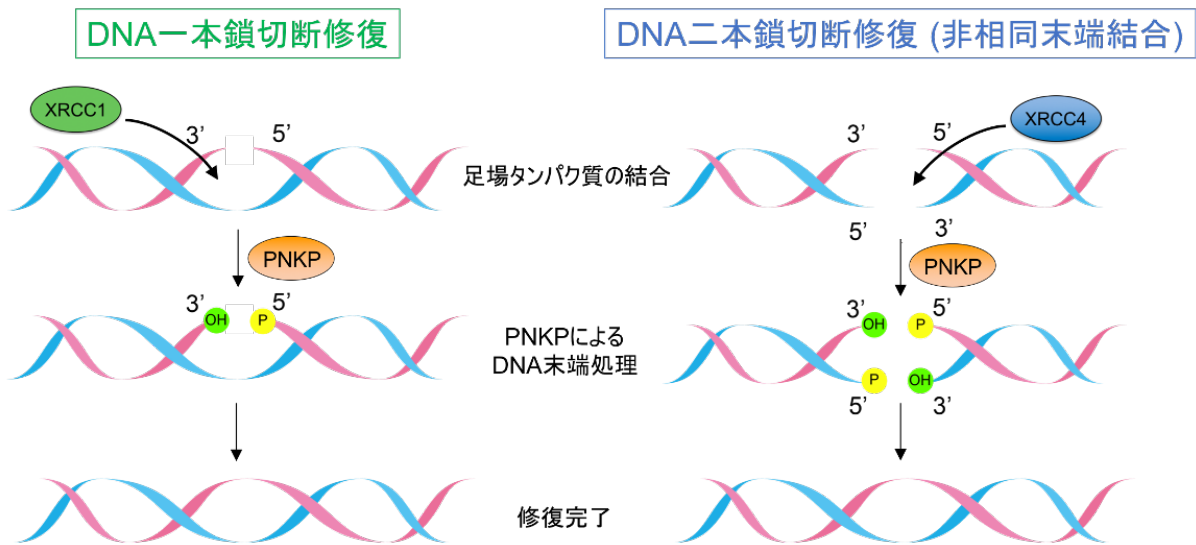


図 1.8 DNA 修復における PNKP の役割: PNKP は DNA 一本鎖切断発生時には XRCC1 と結合し、DNA 二本鎖切断発生時には XRCC4 と結合することで DNA 損傷部位へと集積する。その後 DNA 切断末端の修飾を行い、その後の末端結合を促進する。

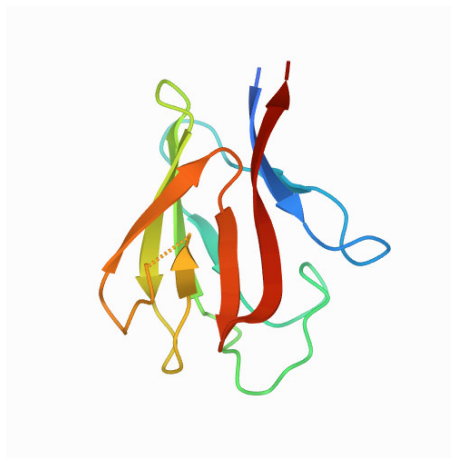


図 1.9 PNKP FHA ドメインの 3 次元構造 (Protein database 2BRF より引用)

### 1.4.3 PNKP と関連研究の現状

図 1.10 に PNKP のドメインマップと既往の研究において明らかになっているタンパク質結合を示した。

脱リン酸化ドメインの D171 は脱リン酸化活性の活性中心であり、このアミノ酸に変異を入れた PNKP は核酸末端の脱リン酸化能が著しく低下することがわかっている[48、49]。

リン酸化ドメインのアミノ酸領域 372～379 は ATP 結合領域であり、核酸末端へのリン酸基付与の活性に必要不可欠である。この領域を欠失すると、PNKP は核酸のリン酸化能が著しく低下する[50]。

FHA ドメインは多くの DNA 損傷応答・修復タンパク質に共通して保存されているドメインであり、リン酸化された Threonine と特異的な結合をすることがわかっている[51]。リン酸化はしばしばタンパク質の機能のオン/オフ切り替えのために行われ、DNA 損傷応答過程においても多くのタンパク質がリン酸化を介して制御される。既往の研究において、DNA 一本鎖切断修復過程では 519 番目の Threonine をリン酸化された XRCC1 と DNA 二本鎖切断の修復過程では 233 番目の Threonine をリン酸化された XRCC4 と結合することがわかっている[45、52]。これらの 2 つのリン酸化サイトは CK2 によってリン酸化される。

リンカー領域は、酵素活性や構造を持たない領域であり、いくつかの翻訳後修飾によって PNKP の構造変化に関わると考えられている。既往の研究において、リンカー領域内の 114 番目の Serine と 126 番目の Serine が DNA 二本鎖切断に応答してセンサータンパク質である ATM や DNA-PKcs にリン酸化されることが報告されており、タンパク質の安定性などに関わることが報告されている[53、54]。

既往の研究において、PNKP の酵素活性は非常に注目されており、脱リン酸化ドメインとリン酸化ドメインに関しては多くの研究がなされてきた。それは、ヒト細胞において核酸末端のリン酸基の取り外しを直接制御する酵素が PNKP しかおらず、この酵素活性が DNA 修復の過程で極めて重要なためである。また、PNKP は無脊椎動物から脊椎動物に渡り多くの生物種で共通して存在しており、T4 バクテリオファージの T4 PNK のヒトにおけるホモログ(似た機能を持ち、共通祖先から受け継がれた遺伝子)だと考えられていることから、進化的保存性が極めて高い。しかし、T4 PNK の時点では脱リン酸化ドメインとリン酸化ドメインのみで構成され、線虫や分裂酵母においても FHA ドメインとリンカー領域が欠失している[55]。このことから、FHA ドメインとリンカー領域は高等生物におけるゲノム DNA サイズの増加や複雑化に伴って、進化の過程で追加された領域なのではないかと推察した。つまり、高等生物種として生き残るために必要となる複雑な DNA 修復や DNA 複製、細胞周期制御、アポトーシスなどの細胞応答において、PNKP が FHA ドメインやリンカー領域を介し

て制御され、関与している可能性があると考えられる。しかし、FHA ドメインとリンカー領域、特にリンカー領域の役割に関しては不明な部分が多く、DNA 修復分子メカニズムのさらなる理解が求められる。

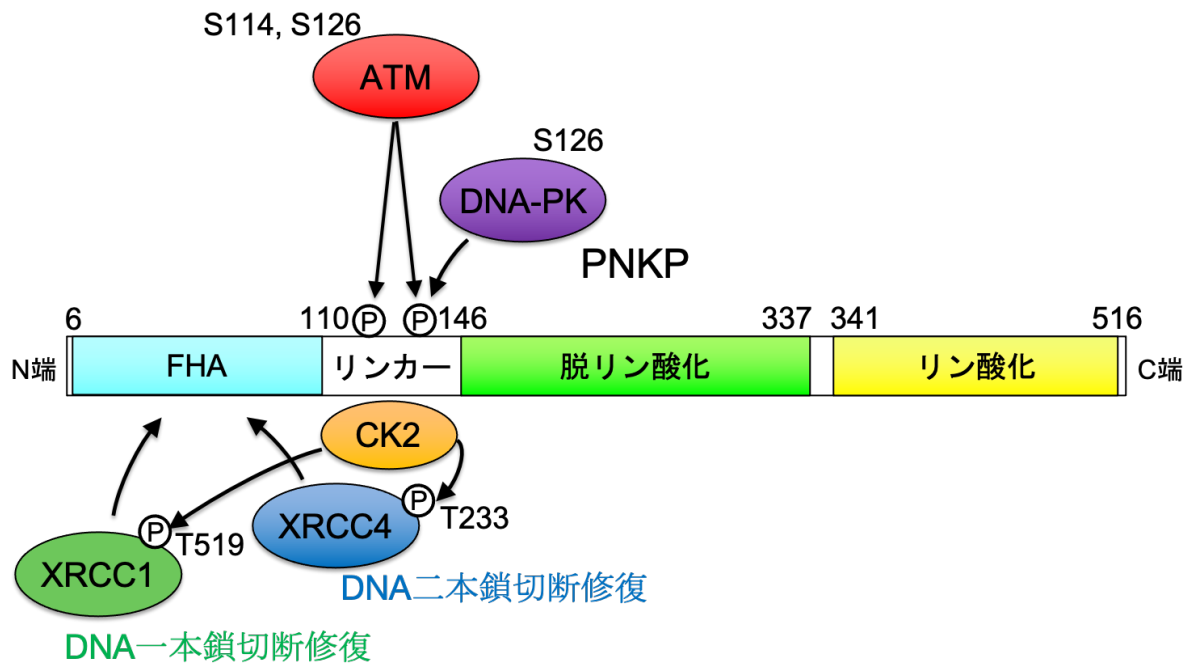


図 1.10 PNKP と関連タンパク質の研究状況

## 1.5 本研究の目的

本研究の目的は、“DNA 損傷に応答した PNKP の制御機構を解明”することである。DNA 損傷応答は、多様なタンパク質翻訳後修飾によるシグナリングや様々なタンパク質結合によって秒単位で厳密に制御されている。本研究では、この DNA 損傷応答の時空間的制御機構を解明するために、近年注目されている“蛍光タンパク質によるバイオイメージング技術”を利用する。第 2.1.5 章で後述するが、バイオイメージングの中でも特に蛍光タンパク質によるイメージングは空間分解能や時間分解能に優れており、一度細胞に導入するだけで生細胞内での目的分子の挙動を可視化することが出来る。この技術を利用して、生細胞内での PNKP 分子を可視化し、DNA 損傷に応答した PNKP の挙動を秒単位で解析した。また、PNKP などの NHEJ 関連タンパク質は細胞内での存在量が多い、または 1 損傷当たり結合してくる分子数が少ないため、既往の実験手法 ( $\gamma$  線照射部位への集積観察など)では DNA 損傷部位への集積が観察できない。そのため、本研究では Laser micro-irradiation 法により、細胞内の一部にレーザーを照射し、高密度な DNA 損傷を誘導することで PNKP の DNA 損傷部位への集積挙動解析を可能にする。さらに、細胞生物学・分子生物学・遺伝子工学的手法を駆使して、DNA 損傷応答における PNKP の制御機構を分子・アミノ酸レベルで明らかにすることを旨とする。

本研究では、上記の目的を果たすために具体的に 3 つの研究テーマを遂行した。これらの結果はそれぞれ 3~5 章において示す。

- 1) 細胞内での PNKP の局在制御機構の解析 (第 3 章)
- 2) DNA 損傷部位への PNKP 集積動態解析 (第 4 章)
- 3) 新規リン酸化部位の同定と DNA 修復・複製における役割 (第 5 章)

将来的には、これらの研究を通して DNA 損傷修復の分子メカニズムの一端を解明し、既存の抗がん剤や放射線増感剤の効率化や新規標的としての PNKP の有用性を評価する。さらに、PNKP を原因とした遺伝性神経疾患の発症メカニズムの解明、そして遺伝病の新規治療法開発などに繋がることを期待される。

## 第 2 章

原理・実験材料・実験方法

## 2.1 原理と実験材料

### 2.1.1 細胞

本研究で用いた細胞のデータを以下に示す。本研究においては、野生型 PNKP 遺伝子を持つ細胞として HCT116・U2OS・HEK293、また、第 5 章では CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術により PNKP 遺伝子を欠損した 2 種類の U2OS 細胞 (PNKP<sup>-/-</sup>細胞) を樹立し実験を行った。これらの細胞は全て、37°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% のインキュベーター内で培養した。培地はダルベッコ改変型イーグル培地(DMEM High Glucose) (ナカライテスク) を適宜使用し、NEWBORN CALF SERUM(BCS) (ナカライテスク) を 10% 濃度とし、さらに Penicillin + Streptomycin を適量添加したものをを用いて、基本的には 10cm ディッシュを用いて培養した。細胞の継代は、細胞が接着した 10cm ディッシュ内の培地を取り除いた後、PBS(Phosphate buffered saline : リン酸緩衝生理食塩水) (ナカライテスク) 約 5mL で 2 度洗浄し、0.25% EDTA-トリプシン(ナカライテスク) 処理によって細胞をディッシュから剥がした。その後、細胞懸濁液を遠心処理することでトリプシン含有培地を取り除き、細胞ペレットを全量が 5-10ml 程度となるように適宜培地で再懸濁し、9mL の培地の入った新たな 10cm ディッシュに 1mL 移すという方法で行った。

#### i) HCT116

HCT116 細胞は、アラバマ大学の Brattin らによって 1981 年頃にヒト大腸がんより樹立された細胞株である。がん細胞ではあるが、染色体数がほぼ二倍体に近く、培養過程で染色体数の変化が少ないことから、頻繁に細胞周期チェックポイントの解析に用いられる。また、ヌードマウスに移植可能であり、 $\beta$  カテニン遺伝子に変異があることが知られている。接着細胞であり、倍化時間は約 16~18 時間である。形質は安定しているが、少数の細胞で培養していると増殖が低下してくるため、細胞数を 1/5 程度にして 2~3 日おきに継代するのが好ましい[56, 57]。

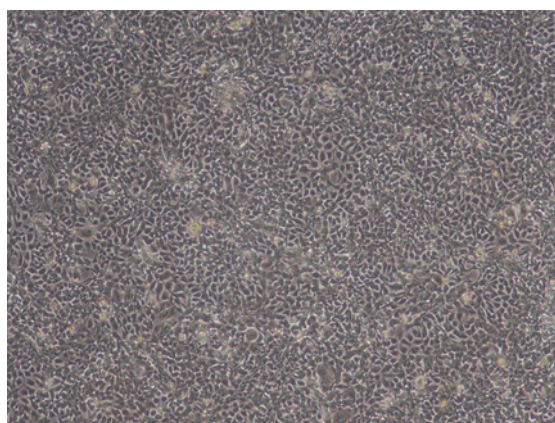


図 2.1 HCT116 細胞

## ii) U2OS

U2OS 細胞は 1964 年に 15 歳女性の中分化型骨肉腫から樹立された Insulin-like growth factor(IGF) -I と II を発現している。DNA 損傷後の修復経路の解析やアポトーシス経路の解析に広く用いられている。また、細胞構造がはっきりと分かれているため、蛍光免疫染色法を用いた解析に適している。接着細胞であり、細胞数を 1/3~1/6 で 2、3 日ごとに継代を行うのが好ましい[56, 58-60]。

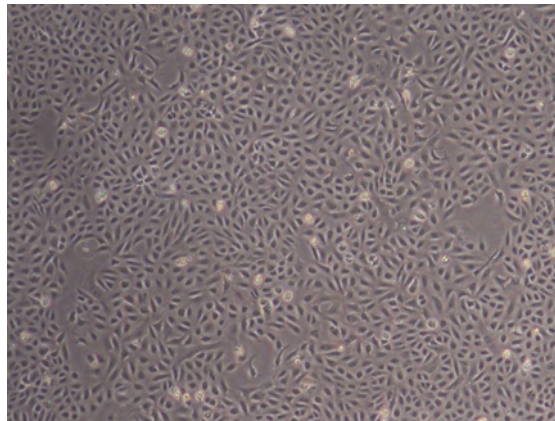


図 2.2 U2OS 細胞

## iii) HEK293

HEK293 細胞は 1973 年にオランダのライデン大学の Alex van der Eb の研究室においてヒト胎児腎細胞から樹立された[61]。健康なヒト胎児の腎細胞にアデノウイルス 5 を切断した DNA をトランスフェクションさせることにより開発された。細胞の増殖速度が速く、遺伝子導入効率が高いことからタンパク質発現解析や免疫沈降解析などに使用されている。接着細胞であり、細胞数を 1/3~1/6 で 2、3 日ごとに継代を行った。

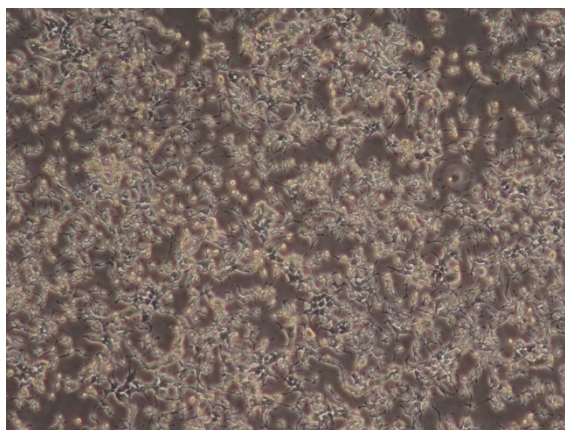


図 2.3 HEK293 細胞



#### iv) U2OS PNKP<sup>-/-</sup>細胞

本研究で使用した U2OS PNKP<sup>-/-</sup>細胞は、CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて本研究室で樹立したものである。欠損の確認は PNKP タンパク質の発現量とゲノム DNA のシーケンス解析によって行った。U2OS 細胞において PNKP が存在する 17 番染色体は 2 倍体であることが既往の研究で報告されており [62]、本研究での DNA シーケンス解析においても PNKP の gDNA 上に 2 つの異なる変異が入っており、2 アリルともフレームシフトにより PNKP が欠損していることが確認できている。第 5 章で後述するが、細胞の倍化時間は約 38 時間であり、細胞数を 1/5 程度にして 3~4 日おきに細胞の継代を行った。

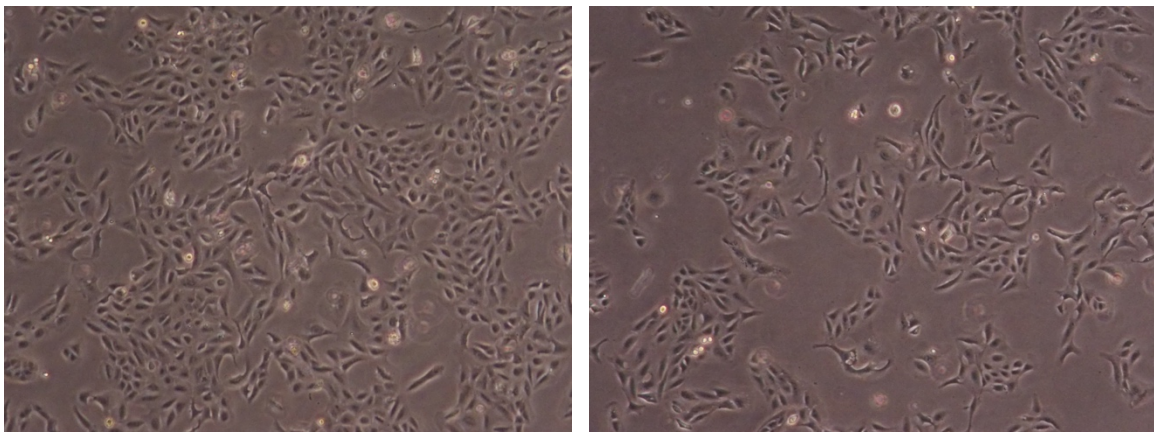


図 2.4 PNKP<sup>-/-</sup>細胞 (左 C14、右 C16)

## 2.1.2 実験・解析装置

本研究において使用した実験・解析装置の詳細を以下に示す。

### i) 放射線照射装置

以下に、実験に使用した放射線照射装置の仕様と図を示す。

線源と放射線の種別：コバルト 60 の  $\gamma$  線

半減期：5.27 年

エネルギー：1.17、1.33MeV

実際の放射能や照射距離は 2.2 章実験方法にて示す。



図 2.5 放射線照射装置

### ii) LI-COR(Western Blotting 現像機)

以下に、実験に使用した Western Blotting 用現像機(LI-COR) の仕様と図を示す。

製品名：LI-COR The C-DiGit Blot Scanner

製造会社：LI-COR Biosciences

イメージング可能範囲：10cm×8.5cm(196 $\mu$ m)

測定時間：12分(High)、6分(Standard)

検出器：リニアイメージングセンサー



図 2.6 Western Blotting 用現像機(LI-COR)

### iii) 蛍光倒立顕微鏡

以下に、実験に使用した 2 つの蛍光顕微鏡の仕様と図を示す。

製品名 : Axio Observer

製造会社 : Carl Zeiss



図 2.7 倒立型蛍光顕微鏡

製品名 : TCS SP8 LIGHTNING Confocal Microscope

製造会社 : Leica

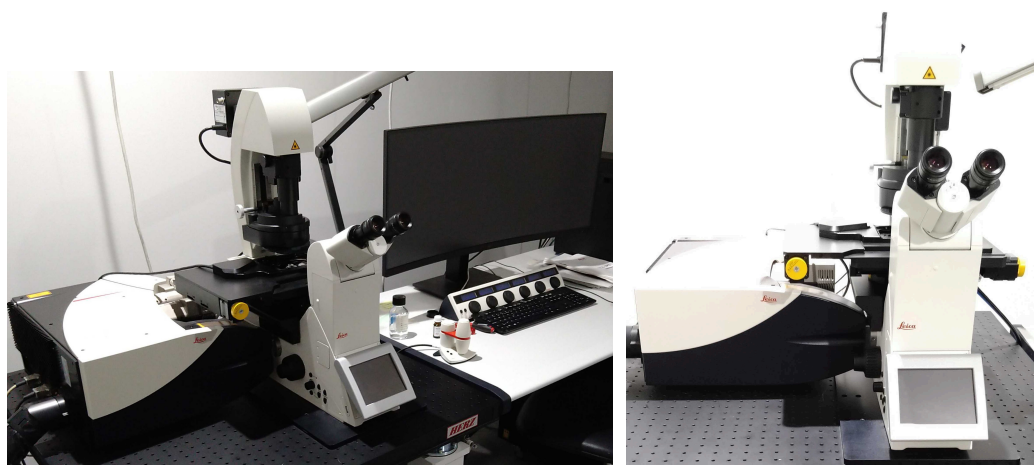


図 2.8 倒立型蛍光共焦点顕微鏡

#### iv) フローサイトメーター

以下に、実験に使用したフローサイトメーターの仕様と図を示す。

製品名：CELL LAB QUANTA™ SC

製造会社：ベックマン・コールター

検出方式：ハイブリッド方式(光と電気の同時検出)

粒度分布分解能：0.05 $\mu$ m

測定範囲：2~40 $\mu$ m

サンプルフローレート：4.17~100 $\mu$ L/分



図 2.9 フローサイトメーター

#### v) PCR thermal cycler

以下に、実験に使用した PCR thermal cycler の仕様と図を示す。

製品名：TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice

製造会社：TaKaRa

加熱・冷却方式：ペルチェ素子

温度設定範囲：4~99 $^{\circ}$ C(0.1 $^{\circ}$ C単位)

加熱・冷却速度：最大 3.0 $^{\circ}$ C/秒、最大 2.0 $^{\circ}$ C/秒



図 2.10 PCR サーマルサイクラー

### 2.1.3 プラスミド DNA とその構築方法

プラスミドは環状構造をした DNA 分子であり、細胞内で染色体 DNA とは独立して存在することができる(図 2.11)。そして、プラスミドは、複製開始点を有し、自立的に増殖することができる。多くのプラスミドは、主として細菌において見出されている。また、同一プラスミドが1つの細胞内に複数存在することがあり、この時のプラスミドの分子数をコピー数という。遺伝子工学において、多コピー数のプラスミドは遺伝子やタンパク質を増幅させるためのベクター(運び屋)として広く利用されている。プラスミド DNA 上には、1つかそれ以上の遺伝子が存在し、そのプラスミドの宿主は抗生物質耐性、病原性など様々な特徴を示す。

本研究ではこのプラスミド DNA を利用し、生細胞内における PNKP の詳細な動態解析を行った。今回は、細胞内で GFP-PNKP 融合タンパク質を発現させるためのプラスミド DNA(pEGFP-PNKP) とアミノ酸レベルでの機能解析のために GFP-PNKP 変異体発現用プラスミド DNA を作製した。さらに、核小体タンパク質 Fiblliralin と DNA 一本鎖切断修復タンパク質 XRCC1、DNA 二本鎖切断修復タンパク質 XRCC4 とイソギンチャクモドキから単離された赤色蛍光タンパク質(RFP)の融合タンパク質発現プラスミド DNA の作製も行った。

以下にそれらのベクターの詳細と作製過程を示す。

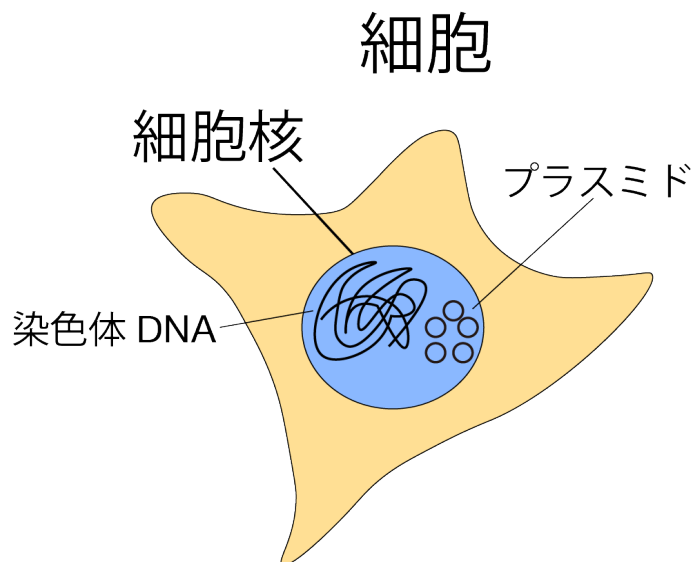


図 2.11 細胞内におけるプラスミド



### i) pEGFP-C1

まず、GFP-PNKPの融合タンパク質を発現するプラスミドDNAの構築を行った。バックボーンとして pEGFP-C1 ベクター(Clontech 図 2.12) を用いた。使用するEGFP(Enhanced Green Fluorescence Protein) は、オワンクラゲ由来の GFP の変異体であり、GFP の蛍光をより明るくするために改良されたものである。塩基配列としては 190 箇所以上の 変異が導入されており、488nm の波長で励起することで、最大蛍光波長 507nm の緑色蛍光を発する。

本研究では、PNKP 蛍光を高感度に検出するため、蛍光強度が強くなるように改良された EGFP を使用した。

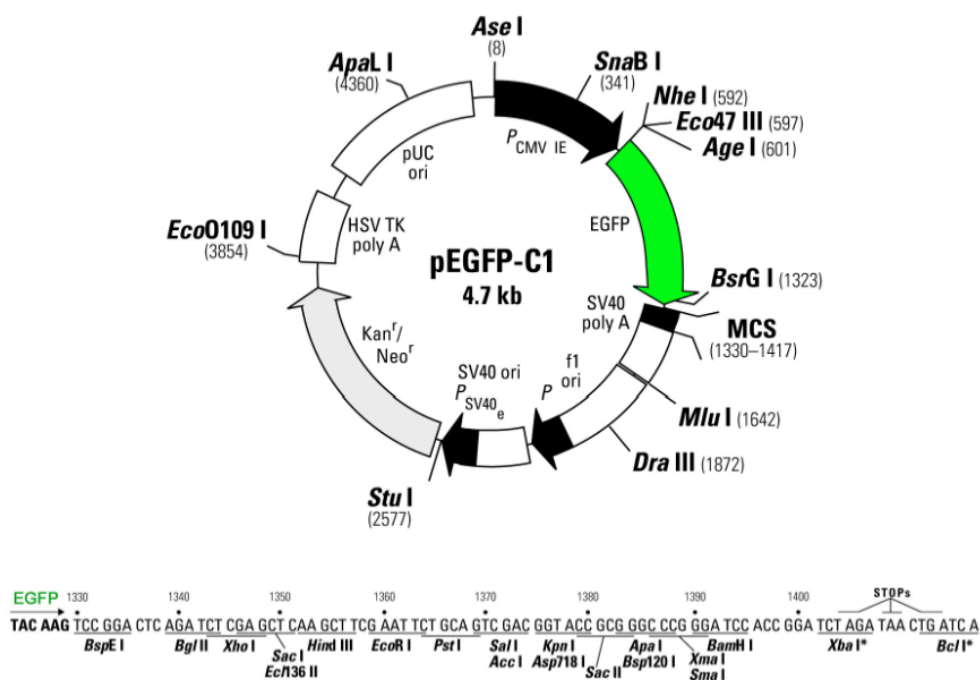


図 2.12 pEGFP-C1 ベクター [Clontech より取得]

### CMV promoter

CMV(Cytomegarovirus) とは、ヒトに感染する通常無害のウイルスである。CMV promoter は、最も広く使用されているプロモーターであり、大部分の細胞において非常に強力な遺伝子プロモーターとして働くが、ヒトやマウスの幹細胞内では活性が低下する。

### MCS(Multiple Cloning Site)

MCS とは、様々な制限酵素サイトを一箇所に集中させた部位のことである。比較的使用頻度の高い制限酵素が集中している。ここに目的の遺伝子を挿入することで融合タンパク質などが発現するように設計されていることが多い。

### SV40 polyA/HSV TK polyA

polyA は転写効率を増大させる効果があり、SV40polyA は MCS に挿入される外来遺伝子、HSV TK polyA は Neomycin 耐性遺伝子の転写効率を増大させる。

### SV40 promoter

SV40 はサルなどの霊長類の細胞に感染するウイルスであり、SV40 promoter は哺乳類細胞内で強いプロモーター活性を示す。

### Kanamycin/Neomycin resistance

Kanamycin 耐性遺伝子は、SV40 promoter 制御下で発現すると、宿主細胞内において Neomycin 耐性遺伝子として機能する。Ampicillin や Kanamycin などの抗生物質は、原核生物(大腸菌など) のみに対して増殖阻害作用を持つ。一方、Neomycin は原核生物だけでなく、真核生物に対しても増殖阻害作用を持つため、真核細胞の薬剤選択に用いられる。

### pUC origin

pUC origin はプラスミドの複製起点として、大腸菌内でプラスミドを維持するために必要とされる。

## ii) pEGFP-PNKP

次に、EGFP と PNKP の融合遺伝子を作製するために、制限酵素処理によって特定の塩基配列を認識して切断(digestion)を行った。PNKP フラグメントについてはU2OS 細胞の PNKP 遺伝子配列を PCR 法により増幅、アガロースゲル電気泳動法により分離・精製した。それぞれ、pEGFP-C1 ベクターの切断には BglII と SalI を用いた。その後、In-fusion 法によって、PNKP フラグメントと pEGFP-C1 ベクターの間で遺伝子の組換えを起こさせ、pEGFP-PNKP ベクター(図 2.13) を作製した。導入確認には、アガロースゲル電気泳動によるベクター全長のサイズ確認と DNA シーケンシングによる配列確認を行なった。さらに、実際に細胞に遺伝子導入し GFP 蛍光が観察できるか、また細胞内局在の確認を行なった。

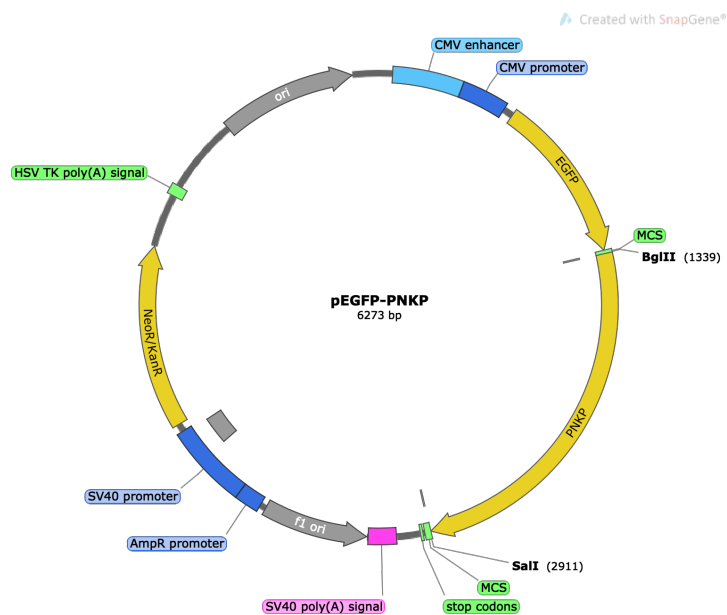


図 2.13 pEGFP-PNKP ベクター(Snap gene viewer により作成)



また、PNKP 遺伝子の配列が正常であるか確かめるため、シーケンス解析を行った。BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を利用して目的の遺伝子であることが確認できた。図 2.14 に PNKP 遺伝子の配列を示す。開始コドン ATG から始まり、終止コドン TGA を含めた 1566 ヌクレオチドから構成されている。

```
ATGGGCGAGG TGGAGGCCCC GGGCCGCTTG TGGCTCGAGA GCCCCCCTGG GGGAGCGCCC
CCCATCTTCC TGCCCTCGGA CGGGCAAGCC CTGGTCCTGG GCAGGGGACC CCTGACCCAG
GTTACGGACC GGAAGTGCTC CAGAACTCAA GTGGAGCTGG TCGCAGATCC TGAGACCCGG
ACAGTGGCAG TGAAACAGCT GGGAGTTAAC CCCTCAACTA CCGGGACCCA GGAGTTGAAG
CCGGGGTTGG AGGGCTCTCT GGGGGTGGGG GACACACTGT ATTTGGTCAA TGGCCTCCAC
CCACTGACCC TGCGCTGGGA AGAGACCCGC ACACCAGAAT CCCAGCCAGA TACTCCGCCT
GGCACCCCTC TGGTGTCCCA AGATGAGAAG AGAGATGCTG AGCTGCCGAA GAAGCGTATG
CGGAAGTCAA ACCCCGGCTG GGAGAAGTTG GAGAAGTTGC TAGTGTTTAC CGCAGCTGGG
GTGAAACCCC AGGGCAAGGT GGCTGGCTTT GATCTGGACG GGACGCTCAT CACCACACGC
TCTGGGAAGG TCTTTCCAC TGGCCCCAGT GACTGGAGGA TCTTGTACCC AGAGATTCCC
CGTAAGCTCC GAGAGCTGGA AGCCGAGGGC TACAAGCTGG TGATCTTAC CAACCAGATG
AGCATCGGGC GCGGGAAGCT GCCAGCCGAG GAGTTCAAGG CCAAGGTGGA GGCTGTGGTG
GAGAAGCTGG GGGTCCCCTT CCAGGTGCTG GTGGCCACGC ACGCAGGCTT GTACCGGAAG
CCGGTGACGG GCATGTGGGA CCATCTGCAG GAGCAGGCCA ACGACGGCAC GCCCATATCC
ATCGGGGACA GCATCTTTGT GGGAGACGCA GCCGGACGCC CGGCCAACTG GGCCCCGGGG
CGGAAGAAGA AAGACTTCTC CTGCGCCGAT CGCCTGTTTG CCCTCAACCT TGGCCTGCCC
TTCGCCACGC CTGAGGAGTT CTTTCTCAAG TGGCCAGCAG CCGGCTTCGA GCTCCCAGCC
TTTGATCCGA GGACTGTCTC CCGCTCAGGG CCTCTCTGCC TCCCCGAGTC CAGGGCCCTC
CTGAGCGCCA GCCCGGAGGT GGTGTGTCGA GTGGGATTCC CTGGGGCCGG GAAGTCCACC
TTTCTCAAGA AGCACCTCGT GTCGGCCGGA TATGTCCACG TGAACAGGGA CACGCTAGGC
TCCTGGCAGC GCTGTGTGAC CACGTGTGAG ACAGCCCTGA AGCAAGGGAA ACGGGTCCGC
ATCGACAACA CAAACCCAGA CGCCGCGAGC CGCGCCAGGT ACGTCCAGTG TGCCCGAGCC
GCGGGCGTCC CCTGCCGCTG CTTCCCTTTC ACCGCCACTC TGGAGCAGGC GCGCCACAAC
AACCGGTTTC GAGAGATGAC GGAATCCTCT CATATCCCCG TGTGAGACAT GGTCATGTAT
GGCTACAGGA AGCAGTTCGA GGCCCCAACG CTGGCTGAAG GCTTCTCTGC CATCCTGGAG
ATCCCGTTCC GGCTATGGGT GGAGCCGAGG CTGGGGCGGC TGTACTGCCA GTTCTCCGAG
GGCTGA
```

図 2.14 ヒト PNKP の遺伝子配列

### iii) mCherry2-C1

まず、mCherry2-Fiblliralin/ XRCC1/XRCC4 の融合タンパク質を発現するプラスミド DNA の構築を行った。バックボーンとして mCherry2-C1 ベクター(Addgene、図 2.15) を用いた。使用する mCherry は、イソギンチャクモドキの一種に由来する RFP (Red Fluorescent Protein)の変異体であり、RFP の蛍光をより明るくするために改良されたものである。540-590nm の波長で励起することで、最大蛍光波長 550-650nm の赤色蛍光を発する。

本研究では、融合タンパク質の蛍光を高感度に検出するため、蛍光強度が強くなるように改良された mCherry2 を使用した。

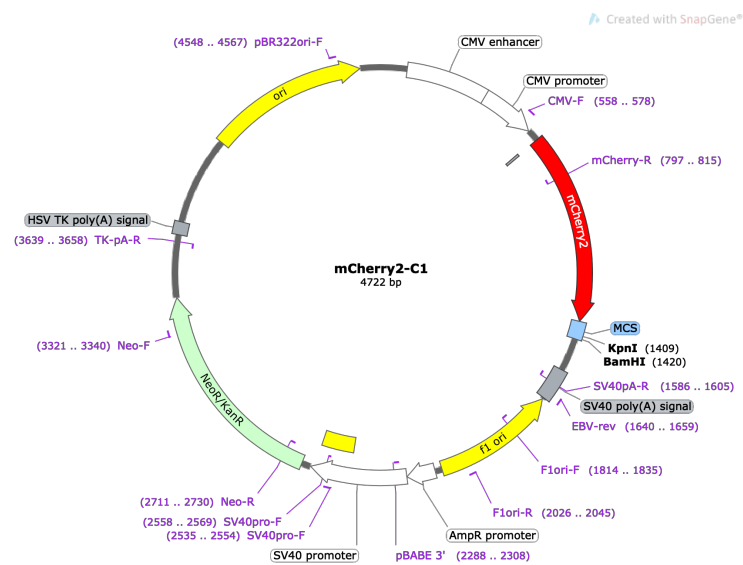


図 2.15 mCherry2-C1 ベクター [Addgene より取得]

#### iv) mCherry2-Fiblliralin

次に、mCherry(RFP: Red Fluorescence Protein)と Fiblliralin の融合遺伝子を作製するために、制限酵素処理によって特定の塩基配列を認識して切断(digestion)を行った。Fiblliralin フラグメントについては U2OS 細胞の Fiblliralin 遺伝子配列を PCR 法により増幅、アガロースゲル電気泳動法により分離・精製した。mCherry2-C1 ベクターの切断とには KpnI と BamHI を用いた。その後、In-fusion 法によって、PFiblliralin フラグメントと mCherry2-C1 ベクターの間で遺伝子の組換えを起こさせ、mCherry2- Fiblliralin ベクター(図 2.16) を作製した。導入確認には、アガロースゲル電気泳動によるベクター全長のサイズ確認と DNA シークエンシングによる配列確認を行なった。さらに、実際に細胞に遺伝子導入し RFP 蛍光が観察できるか、また細胞内局在の確認を行なった。Fiblliralin タンパク質は核小体タンパク質であり、核小体特異的に局在するため、PNKP の核小体内局在を確認するため第 3 章の実験で使用した。

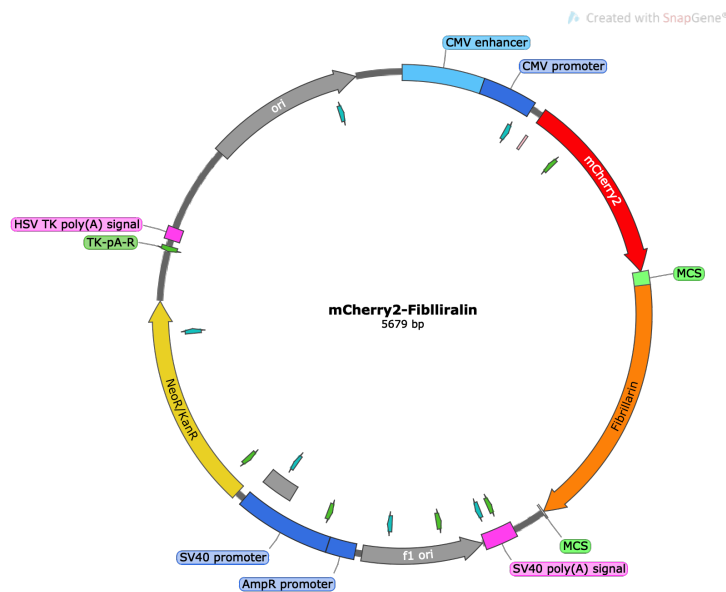


図 2.16 mCherry2-Fiblliralin ベクター [Snapgene により作製]

## v) mCherry2-XRCC1

次に、mCherry(RFP: Red Fluorescence Protein)と XRCC1 の融合遺伝子を作製するために、制限酵素処理によって特定の塩基配列を認識して切断(digestion)を行った。XRCC1 フラグメントについては U2OS 細胞の XRCC1 遺伝子配列を PCR 法により増幅、アガロースゲル電気泳動法により分離・精製した。mCherry2-C1 ベクターの切断には KpnI と BamHI を用いた。その後、In-fusion 法によって、XRCC1 フラグメントと mCherry2-C1 ベクターの間で遺伝子の組換えを起こさせ、mCherry2-XRCC1 ベクター(図 2.17) を作製した。導入確認には、アガロースゲル電気泳動によるベクター全長のサイズ確認と DNA シークエンシングによる配列確認を行なった。さらに、実際に細胞に遺伝子導入し RFP 蛍光が観察できるか、また細胞内局在の確認を行なった。さらに、第 4 章の実験で PNKP との結合が欠失した XRCC1 T519A 変異体発現ベクターをミュータジェネシス PCR 法により作製した。変異体も同様に DNA 配列の確認を行った。XRCC1 タンパク質は DNA 一本鎖切断修復に関わるタンパク質であり、T519A を変異体では PNKP との結合を欠失する。これらのベクターは DNA 損傷部位への PNKP の集積と XRCC1 との結合の関係を解析するために第 4 章の実験で使用した。

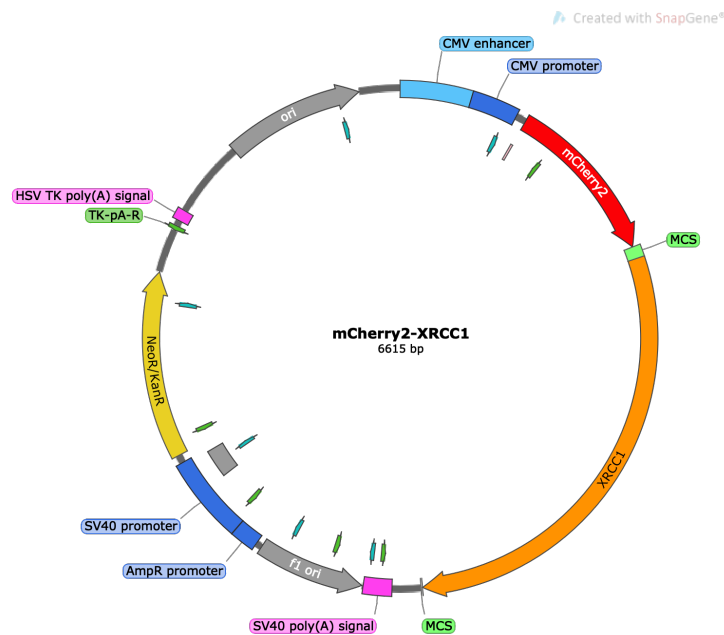


図 2.17 mCherry2-XRCC1 ベクター [Snapgene により作製]

## vi) mCherry2-XRCC4

次に、mCherry(RFP: Red Fluorescence Protein)と XRCC4 の融合遺伝子を作製するために、制限酵素処理によって特定の塩基配列を認識して切断(digestion)を行った。XRCC4 フラグメントについては U2OS 細胞の XRCC4 遺伝子配列を PCR 法により増幅、アガロースゲル電気泳動法により分離・精製した。mCherry2-C1 ベクターの切断には KpnI と BamHI を用いた。その後、In-fusion 法によって、XRCC4 フラグメントと mCherry2-C1 ベクターの間で遺伝子の組換えを起こさせ、mCherry2-XRCC4 ベクター(図 2.18) を作製した。導入確認には、アガロースゲル電気泳動によるベクター全長のサイズ確認と DNA シークエンシングによる配列確認を行なった。さらに、実際に細胞に遺伝子導入し RFP 蛍光が観察できるか、また細胞内局在の確認を行なった。さらに、第 4 章の実験で PNKP との結合が欠失した XRCC4 T233A 変異体発現ベクターをミュータジェネシス PCR 法により作製した。変異体も同様に DNA 配列の確認を行った。XRCC4 タンパク質は DNA 二本鎖切断修復に関わるタンパク質であり、T233A を変異体では PNKP との結合を欠失する。これらのベクターは DNA 損傷部位への PNKP の集積と XRCC4 との結合の関係を解析するために第 4 章の実験で使用した。

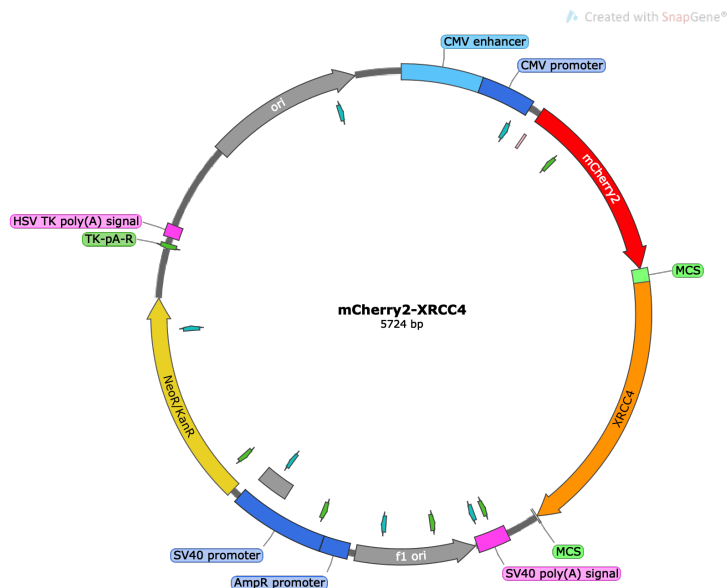


図 2.18 mCherry2-XRCC4 ベクター [Snapgene により作製]

#### 2.1.4 細胞へのプラスミド DNA の導入(トランスフェクション)

今回使用した蛍光タンパク質発現ベクターには、目的遺伝子と Neomycin 耐性遺伝子がそれぞれ組み込まれている。そして、基本的に遺伝子導入したベクターは約 1 週間で細胞内から抜けていき、遺伝子の発現が消失すると言われている。つまり、遺伝子導入後に選択薬剤を使用し続けることで、目的遺伝子が細胞の染色体上に導入(ランダムインテグレーション)された細胞のみを選択的に回収することができる(Stable Transfection)。これとは異なり、遺伝子導入後に選択薬剤を使わずに実験で使用する場合は一過性の遺伝子導入細胞といえる(Transient Transfection)。

本研究では、これら 2 種類の細胞の作製を試み、実験に応じてそれぞれを使い分けて実験を行った。

##### i) 一過性遺伝子導入細胞(Transient transfection) の取得

本研究においては、代表的な遺伝子導入法の一つであるリポフェクション法を用いて遺伝子導入を行った。基本原理は、負の電荷を持つ DNA を正の電荷を持つ陽イオン性リポソームと呼ばれる膜で包み込み、エンドサイトーシス現象によって、細胞表面から細胞内に DNA を取り込ませるというものである(図 2.19)。

リポフェクションには Lipofectamine® 2000(Invitrogen) を用いた。具体的には以下の方法で行った。今回のプロトコルは 6cm ディッシュでのものである。

まず、細胞の準備として、リポフェクションの当日に細胞数が全体の 6 割となるように、前日か前々日に細胞数を調節しつつ継代を行う。

当日培養細胞の接着を確認後、Lipofectamine® 2000 の調整を行う。1.5ml のマイクロチューブを 2 本用意する。1 本目は 250 $\mu$ l の Opti-MEM® Medium と 7.5 $\mu$ l の Lipofectamine® 2000 を混合する。2 本目は 250 $\mu$ l の Opti-MEM® Medium と導入する DNA が 1 $\mu$ g となるように混合し、5 分間静置し DNA をなじませる。その後、2 つの調整液を緩やかに混合し、15 分間静置する。静置後、インキュベーターから細胞を取り出し、培地を取り除いた後、混合液を培養細胞全体に満遍なく滴下し 1 分程静置した後、約 4ml の Opti-MEM® Medium+10%FBS(Fetal Bovine Serum : FBS) を加え、37°C、5%CO<sub>2</sub> の条件でインキュベートした。細胞種にもよるが、リポフェクション法は一般的に導入効率が 60%程で、12 時間程度の培養で遺伝子導入が完了すると言われている。なお、一過性発現細胞の実験には、リポフェクション 2 日後の細胞を用いた。

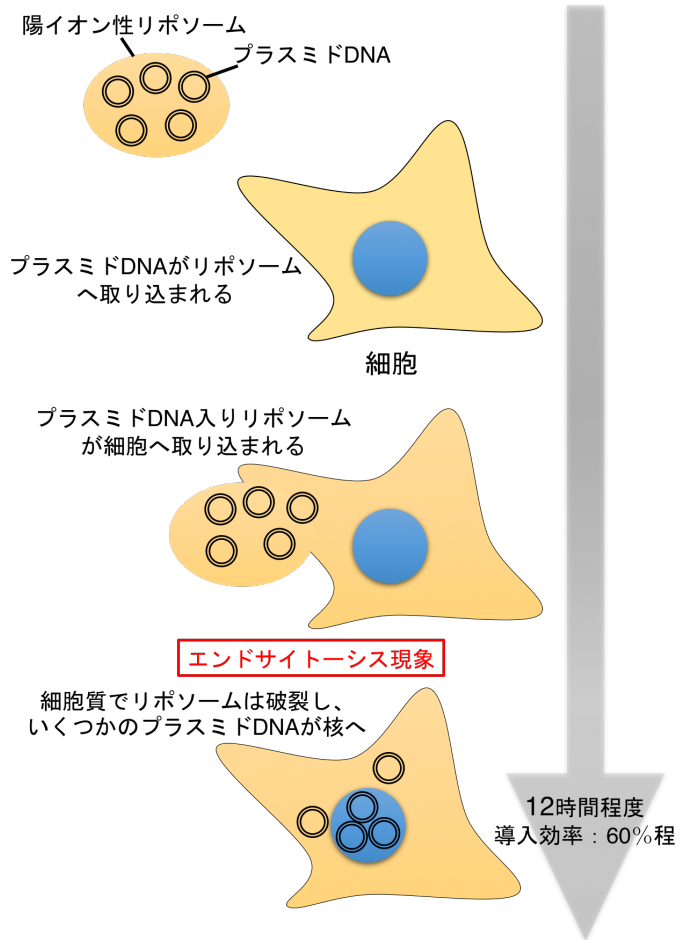


図 2.19 リポフェクション法の原理

## ii) 安定遺伝子発現細胞株(Stable Transfection) の樹立

GFP-PNKP 安定発現細胞株の作製には、G418(Geneticin418、ナカライテスク) を用いた。G418 は、タンパク質合成のうち伸長反応を阻害する。具体的には、真正細菌の 70S リボソームによるタンパク質合成と真核生物の 80S リボソームによるタンパク質合成を阻害する薬剤である。また、Neomycin 耐性遺伝子を持つ細胞であれば生き残ることができる。今回使用したベクターは Neomycin 耐性遺伝子を含んでいるため、正しく遺伝子導入が行われた場合は、G418 耐性になるはずである。

リポフェクション 1 日後の細胞を、5ml の PBS で 2 度洗浄し、トリプシン処理によって剥がした。そして、適当な培地を 2ml 程加え、そのまま全量を 10cm ディッシュへ播種した。その後、G418(50mg/ml) を 160 $\mu$ l 滴下し、37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> の条件で培養した。G418 の濃度は、通常の細胞がほぼ 100%死滅する濃度である 0.8mg/ml とした。その後、10cm ディッシュ当たりの細胞数が、2000 個(U2OS) となるようにプレATINGし、10ml の培地と 160 $\mu$ l の G418 を加えた。約 1 週間後、コロニーの形成を確認しピックアップした後、引き続き G418 入りの培地を用いて培養を続けた。細胞数が一定以上に増えた後、蛍光観察によって GFP の蛍光を確認した。また、Western Blotting による GFP と GFP-PNKP 融合タンパク質の発現解析を行った。



### 2.1.5 バイオイメージングと蛍光タンパク質

“バイオイメージング”とは生体内でのリアルタイムイメージングのことである。1970年代に染色法の発展型としてバイオイメージング研究は始まり、現在までその研究は続いている。例えば、放射線を利用したコンピュータ断層撮影(Computed Tomography: CT)、放射線同位元素を用いた陽電子放射断層撮像法(Positron Emission Tomography: PET) から核磁気共鳴画像(Magnetic Resonance Imaging: MRI) など、ヒトが生きたままの状態から外部から細胞や生体分子をイメージングすることが出来る、様々なバイオイメージング技術が現在も世界中で利用されている[63]。

バイオイメージング技術のメリットは、生きている状態の細胞、生体組織あるいは *in vivo* において生体分子(酵素、受容体、DNA、糖など)を直接捉えることができるということである[64]。生命科学研究の長い歴史の中で、“生細胞内”で目的分子の変化量や活性などを時間と場所を特定して検出する方法は存在しなかった。そして、バイオイメージング技術は、その解明することが不可能だった現象を解明するための新たな技術として、注目を浴びている。

“バイオイメージング”の中でも、特に蛍光タンパク質を利用したイメージングは、空間分解能や時間分解能に優れ、高感度かつ簡便に作成でき、経済面でも優れている。また、一度細胞内に導入するだけで、“生細胞”そのものの挙動を観察することができることから新しいイメージング技術として注目されている。

2008年にボストン大学下村博士、コロンビア大学 Chalfie 博士、カリフォルニア大学 Tsien 博士の3名は、「緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein: GFP)の発見、発現、そして開発」によりノーベル賞を受賞した[65、66]。GFPは1962年にオワンクラゲから発見された分子量約27kDaのタンパク質であり、青色光を吸収して緑色光を発する性質を持つ。そして、GFPやRFP(Red Fluorescent Protein)などの蛍光タンパク質は生物化学の分野では必需のツールとして世界中で使われている。

また、これらの蛍光タンパク質がローダミンなどの蛍光有機小分子より“バイオイメージング”において優れている理由は、発光過程で基質や補因子を必要とせず、自己蛍光が可能であることが挙げられる。よって、細胞からのタンパク質抽出→化学修飾による蛍光色素ラベル→細胞内注入などの蛍光有機小分子で行う過程をスキップすることができるというメリットを持っている。つまり、細胞内で、標的分子との融合タンパク質を発現させるだけでイメージングが可能である。

本研究では、GFPやRFPなどの蛍光タンパク質とPNKPなどの標的タンパク質の融合タンパク質を生細胞内で発現させることで、DNA損傷応答の時空間的制御機構をバイオイメージングにより可視化し、その詳細を解析した。

### 2.1.6 RNA 干渉による目的タンパク質の発現抑制

RNA 干渉 (RNAi: RNA interference)とは、二本鎖 RNA が複数のタンパク質と複合体を作り、相同な塩基配列をもつメッセンジャーRNA(mRNA)と特異的に対合・切断することで、遺伝子の発現を抑える現象である。1998年に線虫の発生学者である Craig Mello 博士と Andrew Fire 博士が報告した現象で、2006年のノーベル生理学・医学賞を受賞した。RNA 干渉は、生体内においてウイルス感染に対する防御機構や、ゲノム上を転移する動く遺伝子を抑制するなど、ゲノムの安定性を保つ上で重要な役割を担うことが知られている。そして RNA 干渉は、特定の遺伝子の発現を人為的に抑制する手法として、遺伝子機能解析のためのツールとしても幅広く使用されている。

本研究では、21塩基の二本鎖 RNA (siRNA: short interfering RNA)を細胞に遺伝子導入することで、細胞内で発現する特定の遺伝子の発現量を抑制した。細胞内に導入された siRNA は、Argonoute タンパク質の RNA 切断活性(Slicer 活性)により一方の RNA 鎖の中央が切断され一本鎖 RNA へと変換される。残った一本鎖 RNA と Argonoute タンパク質の複合体は RISC と呼ばれる。そして、一本鎖 siRNA は標的 RNA への対合が可能となり、対合された mRNA が分解を受けることにより特定遺伝子の発現抑制が可能となる[67-69]。

本研究では、Lipofectamine RNAiMAX(Invitrogen)を用いて siRNA の遺伝子導入を行った。siRNA の最終濃度は 50nM とし、遺伝子導入後 36-72 時間後の細胞を用いて実験を行った。今回使用した siRNA の配列は第 2.1.10 章の表 6 に示す。

## 2.1.7 CRISPR/Cas9 を用いた PNKP ノックアウト(KO) 細胞株の作製

### i) CRISPR/Cas9

ゲノム編集技術は、人工ヌクレアーゼ(特異的な DNA 配列を認識・切断する)を利用して、細胞の持つ DNA 中の標的配列を探し出して切断、そして、目的遺伝子を欠損させたり(ノックアウト)、他の遺伝子を挿入する技術である(図 2.20)。このシステムを発見したカリフォルニア大学バークレー校の Doudna 博士とウメオ大学の Charpentier 博士は 2020 年にノーベル化学賞を受賞した。標的配列への特異性が極めて高いことから、2 万種類ある遺伝子の中からたった 1 つの目的遺伝子を探し出して編集することができる。よって、特定遺伝子の機能を直接的に解析できることから、世界中で急速に広がり、様々な分野で広く用いられている[71]。

CRISPR(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat)/Cas9(Crisper associated protein 9) システムは、ZFN(Zinc Finger Nucleases) [72]、TALEN(Transcription Activator-Like Effector Nuclease) [73]に次ぐ第三世代のゲノム編集技術として知られている。元々は、真正細菌や古細菌の獲得免疫(外来 DNA の排除機構)である CRISPR/Cas システムの一部を応用して作られた[74]。

CRISPR/Cas システムでは、ウイルス(バクテリオファージ)などを介して外部から侵入してきた DNA を断片化、CRISPR 領域とよばれるゲノム領域へと取り込む(図 2.21 a①)。さらに、取り込んだ DNA 配列を鋳型として短鎖の RNA(CRISPR RNA : crRNA) を合成(図 2.21 a②)、tracrRNA(trans-crRNA) とよばれるもう 1 つの短鎖 RNA と複合体を形成することで(図 2.21 a③)、再び同一ウイルスが侵入した場合に標的 DNA を認識して Cas を呼び込み・切断する。内在の CRISPR/Cas システムでは、外来 DNA の取り込みや、crRNA のプロセッシング、tracrRNA との複合体の形成など、多くのステップを必要とし、また多数の Cas タンパク質が関与する。

しかし、ゲノム編集に適用するには、標的 DNA は自らデザインした合成オリゴ、短鎖 RNA は crRNA と tracrRNA をハイブリッドさせたキメラ RNA(guide RNA : gRNA) で代用が可能である(図 2.21 b)。また、Cas タンパク質に関しても、Cas9 タンパク質の一種類のみでよい。標的配列に相補的な配列を含む gRNA が Cas9 エンドヌクレアーゼ(分解酵素)を標的配列まで誘導し、Cas9 が狙った DNA 鎖を切断する。その際に、図 2.20 に示すように目的の遺伝子のノックアウトや改変(ノックインなど)も可能となる。

CRISPR/Cas9 の塩基認識機構は RNA-DNA の塩基対形成であり、1 つの gRNA による塩基認識で二本鎖切断を導入する。gRNA が認識する塩基配列は 20 塩基程であり、ゲノム上の塩基配列にはその 3' 末端側に PAM(Protospacer Adjacent Motif)とよばれる配列が必要である。この PAM 配列が CRISPR/Cas の標的配列の制限になりうるが、現在広く用いられている化膿レンサ球菌(*Streptococcus pyogenes*)由来の

Cas9(SpCas9) が認識する PAM 配列は 5' -NGG-3' (N は任意の塩基) であり、それほど大きな制約にならない[75]。

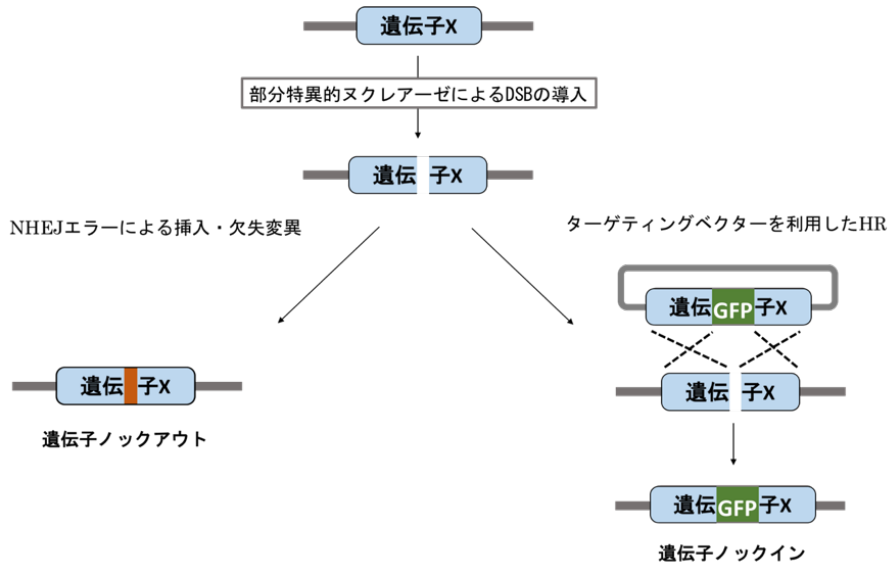


図 2.20 ゲノム編集技術の原理[70]

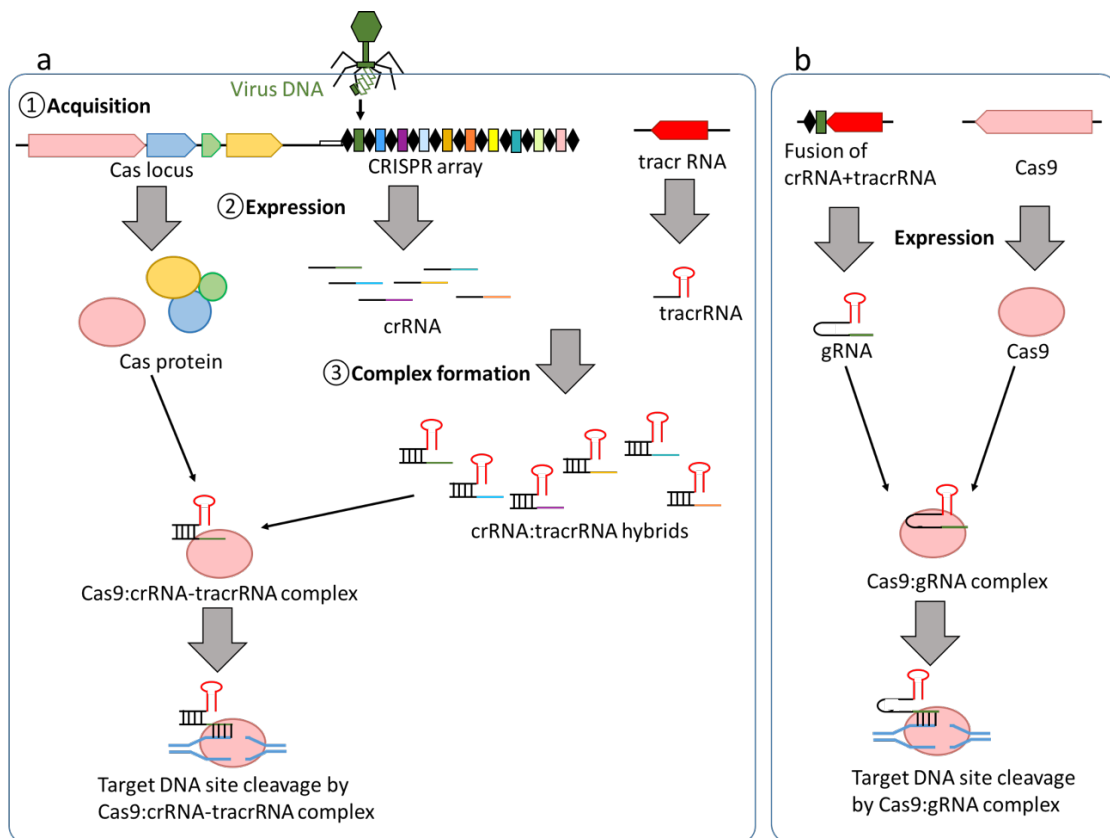


図 2.21 CRISPR/Cas9 システム[70]

## ii) PNKP ノックアウト細胞株の樹立

既往の研究において、遺伝病原因遺伝子の機能解析は一般的に患者細胞を用いて行われる。しかし、DNA 損傷応答・修復経路には PNKP 以外にも多くの遺伝子が関わる。そのため、患者細胞と正常細胞など、細胞種による関連遺伝子の発現量や挙動の違い(バックグラウンドの違い)は、野生型 PNKP そのものの機能を解析する上で大きな障壁となる。そこで、細胞種による誤差を最小限にとどめた状態で機能解析を行うために、U2OS において、CRISPR/Cas9 システムを用いてゲノム編集を行い、PNKP 遺伝子をノックアウトした細胞株を作製した。

手順としては、DNA 一本鎖切断を誘導する Cas9 の変異体 Cas9 D10A を発現するプラスミド DNA、pSpCas9(BB) -2A-Puro(PX462)ベクターに PNKP の 2 種類の標的配列を導入した pX462-PNKP target1 と target2 を作製し、U2OS 細胞に 2.1.4 章のリポフェクション法によって導入した。その後も 2.1.4 章の安定発現株の作製法と同様に、ベクターに組み込まれている Puromycin 耐性遺伝子を利用し、選択薬剤を使用することで、ベクターが取り込まれた細胞のみを選択的に回収した。Puromycin 濃度は、通常の細胞がほぼ 100%死滅する濃度である 0.8mg/ml(U2OS) とした。その後、96-well plate の 1well 当たりの細胞数が 0.4 個となるように細胞をプレーティングし、約 2 週間後にコロニーの形成を確認後、ピックアップして拡大培養後、PNKP 遺伝子の発現解析を Western Blotting 法によって行った。そして、PNKP タンパク質の発現が消失したクローンに対して、PNKP 遺伝子のサイズ確認を、アガロースゲル電気泳動によって行った。野生型の PNKP 遺伝子の DNA サイズと比較し、フラグメントのサイズが明らかに小さくなっていたクローンに対して、DNA シークエンス解析を行い、ゲノム DNA(gDNA)の配列に欠損または変異が入り、野生型の PNKP を発現できなくなったクローンをノックアウト細胞株(PNKP<sup>-/-</sup>細胞)として実験に用いた。

## 2.1.8 薬品・溶液データ

本研究において使用した薬品、溶液の詳細を以下に示す。

表 1 SDS-PAGE 用のゲルの組成

Separating gel							Stacking gel		
	4.5%	6%	7%	8%	10%	12.5%		1回分	2回分
超純水	6.7ml	5.8ml	5.55ml	5.3ml	4.8ml	4.2ml	超純水	3.65ml	7.3ml
1.5M Tris HCl pH 8.8	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	2.5ml	1.5M Tris HCl pH6.8	630μl	1.3ml
40% Acryl Amid gel	1.1ml	1.5ml	1.75ml	2ml	2.5ml	3.1ml	40% Acryl Amid gel	630μl	1.3ml
10% SDS	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	10% SDS	50μl	100μl
10% APS	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	100μl	10% APS	50μl	100μl
TEMED	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	10μl	TEMED	5μl	10μl
Total	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml	10ml	Total	5ml	10ml

表 2 使用試薬の組成

10xPBS		10xTBS	
NaCl	1.37M	1M Tris HCl pH7.5	0.1M
KCl	27mM	NaCl	1.5M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81mM		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15mM		

PBS-T		TBS-T	
PBS	1M	TBS	1M
Tween	0.05%	Tween	0.05%

2xRIPA Buffer		4xSDS Sample Buffer	
1M Tris HCl pH8.0	100mM	1M Tris HCl pH6.8	200mM
NaCl	300mM	SDS	8%
EDTA	2mM	BPB	0.4%
Triton X-100	2%	Glycerol	40%
SDS	0.2%		
Sodiumdeoxycholate	0.2%		

TE Buffer		Tank Blot Buffer	
NaCl	1.37M	Tris	3g
KCl	27mM	Glycine	14.4g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	81mM	超純水	800ml
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	15mM	MeOH	200ml

## 2.1.9 抗体データ

本研究において使用した抗体データを以下に示す。

表 3 Western Blotting・蛍光免疫染色で使用した一次抗体

Antigen	Dilution (WB)	Dilution (IF)	Host	MW (kDa)	Company	cat#	Application
ATM	1:2000		M	250	Sigma Aldrich	A1106	WB
ATR	1:1000		R	250	BETHYL	A300-137A	WB
CHK1	1:1000			55	Santa Cruz	sc-8408	WB
CHK1-pS317	1:1000		R	55	Cell Signalling	D12H3	WB
CK2a	1:1000		M	38	Santa Cruz	sc-12738	WB
CK2a'	1:500		M	38	Santa Cruz	sc-514403	WB
Cyclin A2	1:1000		M	54	Cell Signalling	BF683	WB
DNA-PKcs	1:2000		R	400	abcam	Y393	WB
GAPDH	1:10000		M	38	EMD millipore	MAB374	WB
GFP	1:5000	1:1000	M	28	Nacalai Tesque	04363-24	WB+IF
H2AX-pS139	1:1000	1:1000	M	18	Merck Millipore	JBW301	WB+IF
KAP1	1:1000	1:1000	R	110	abcam	ab10483	WB+IF
KAP1-pS824	1:1000	1:1000	R	110	BETHYL	A300-767A-2	WB+IF
p53	1:3000	1:1000	M	53	Santa Cruz	sc-126	WB+IF
PCNA	1:500		R	32	Santa Cruz	sc-7907	WB
PNKP	1:1000		R	57	Novus	NBP1-87257	WB
PNKP-pT118	1:1000	1:1000	R	57	YM lab		WB+IF
RPA32	1:2000	1:1000	M	32	abcam	ab2175	WB+IF+FCM
RPA32-pS4/8	1:1000	1:1000	R	32	BETHYL	A300-245A	WB+IF
XRCC1	1:1000		M	95	Invitrogen	MA5-13412	WB
XRCC4	1:1000		R	54	YM lab		WB

MはMouse、RはRabbit由来であることを示す。また、WBはWestern Blotting、IFは免疫染色、FCMはフローサイトメトリー法を示す。

表 4 Western Blotting・蛍光免疫染色で使用した二次抗体

Antigen	Dilution (WB)	Host	Company	cat#	Application
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunoglobulins/HRP	1:2000	R	Dako	P0447	WB
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunoglobulins/HRP	1:3000	M	Dako	P0339	WB
Goat anti-Mouse IgG(H+L) Alexa Fluor Plus 488	1:1000	M	Invitrogen	A32723	IF
Goat anti-Rabbit IgG(H+L) Alexa Fluor 488	1:1000	R	Invitrogen	A11034	IF
Goat anti-Mouse IgG(H+L) Alexa Fluor Plus 594	1:1000	M	Invitrogen	A32742	IF
Goat anti-Rabbit IgG(H+L) Alexa Fluor Plus 594	1:1000	R	Invitrogen	A32740	IF

## 2.1.10 プライマー・siRNA データ

本研究において使用したプライマーと siRNA の配列を以下に示す。

表 5 実験で使用した Primer

プライマー名		DNA配列
PNKP	F	TACAAGTCCGGACTCAGATCTATGGGCGAGGTGGAGGCCCCCGGC
	R	CGGGCCCGCGGTACCGTCGACTCAGCCCTCGGAGAACTGGCAGTA
Fibrillarin	F	ATTCTGCAGTCGACGGTACCATGAAGCCAGGATTTCAGTCC
	R	TATCTAGATCCGGTGGATCCTCAGTTCTTCACCTTGGGGG
D1	F	CGGACTCAGATCTATGACACCAGAATCCCAGC
	R	GCTGGGATTCTGGTGCATAGATCTGAGTCCG
D2	F	GGGAAGAGACCCGCGGCTGGGAGAACTT
	R	AAGTTCTCCAGCCGCGGGTCTCTTCCC
D3	F	GCGGAAGTCAAACCCCTCCAGCCCTTGATC
	R	GATCAAAGGCTGGGAGGGGGTTTACTTCCGC
D4	F	CAGCCGGCTTCGAGTGAGTCGACGGTAC
	R	GTACCGTCGACTCACTCGAAGCCGGCTG
R35A	F	CCTGGTCTGGGCGCGGACCCCTGACC
	R	GGTCAGGGGTCCCGCCAGGACCAGG
R48A	F	GGACCGGAAGTGCTCCGCAACTCAAGTGGAGCTG
	R	CAGCTCCAATTGAGTTGCGGAGCACTCCGGTCC
del 137-142	F	ATGCTGAGCTGCCGTCAAACCCCGCTG
	R	CAGCCGGGGTTTGACGGCAGCTCAGCAT
K137A	F	AGATGCTGAGCTGCCGGCGAAGCGTATGCGGAAG
	R	CTTCCGCATACGCTTCGCGGCAGCTCAGCATCT
K138A	F	GCTGAGCTGCCGAAGGCGGTATGCGGAAGTC
	R	GACTTCCGCATACGCGCCTTCGGCAGCTCAGC
R139A	F	CTGAGCTGCCGAAGAAGGCTATGCGGAAGTCAAACC
	R	GGTTTGACTTCCGCATAGCCTTCTTCGGCAGCTCAG
R141A	F	CCGAAGAAGCGTATGGCGAAGTCAAACCCCGG
	R	CCGGGGTTTGACTTCGCCATACGCTTCTTCGG
K142A	F	GAAGAAGCGTATGCGGGCGTCAAACCCCGGCTGG
	R	CCAGCCGGGGTTTGACGCCCGCATACGCTTCTTC
S114A	F	GACCCGCACACCAGAAGCCAGCCAGA
	R	TCTGGCTGGGCTTCTGGTGTGCGGGTC
T118A	F	CCAGAATCCCAGCCAGATGCTCCGCCTGG
	R	CCAGGCGGAGCATCTGGCTGGGATTCTGG
T122A	F	CTCCGCCTGGCGCCCTCTGGTG
	R	CACCAGAGGGGCGCCAGGCGGAG
S126A	F	GCACCCCTCTGGTGCCCAAGATGAGAAG
	R	CTTCTCATCTTGGGCCACCAGAGGGGTGC
S143A	F	GCGTATGCGGAAGGCAAACCCCGGCTG
	R	CAGCCGGGGTTTGCCTTCCGCATACGC
S114D	F	AGACCCGCACACCAGAAGACCAGCCAGATACTCC
	R	GGAGTATCTGGCTGGTCTTCTGGTGTGCGGGTCT
T118D	F	CACCAGAATCCCAGCCAGATGATCCGCCTGGCAC
	R	GTGCCAGGCGGATCATCTGGCTGGGATTCTGGTG
PNKP KO Target1	F	CACCGCGGTCTCTTCCCAGCGCA
	R	AAACTGCGCTGGGAAGAGACCCGC
PNKP KO Target2	F	CACCGTCCCAGCCAGATACTCCGCC
	R	AAACGGCGGAGTATCTGGCTGGGAC
XRCC1 T519A	F	CGTATGCAGGCTCCGCGGATGAGAACACG
	R	CGTGTCTCATCCGCGGAGCCTGCATACG
XRCC4 T233A	F	CCGTGTACGACGAGAGTGCTGATGAGGAAAGTGAA
	R	TTCATTTCTCATCAGCACTCTCGTGTACACGG



表 6 実験で使用した siRNA

Name		Oligonucleotides ("d" indicates deoxyribonucleotide)	Target site (5'-3')
siCTRL	Sense		TAAGGCTATGAAGAGATAC Dharmacon, cat# D-001210-02-20
	Anti-sense		
siPNKP 3'-UTR Ver.1	Sense	CACAAUAAACGCUGUUUCUCC	CACAAATAACGCTGTTTCTCC
	Anti-sense	AGAAACAGCGUUUAUUGUGGA	
siPNKP 3'-UTR Ver.2	Sense	ACAAUAAACGCUGUUUCUCCUUG	ACAATAACGCTGTTTCTCCTTG
	Anti-sense	AGGAGAAACAGCGUUUAUUGUGG	
siXRCC1	Sense	GGCAGACACUUACCGAAAAUG	GGCAGACACTTACCGAAAA
	Anti-sense	UUUUCGGUAAGUGUCUGCCUU	
siXRCC1 3'-UTR	Sense	GAAGUAUGUGCUAUACACATT	GAAGTATGTGCTATACACA
	Anti-sense	UGUGUAUAGCACAUACUUCTT	
siXRCC4 3'-UTR	Sense	CUAUGUUUCUAUUCAUUUdCdT	CTATGTTTTCTATTCAATT
	Anti-sense	AAAUGAAUAGAAAACAUGdTdC	
siATM	Sense	UGGUGCUAUUUACGGAGCUdTdT	TGGTGCTATTTACGGAGCT
	Anti-sense	AGCUCGUAUUUAGCACCAdTdT	
siDNA-PKcs	Sense	AAAUGAUUCAGACUUUCACUGGAGGdTdT	AAATGATTCAGACTTTCCTGAGG
	Anti-sense	CCUCCAGUGAAAGUCUGAAUCAUUUdAdC	
siCK2 $\alpha$	Sense	GAUGACUACCAGCUGGUUCdTdT	GATGACTACCAGCTGGTTC
	Anti-sense	GAACCAGCUGGUAGUCAUCdTdT	
siCK2 $\alpha'$	Sense	CAGUCUGAGGAGCCGCGAGdTdT	CAGTCTGAGGAGCCGCGAG
	Anti-sense	CUCGCGCUCUCAGACUGdTdT	

## 2.2 実験方法

本研究の基本的な実験方法は、以下の図 2.22 の手順で進めた。

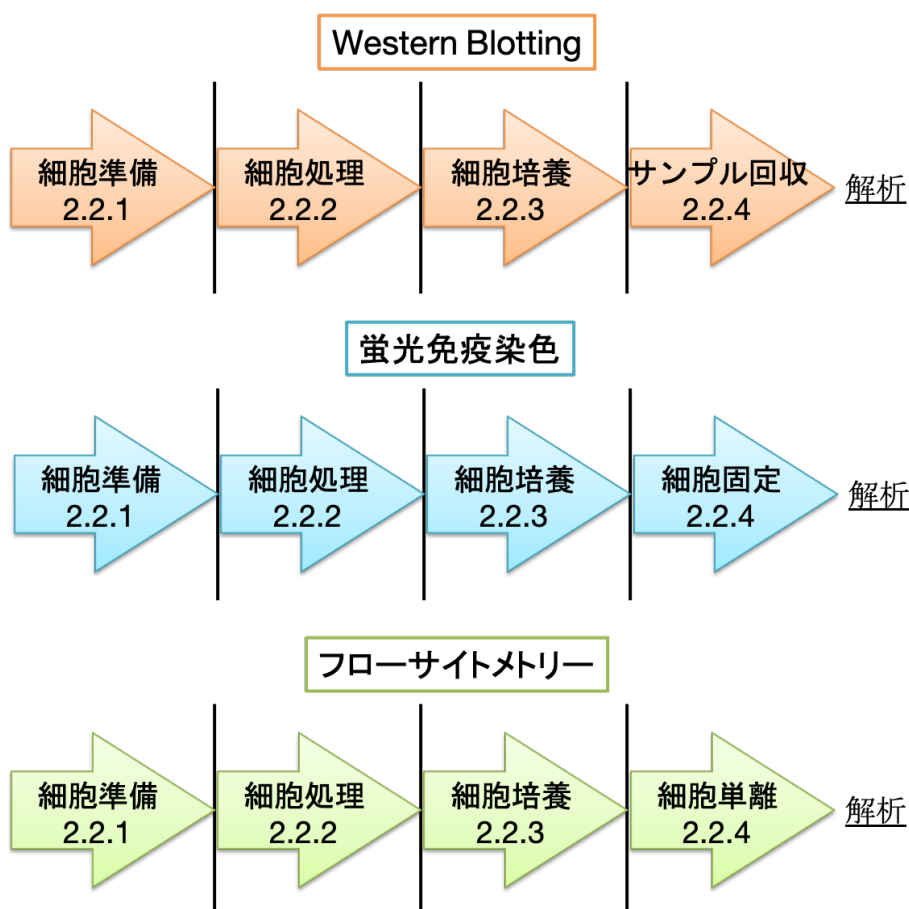


図 2.22 基本的な実験の手順：本研究の基本となる実験手順の模式図である。本研究では、実験内容に合わせて細胞の準備を行い、その後に放射線処理などの細胞ストレスを行った。その後、実験目的に合わせて細胞を培養後、回収し、Western Blotting や蛍光免疫染色、フローサイトメトリー法などで解析を行った。

放射線量は、ヒトの半数致死線量が 4Gy であることから、生体内で DNA 二本鎖切断などの DNA 損傷が発生する十分量だと考えられる 2~5Gy の線量を照射した。また、放射線処理後の培養時間については実験の目的に応じて 30 分~24 時間の間で適宜変更した。薬剤処理では、既往の研究を参考に十分な DNA 損傷またはゲノムストレスが確認できる使用濃度と処理時間を適宜調整し実験を進めた。

以下にこれらの手順の詳細を示す。

## 2.2.1 細胞準備

実験を行う前に必要な細胞の準備について述べる。

まずは、実験で用いた細胞について述べる。本研究で用いた細胞は、HCT116 細胞、U2OS 細胞、U2OS PNKP<sup>-/-</sup>細胞、HEK293 細胞の 4 種類であった。これらの細胞は、ヒト細胞であること、そして DNA 損傷応答経路の解析や DNA 損傷修復経路の解析で広く一般的に用いられていることを基準に選んだ。それぞれの細胞には特徴がある。HCT116 は染色体が 2 倍体に保たれていることから遺伝子ノックアウト研究によく使われている。また、細胞自体の大きさが小さいため、同じ 10cm ディッシュ内でも大量の細胞を培養することが出来る。しかし、上述した通り細胞が小さく、細胞核と細胞質の境界がわかりにくいため、細胞形態観察実験にはあまり適していない。U2OS は細胞構造が比較的はっきりしており(細胞核と細胞質がきれいに分かれている)、細胞自体も大きいいため、蛍光免疫染色などの細胞形態観察に適している。HEK293 は上記の細胞同様培養が容易であることと遺伝子導入効率が非常に高いことから、タンパク質を扱う実験に用いた。細胞の大きさは、HCT116 と同程度であり、U2OS などと比べると同サイズのディッシュで大量の細胞を培養することができる。また、PNKP<sup>-/-</sup>細胞は本研究において CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて U2OS 細胞から樹立した細胞であり、同一の遺伝的背景で PNKP の機能解析を行うために使用した。

実験内容に応じて siRNA を用いた一時的な遺伝子の発現抑制を行い、通常時と比較することで抑制した遺伝子の機能解析を行った。siRNA による遺伝子発現抑制も一過性ではあるが、ノックアウトと同様に同一の遺伝的背景で実験を行うことが出来るというメリットがある。

なお、本研究では遺伝子工学技術により多くの蛍光タンパク質融合タンパク質発現ベクターを作製した。これらのベクターを用いた実験では、実験の内容に応じて一過性遺伝子導入と安定発現株を使い分けて行った。

これらの細胞の処理方法は、大きく分けて 2 種類の細胞ストレス処理 (放射線処理と薬剤処理)に分けられる。また、どちらの場合も、未処理(Non-Treatment : NT)のサンプルを用意し、細胞ストレス処理を行った細胞と比較することで DNA 損傷に応答した細胞の応答を解析した。よって、準備の段階で、処理をする細胞 1 種類につきサンプルを 2 つずつ用意した。具体的には、実験開始日に 10cm ディッシュ内の細胞量が 7-8 割になるように直前の継代を行った。蛍光免疫染色実験の場合は 10cm ディッシュ内にスライドガラスを入れ、その上に細胞を適量播種し、細胞がスライドガラスに張り付いたら培地を 10mL 入れた。また必要に応じて、6-well plate にカバーガラスを入れ、その上に播種した細胞を用いて実験を行った。

その他の実験・解析手法に関しては、2.3 章参照のこと。

## 2.2.2 細胞処理

細胞は放射線処理や薬剤処理などの細胞ストレス処理を施した後に回収し、その後の実験に使用した。

放射線処理(Ionizing Radiation : IR)は、本学のコバルト照射施設(図 2.23) で依田功技術専門員の協力のもと行った。 $^{60}\text{Co}$  は 1 崩壊毎に 1.17MeV、1.33MeV のエネルギーを持つ  $\gamma$  線を 1 個ずつ放出することが知られている。また、今回はほとんどが筐体のアルミニウムに吸収されるが、最大エネルギー0.318MeV の  $\beta$  線も放射する放射線源である。詳細は、2.1.2 章において示した通りである。

放射線量の計測は、2019 年 7 月 10 日に行っており、当時の線量率は約 0.055Gy/s (補正時間 8.72 秒を含む)であった。そこから、コバルト 60 の半減期などを考慮し、本研究では 5Gy の放射線を照射する場合、線源からの距離は 30cm、132 秒の照射という条件で処理を行った。

放射線処理は、照射時の移動時間と、準備時間を考慮し、照射処理は 10 分で行ったものとした。



図 2.23 放射線照射施設での照射の様子

本研究では薬剤処理として、以下の薬剤を用いて実験を行った。

1) Camptothecin (CPT)

CPTは前述したとおり DNA 一本鎖切断と S 期特異的な DNA 二本鎖切断を誘導する薬剤である。使用濃度は、 $1\mu\text{M}$  で 4-8 時間の処理を行った。コロニーアッセイでは、 $5\text{-}20\text{nM}$  で 24 時間の処理を行った。

2) Hydroxyurea (HU)

HUは前述したとおり、複製フォーク停止による S 期での細胞周期同調と微弱な S 期特異的 DNA 二本鎖切断を引き起こす薬剤である。使用濃度は、 $2\text{mM}$  で 4-8 時間の処理を行った。コロニーアッセイでは、 $1\text{-}4\text{mM}$  で 24 時間の処理を行った。

3) Mitomycin C (MMC)

MMCは前述したとおり、DNA 架橋を引き起こす薬剤である。コロニーアッセイでは、使用濃度  $5\text{-}20\text{ng/mL}$ 、処理時間 24 時間として実験を進めた。

4) Hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

過酸化水素(Hydrogen peroxide)は、酸化ストレスにより細胞の DNA に多くの塩基損傷を与える。塩基損傷の修復と DNA 一本鎖切断の修復活性を解析するために用いた。使用濃度は、 $200\mu\text{M}$  で 2 時間の処理を行った。コロニーアッセイでは、 $100\text{-}200\mu\text{M}$  で 2 時間の処理を行った。

5) FEN1 inhibitor (FEN1i)

FEN1 は、DNA 複製の際に発生する岡崎フラグメントと呼ばれる一本鎖 RNA-DNA 複合体同士を結合する際に、末端の突起部分を切断する活性を持った酵素である。FEN1i は FEN1 の活性を阻害するため、DNA 複製中の岡崎フラグメントの結合が出来なくなる[76]。使用濃度は、 $10\mu\text{M}$  で 2 時間の処理を行った。コロニーアッセイでは、 $2.5\text{-}10\mu\text{M}$  で 2 週間の処理を行った。

6) Emetine (EME)

Emetine は真核生物のリボソームの 40S サブユニットに結合することでタンパク質合成を阻害する薬剤である[77]。また、岡崎フラグメントの合成を阻害することも報告されている[78]。使用濃度は、 $2\mu\text{M}$  で 2 時間の処理を行った。

### 2.2.3 処理後の培養

細胞処理後は実験の目的に応じて 30 分～24 時間、インキュベーター内(37℃、5%CO<sub>2</sub> の条件) で培養し、液体培地および細胞の温度を培養温度に落ち着かせた。

### 2.2.4 サンプル回収

上記の時間まで培養後、細胞をインキュベーター内から引き上げた。Western Blotting を行う場合、セルスクレーパーを用いて回収するか、トリプシン処理をして回収をした。蛍光免疫染色法の実験をする場合はスライドガラスごと細胞を回収し、コプリンジャーに移し換え、生理食塩水にて洗浄後、細胞固定処理を行った。カバーガラスを用いた実験の場合は、カバーガラス入りの Plate をそのまま回収し、同様の処理を行った。フローサイトサイトメトリー法を行う場合は、細胞をトリプシン処理により回収し、シングルセルの状態で行った。これらの手順は **2.3 章** で詳しく述べる。

## 2.3 解析手法

本実験では、以下の解析手法を用いて実験を行った。使用している薬品や溶液の組成は 2.1.8 章、抗体は 2.1.9 章、そしてプライマーと siRNA の配列は 2.1.10 章をそれぞれ参照。

### 2.3.1 Western Blotting 法 (WB)

Western Blotting 法は、タンパク質の発現状態や塩基の翻訳後修飾を解析するための手法として用いた。それぞれの処理をした細胞入りディッシュに 1ml の PBS を加え、セルスクレーパー、もしくはトリプシン処理で細胞を回収した。その後、1.5ml マイクロチューブに移した後、 $1.5 \times 10^3$  rpm ( $2 \times 10^2$  G)、4°C で 5 分間の遠心分離を行った。上清のみを除き、残った細胞ペレットに 50~200 $\mu$ l の RIPA Buffer(2.1 参照) + Protease Inhibiter(ナカライテスク:動物細胞抽出用 製品番号 25955) = (99 $\mu$ l : 1 $\mu$ l) の割合で調整したものを加えて懸濁し、氷上で 10 分以上放置した。その後、 $1.0 \times 10^4$  rpm ( $9.1 \times 10^3$  G)、4°C、30 分以上の遠心分離を行い、使用した RIPA Buffer + Protease Inhibiter の量(100~200 $\mu$ l) だけ上清を回収し、これをサンプルとして 4°C の冷蔵庫で保存した。すぐに Western Blotting を行わない場合は -30°C の冷凍庫に保存した。

次に、実験に用いるタンパク質を均一にするために、回収したサンプルのタンパク質濃度の測定を行った。濃度測定にはタカラバイオ株式会社の TaKaRa BCA Protein Assay Kit(製品コード T9300A) を使用した。手順に関しては付属説明書 P.8 のプロトコルナンバー V-e を参照とした。まず、マイクロチューブを 9 本(標準曲線用) + 測定サンプル数  $\times$  2 本 + 15ml チューブ 1 本を用意した。そして BSA 標準溶液を作製し、そこから 8 種類のタンパク質濃度へと調整した。さらに、15ml チューブに Working Solution(1800 $\mu$ l + 100 $\mu$ l  $\times$  測定サンプル数) を作成した。次に、サンプル希釈溶液を作成し、96 Well Plate に Working Solution と BSA 標準溶液調整液またはサンプル希釈溶液を 100 $\mu$ l ずつ入れてよく混合した。その後、37°C に設定した恒温槽内で 1 時間培養し、マイクロプレートリーダーを用いて 562nm の吸光度を測定した。その吸光度からタンパク質の濃度を求めた。

タンパク質濃度を求めた後、サンプル溶液全量中のタンパク質量が 20 $\mu$ g となるように RIPA Buffer + Protease Inhibiter と、4 $\times$ SDS Sample Buffer(4 $\times$ SDS Sample Buffer -1Mercaptoethanol : 2-Mercaptoethanol(ナカライテスク)) = 95 $\mu$ l : 5 $\mu$ l) を加えて調整を行った。4 $\times$ SDS Sample Buffer は濃度が全量の 1/4 となるように調整した。そして、調整後のサンプルを 100°C で 10 分間ボイルした。

以上の処理をしたものを Western Blotting で用いるサンプルとした。このサン

ルで SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-polyacrylamide gel electrophoresis : SDS-PAGE) を行った。SDS-PAGE の操作はタンパク質実験ノート下巻[79]などを参照し行った。泳動時には Protein Ladder One, Triple-color(Broad range) for SDS-PAGE(ナカライテスク) を分子量のマーカーとして用いた。泳動後のゲルはホライズプロット転写装置(ATTO) もしくはミニトランスプロットセル(BIO-RAD) を用いて、セミドライ方式もしくはウェット方式で、転写膜(Polyvinylidene difluoride(PVDF) 膜(Millipore) へ転写した。この膜を適量の 1~5% スキムミルク/TBS-T(スキムミルク : TBS-T = 0.5g~2.5g : 50ml) 溶液、または適量の 2%BSA/TBS-T(牛血清アルブミン(BSA):TBS-T=0.1g:50ml)溶液に 30 分以上浸すことでブロッキング処理を行った。次に、上記のブロッキング溶液によって適宜希釈した 1 次抗体(2.1 参照) に膜を浸した状態で 1 時間~Over night で放置した。放置後、TBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回以上行い、スキムミルク溶液で適宜希釈した 2 次抗体(2.1 参照) に浸した状態で 1 時間程度放置した。次に、膜を TBS-T で 5 分間の洗浄を 5 回以上行い、WesternSure® PREMIUM Chemiluminescent Substrate(LI-COR Biosciences) 、または ECL Plus キット(GE Healthcare, Buckinghamshire) を用いて処理したものを、図 2.6 に示す現像機(LI-COR Biosciences) 、または検出フィルム(Hyperfilm MP, GE Healthcare) を用いて検出した。



### 2.3.2 蛍光免疫染色法 (Immunofluorescence staining: IF)

蛍光免疫染色法は、細胞内のタンパク質に免疫の特異性を利用して蛍光の標識を着け、蛍光顕微鏡で検出する解析方法である。今回は、細胞レベルでの目的タンパク質の発現の有無、局在状態を解析するために用いた。

まず、スライドガラスに細胞が張り付いたものを用いるため、実験前に 10cm ディッシュヘスライドガラスを設置したものを用意し、そこへ細胞を適当な量播種した。そして、細胞がスライドガラスに接着し、適当な量になったところで実験を開始した。

細胞が接着したスライドガラスに以下の処理を施した。まず、コプリンジャーにスライドガラスを移し、PBS で 2 回洗浄した。次に、コプリンジャー内で 100% Methanol(ナカライテスク) もしくは 4% Paraformaldehyde-PBS(ナカライテスク) にスライドガラスを浸した状態で 10 分間放置し、細胞の固定処理をした。次に、PBS で 2 回洗浄後、0.5% TritonX100-PBS で 10 分間放置し、細胞膜穿孔処理をした。クロマチンに強固に結合しているタンパク質のみを検出するため、必要に応じて細胞固定の前に細胞膜穿孔処理を行った(Pre-extraction)。次に、PBS で 2 回洗浄後、1%BSA(牛血清アルブミン : PBS = 0.5g : 50ml) もしくは 5%スキムミルク/PBS を用いて 30 分以上放置し、ブロッキング処理を行った。続いて、1%BSA 溶液で適宜希釈した 1 次抗体で 1 時間以上処理をした。放置後、PBS-T で 5 分間の洗浄を 3 回以上行い、1%BSA で適宜希釈した 2 次抗体で 1 時間程度処理をした。2 次抗体による処理は暗所で行った。放置後、PBS-T で 5 分間の洗浄を 5 回以上行い、4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride(DAPI(ナカライテスク)) で核の染色を行った。希釈倍率は 100 倍で、Fluorescent Mounting Medium(Dako REF:S3023) という封入剤によって希釈した。スライドガラスへこの混合液を適当な量滴下後、カバーガラスで封入をし、1 時間程度暗所で静置し乾燥させた。乾燥後、蛍光顕微鏡(Zeiss) を用いて目的タンパク質による蛍光挙動の観察・撮影を行った。

### 2.3.3 生細胞における蛍光観察(ライブセルイメージング)

ライブセルイメージングは、生細胞内において GFP、もしくは GFP-PNKP 融合タンパク質など、蛍光タンパク質融合タンパク質の蛍光状態や局在、また時間経過による蛍光状態の変化を観察するために、本研究で用いた解析手法である。

サンプルとして、GFP 単独発現ベクター(pEGFP-C1)、もしくは GFP-PNKP 融合タンパク質発現ベクター(pEGFP-PNKP) 導入後の細胞を用いた。これらの細胞が 7-8 割程度接着したディッシュに放射線照射、後述する Laser micro-irradiation などの処理を施した後、細胞に接触しないように培地を取り除き、10%BCS+phenol red-free DMEM(ナカライテスク)培地に培地を交換し、蛍光倒立顕微鏡(Zeiss)を用いて時間経過に伴う蛍光挙動の変化の観察・撮影を行った。また、観察時間が離れている場合は、37°C、CO<sub>2</sub>濃度 5%の条件で培養し、観察時間に再び培地を交換し、蛍光観察を行った。

また、必要に応じて生細胞の細胞核を Hoechst 33342(同人化学研究所)により染色した。Hoechst は DAPI などと同じく DNA をラベルする試薬だが、細胞膜透過性を持つため、生細胞を使った蛍光観察の際に使用される。Hoechst は濃度 0.5ug/ml となるように観察の 30 分前に培地に添加し、UV レーザー(405nm)で励起することで細胞核を青色の蛍光で観察した。

### 2.3.4 Image J Software による蛍光挙動解析

上記の蛍光免疫染色法とライブセルイメージングにおいて、蛍光顕微鏡によって撮影した画像データから、細胞内での蛍光の局在、蛍光強度について定量的に解析するために用いた。本研究では、Image J Software を用いて、3通りの解析を行った。

1つ目はライブセルイメージングの定量化である。この実験においては、PNKPの細胞核、細胞質、核小体内における GFP(緑)の蛍光強度を Image J Software によって計測した。そして、細胞核と細胞質、核小体と細胞核での緑色蛍光の比率を計算し、グラフの縦軸とした。

2つ目は $\gamma$ H2AX の foci を形成した細胞数測定である。この実験では、Image J Software を用いて、RB(赤青)の2色の蛍光強度を組み合わせることで、細胞数の測定やリン酸化 H2AX などの foci 形成の有無を確認した(図 2.24)。まず、DAPI によって青色に染色された部分を細胞核として認識し、それぞれの細胞核内での赤(リン酸化 H2AX)の foci を形成している細胞数を Image J Software によってカウントした。なお、自然に代謝などで発生する DNA 損傷の影響を排除するために一細胞内での foci 数が 10 個以上の細胞のみをポジティブとカウントした。そして、foci を形成している細胞数を全体の細胞数で除した割合をグラフの縦軸とした。

3つ目は細胞核数測定である。ゲノム安定性の試験である微小核形成や染色体架橋の形成確認実験において用いた。基本的には2つ目の方法と同じで、青(DAPI)の蛍光を Image J software によって一つの細胞核とカウントした。その後、微小核数と染色体架橋を持った細胞数を目視で測定し、全体の細胞数で割ることで陽性細胞の割合を計算した。そして、陽性細胞の割合をグラフの縦軸とした。

また、すべての解析でそれぞれ測定細胞数は最低 100 個以上とし、割合を算出した。

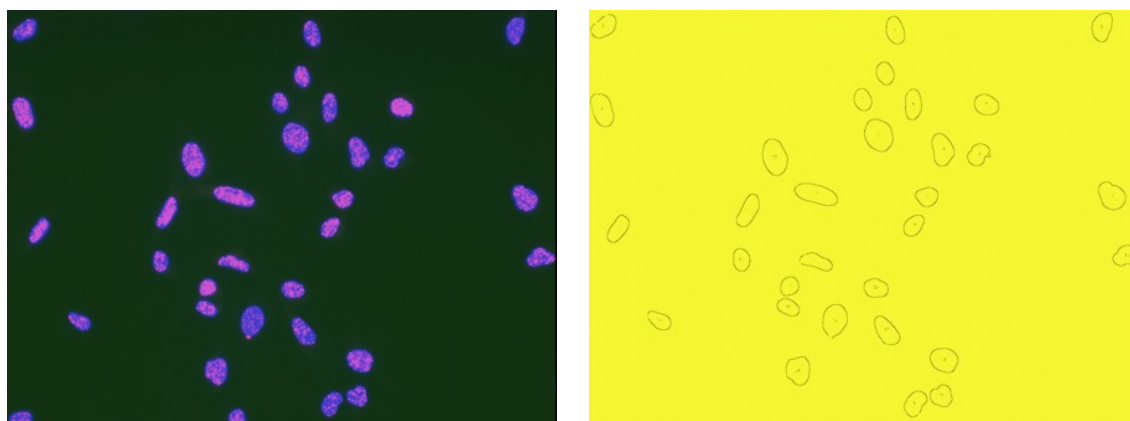


図 2.24 細胞数の測定過程：

左が DAPI とリン酸化 H2AX の共染色、右が Image J Software による細胞数測定

### 2.3.5 Laser micro-irradiation 法

細胞内の一部にレーザーを照射し、局所的な DNA 損傷を誘導する方法である。レーザーにより誘導された局所的 DNA 損傷部位へ DNA 損傷応答タンパク質が集積し、レーザートラックを形成するため、DNA 損傷応答の時間的な制御動態を確認するために適している。また、PNKP など非相同末端結合に関わる DNA 修復因子は通常時から細胞核内に膨大な量存在することが知られており、放射線照射など通常の DNA 損傷誘導方法では DNA 損傷部位への集積が観察できない。そこで、本研究では Laser micro-irradiation 法により局所的 DNA 損傷を誘導する系を確立することで、PNKP の DNA 損傷後の制御機構を可視化した。本実験では遺伝子導入を行った U2OS 細胞を用いて実験を行った。細胞は 35mm ガラスボトムディッシュ(マツナミガラス株式会社)に細胞観察の 2~3 日前に播種し、必要に応じて siRNA による遺伝子発現抑制処理を行った。観察前日の夜に 10%BCS+phenol red-free DMEM(ナカライテスク)培地に培地を交換し、観察の 30 分前にレーザーによる DNA 損傷の増感剤として 0.5  $\mu\text{g/ml}$  となるように Hoechst33342 を添加した。Laser micro-irradiation アッセイには Leica TCS SP8 LIGHTNING 共焦点レーザー顕微鏡 (Leica microsystems) の 63x/1.40 の油浸レンズを用いて実験・観察を行った[80、81]。100%強度の 405nm レーザーを 0.25 秒で細胞核内の指定した領域に照射し、照射前から 0.25 秒毎に約 63 秒間の蛍光タンパク質のタイムラプス画像を撮影した。既往の研究によると、同一条件でレーザーを 25 スキャンするとレーザーの照射領域には約 50Gy 程度の DNA 二本鎖切断が発生することがわかっている[82]。今回の Leica SP8 共焦点顕微鏡では 100%の蛍光強度 50 mW のレーザーを照射した。顕微鏡からファイバーをとおよそ 1/10 に減衰したとすると、細胞に当たるのは 5 mW 程度になり約 0.005 [J/s]となる。顕微鏡の一秒当たりのフレーム数が 3.88 fps であることから、レーザーの 1 スキャン当たりの時間は 0.257 秒となり、約 0.0013 [J]のエネルギーが照射されたこととなる。また、今回の照射範囲が  $20\mu\text{m} \times 0.2\mu\text{m}$  であることから  $3.2 \times 10^8$  [J/m<sup>2</sup>]のエネルギーが生じていることがわかる。参考として、ヒト細胞の 10%生存率となる 1 細胞当たりの照射量が、254nmUV-C (約  $1 \times 10^{-8}$  [J])、360-400nmUV-A (約 0.0005 [J])程度であることが報告されている。また、今回は 405nm のレーザーで励起される Hoechst を増感剤として使用しているため、正確なエネルギーは計算できないが、少なくとも上記のエネルギーが細胞のレーザー照射部位に働くことがわかる。405nm レーザーの照射のみでは、細胞には UV 照射時の主な産物であるシクロブタンピリミジンダイマー (CPD: 隣り合ったピリミジン塩基 (A と C) の C-5 と C-6 光化学反応により閉環反応を起こしシクロブタン構造を形成したもの)が生じることが知られている[83]。また、レーザーの Hoechst 増感により生じる DNA 損傷としては、その大半が酸化ストレスと DNA 二本鎖切断であることが報告されている[84]。

### 2.3.6 フローサイトメトリー法 (Flowcytometry: FCM)

フローサイトメトリー法は、細胞懸濁液を装置内で適当な速度で流すことで、細胞が一行で流れている状態にし、そこへレーザー光を当てて反射光を測定、またその光の強さを電気信号に変換し定量化することで、一つ一つの細胞の情報を自動的にサンプリングする方法である。一つの細胞単位での相対的大きさや形状、細胞種の同定やある細胞群に含まれる種々の細胞の割合を短時間で解析することが可能である。さらに、タンパク質・細胞を蛍光抗体で標識することにより、細胞内でのタンパク質発現量や細胞表面にある抗原量を定量的に測定することが可能で、細胞の形状や形態の差としては現れない性質の差を識別することができる。本研究では、EdU(Thermofisher scientific)のパルスラベルによる複製中 DNA の染色とPI(Cayman chemical)による DNA の染色により細胞周期分布を解析するために用いた。

本実験では、サンプルは細胞を PBS で懸濁した溶液を使用した。それぞれの処理をした細胞入り 10cm ディッシュを、5ml の PBS で 2 回洗浄、その後 PBS を取り除き、新たに 1ml の PBS を加え、トリプシン処理で細胞を回収した。その後、1.5ml マイクロチューブに移した後、適当な細胞濃度になるように PBS で希釈した。そして、フローサイトメーターを用いて EdU(緑色蛍光)と PI(赤色蛍光)の蛍光強度の解析をした。細胞のサンプリング速度は、管路内で細胞が 1 列になるように適当に調節した。また、細胞数が 20000 カウントに達するまで実験を行った。EdU がポジティブな細胞を S 期の細胞とし、PI 蛍光が N の細胞を G1 期、2N の細胞を G2/M 期の細胞として細胞周期の解析を行った。

### 2.3.7 アガロースゲル電気泳動

アガロースゲル電気泳動は、DNA フラグメントのサイズを確認・また切り出しをするために行う解析手法である。本実験においては、1%アガロースゲルを使用した。ゲルの作成は、0.5g の Agarose (ナカライテスク) と 50ml の 0.5×TBE (Tris-Borate-EDTA Buffer ナカライテスク) を三角フラスコに入れ、電子レンジを用いてアガロースを完全に溶かした。そして、60°C前後まで冷ました後、核酸染色のために 1 $\mu$ l の Gel Red(ナカライテスク) を添加し、ゲル作成専用のモールドに 25ml、または 50ml ずつ流し込み、その上からコームをセットした状態で約 30 分間、常温で放置し固まらせた。ゲルが固まったら、MilliQ で浸しながらゆっくりとコームを抜き取り、図 2.25 の泳動槽へとセットした。適量の DNA サンプルと 1kbp DNA Ladder one(ナカライテスク) と 100bp DNA Ladder one(ナカライテスク) の 2 種類の DNA ラダーマーカーを 3 $\mu$ l ずつ各ウェルへアプライし、100V で泳動を行った。

その後、UV 装置で撮影後、目的部分のゲルを切り出し、マイクロチューブへ入れた。ゲルからの DNA 抽出は Gel and PCR clean up system(Promega) を用いて、行った。切り出したゲルと同じ分量の Membrane Binding Solution を加え、60°Cの恒温槽に入れてゲルを完全に溶かした。Minicolumn を用いて、1.6 $\times 10^4$ g で 1 分間遠心を行った。この際にゲルを全量濾過させた。次に Membrane Wash Solution を 700 $\mu$ l 加え、1.6 $\times 10^4$  g で 1 分間遠心した。再度、Membrane Wash Solution を 500 $\mu$ l 加え、1.6 $\times 10^4$ g で 5 分間遠心した。その後、Membrane Wash Solution を完全に除くため、そのまま 1.6 $\times 10^4$ g で 1 分間遠心した。マイクロチューブに Minicolumn をセットし、TE(10 mM Tris-HCl pH8.0/1mM EDTA) を 30 $\mu$ l 加え、1.6 $\times 10^4$ g で 5 分間遠心した。



図 2.25 アガロースゲル電気泳動槽

### 2.3.8 免疫沈降法 (Immunoprecipitation: IP)

免疫沈降(IP: ImmunoPrecipitation)は抗原-抗体反応を利用して、溶液中から抗体特異的に結合してくるタンパク質を分離させる方法である。今回の実験では、GFP と PNKP の融合タンパク質を細胞内で遺伝子導入により発現させ、GFP と結合する磁気ビーズを用いることで PNKP と結合するタンパク質を分離した。GFP などのタグを認識する抗体は比較的感度の良いものが多いことから、タグを用いて高効率に免疫沈降を行うことは免疫沈降の中でもプルダウンアッセイと呼ばれる。免疫沈降で回収したサンプルは Western Blotting 法により解析した。以下にそのプロトコルを示す。

免疫沈降実験には基本的に HEK293 細胞を用いた。GFP 融合タンパク質は免疫沈降の 24 時間以上前に遺伝子導入によって発現させた。10 cm dish 上で PBS による洗浄を行った後、再度 PBS を加えセルスクレイパーを用いて細胞を物理的に回収、15 ml tube で遠心分離を行い細胞ペレットを回収した。その後、直前にプロテアーゼ阻害剤を加えた IP lysis buffer (100 mM NaCl, 0.2 % NP-40, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 % glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH7.5)で再懸濁し、4°Cで 30 分間ローテーターを用いて放置した。その後、高速で遠心分離を行い遠心後の上澄みの一部を Input コントロールとして分注し、残りをその後の免疫不全に用いた。免疫沈降には GFP-Trap 磁気ビーズ (ChromoTek, GmbH)を用いて、4°Cで 2 時間以上ローテーターを用いて放置した。GFP-Trap 磁気ビーズは使用前に IP buffer と磁気ステージにより 3 回洗浄を行った。放置後、IP buffer と磁気ステージを用いてサンプルを 5 回洗浄し、適量の 2X SDS sample buffer (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4 % SDS, 20 % glycerol, 0.01 % bromophenol blue, 5 % 2-mercaptoethanol)に 95°Cで溶出した。その後、Western Blotting 法により結合タンパク質の解析を行った。

### 2.3.9 コロニーアッセイによる細胞生存率測定

放射線や種々の薬剤による細胞生存率(感受性)を定量的に解析する際に最もよく用いられる方法の一つがコロニーアッセイである[85]。コロニーとは1細胞が増殖を続けることで、一つの密集した細胞集落を作ることであり、コロニーアッセイではこのコロニー形成を利用して細胞の種々のストレスに対する感受性解析を行う。細胞に放射線などのDNA損傷誘導因子で処理をすると細胞死・増殖死を起こした細胞はそれ以上細胞分裂せず、一定時間培養した後も明確なコロニーを形成しない。コロニーアッセイでは、未処理の細胞と処理後の細胞のコロニー形成数を比較することで細胞生存率を算出する。

コロニーアッセイはHCT116細胞またはU2OS細胞を用いて行った。放射線照射などの細胞処理の12-14時間前に適切な数の細胞を10 cm dishまたは6-well plateに播種し、インキュベーターで培養した(放射線量や各薬剤の濃度は実験結果を参照)。薬剤による処理の場合は、適切な時間培養した後通常の培地へと交換し、再度培養した。10~14日の培養後、十分なコロニー形成が確認出来たら、細胞をPBSで洗浄、その後99.5%エタノールで固定処理した。その後、細胞染色液(0.02% crystal violet; 2.5% methanol)で細胞コロニーを紫色に染色し、水で2度洗浄を行った。乾燥後、それぞれの条件での細胞コロニー形成数を計測し、種々の細胞ストレス因子に対する細胞生存率を導出した。コロニーはすべての条件ごとに50個以上形成するように細胞播種を行い、3回以上の独立した実験を平均して、統計的な差を算出した。

#### コロニーアッセイ

15細胞播種

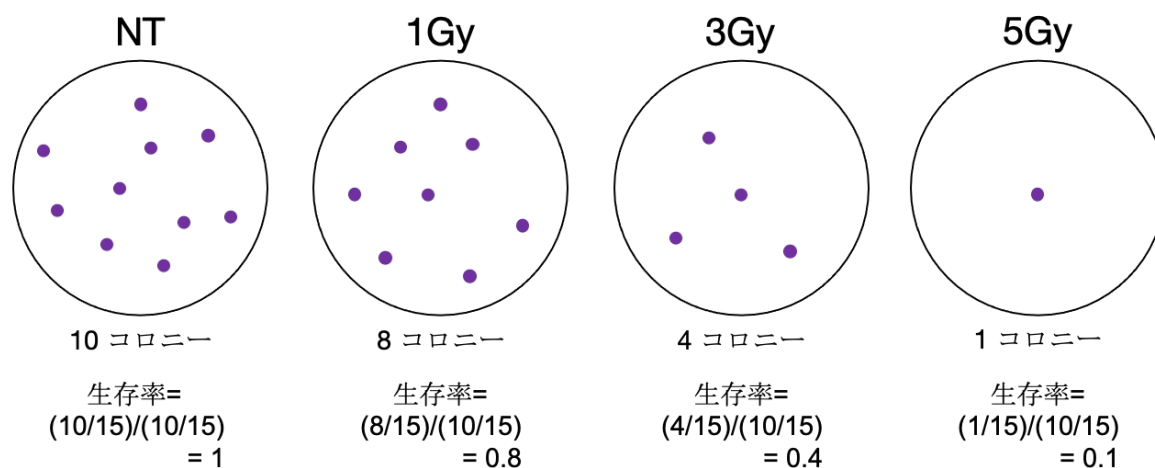


図 2.26 コロニーアッセイ法



### 2.3.9 WST-8 法による細胞生存・増殖率測定

WST-8 法は、細胞増殖率や細胞生存率を測るための手法の一つで主に薬剤の細胞毒性などを測定するときに用いられる[86、87]。原理としては、テトラゾリウム塩 (WST-8) を生細胞に添加し、生成される吸収波長 450nm の WST-8 ホルマザンの吸光度を直接測定するものである。水溶性の WST-8 ホルマザンは、WST-8 が細胞内脱水素酵素である NADH から 1-Methoxy PMS を介して電子を受け取ることで還元され、生成された産物である。以下に WST-8 アッセイの詳細な方法を示す。

WST-8 アッセイには HCT116 細胞を用いた。細胞は事前に 70-80% のコンフルエンスで 10 cm dish で培養しておき、6-well plate へ 60-70% のコンフルエンスとなるように再播種した。また、この際に siRNA による遺伝子抑制処理を行った。15-20 時間の培養後、1 well 当たり 5000 個の細胞となるように 96-well plate へ播種し、24 時間の前培養を行った。その後、過酸化水素( $H_2O_2$ , ナカライテスク)などの細胞処理を行った後、通常の培地で 72 時間の培養を行った。WST-8 法には Cell Counting Kit-8 (同人化学研究所) を用いた。まず、培養液を新鮮な培地へと交換し、10  $\mu$ l の WST-8 溶液を添加し、1 時間培養した。その後、450nm の吸光度を iMark Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad Laboratories) を用いて計測した。

## 2.4 実験の流れ

本研究では、“DNA 損傷に応答した PNKP の制御機構を解明”するために、3つの視点から細胞内での PNKP の制御機構を解析した。以下に3つの研究内容の概要を示す。

### 1) ライブセルイメージングによる PNKP 細胞内局在制御機構の解析 (第3章)

多くの DNA 修復因子は細胞核内に存在する gDNA を迅速に修復するために通常時から細胞核内に局在する。第3章では緑色蛍光タンパク質 GFP を用いて PNKP を生細胞内で可視化し、細胞内での局在制御メカニズムをアミノ酸レベルで解析した。

### 2) Laser micro-irradiation 法を用いた DNA 損傷部位への PNKP 集積動態解析 (第4章)

DNA 二本鎖切断の大部分は NHEJ 経路で修復されるが、PNKP などの NHEJ 関連因子はタンパク質量の問題から、通常的手法では DNA 損傷部位への動員が確認できない。第4章では細胞内に局所的な DNA 損傷を誘導する実験系(Laser micro-irradiation 法)により、DNA 損傷部位での PNKP の時間的制御機構をタンパク質結合やアミノ酸レベルで詳細に解析した。

### 3) リンカー領域内の新規リン酸化部位の同定と DNA 修復・複製における役割 (第5章)

DNA 損傷応答においてリン酸化などの翻訳後修飾はタンパク質の活性・構造を即時変化させ、応答を次のステップへ進めるシグナル的役割を持つ。第5章では PNKP の DNA 一本鎖切断と二本鎖切断修復へと関わる新規リン酸化サイトを同定した。また、PNKP の一本鎖切断修復能が細胞の DNA 複製の進行に関わることを突き止めた。

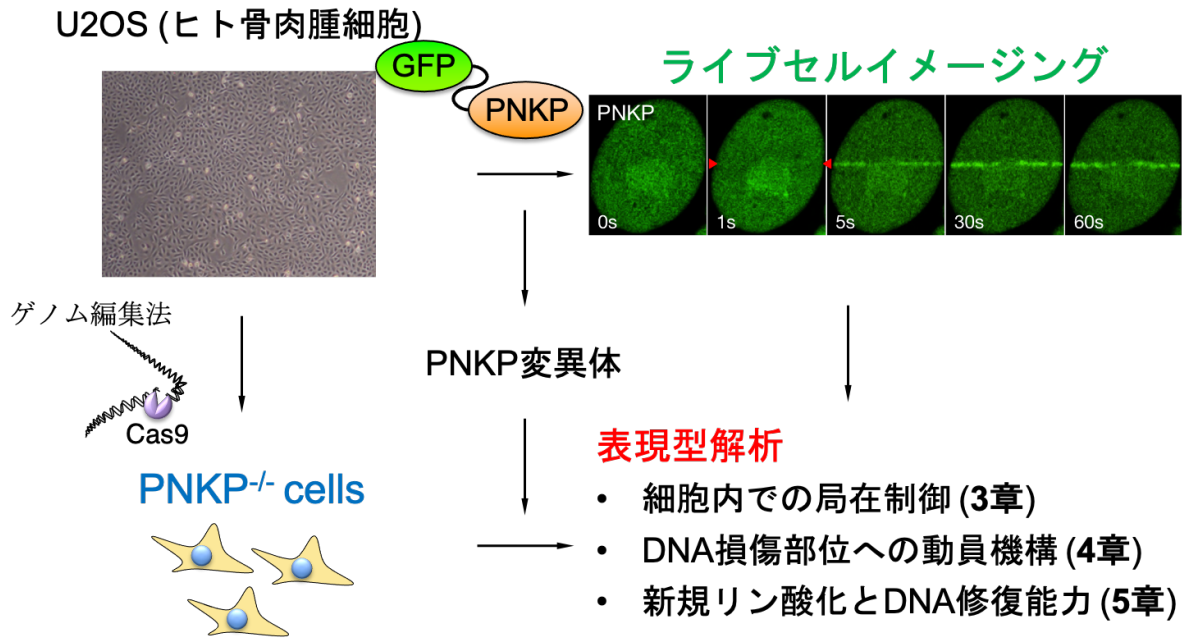


図 2.27 本研究における実験の流れ

## 第 3 章

# ライブセルイメージングによる PNKP 細胞内局在制御機構の解析

## 3.1 第3章の目的

第1章で述べたように真核生物の細胞は、細胞核、核小体、細胞質など様々な細胞内小器官・構造体によって構成されている。そして、我々の遺伝情報を司るゲノムDNAは、基本的に細胞核内で保存されている。つまりDNA損傷の発生時、迅速にDNA修復を進めるためにはDNA損傷応答因子・DNA修復因子は常に核内に局在している方が有利である。特に切断されたDNA鎖を結合する修復経路であるDNA一本鎖切断修復やNHEJを介したDNA二本鎖切断修復は、一般的に修復時間が非常に短いと考えられており、これらの修復に関わる因子はDNA損傷に迅速に応答することが求められる。

PNKP遺伝子は上記の2つの修復に関わることが報告されているが、細胞内での局在などに関する報告は少なく、細胞内での局在制御機構は不明な部分が多い。

そこで本章の目的は、「DNA修復因子PNKPの細胞内局在の制御機構を明らかにすること」である。さらに、これらの細胞内局在、特に細胞核での局在がDNA修復に与える影響を明らかにすることを目指す。そのために、以下の4点を解析する。

- 1) GFP-PNKPの構築とライブセルイメージング系の確立 (3.2章)
- 2) PNKPの細胞核内移行シグナル(NLS)の同定 (3.3章、3.4章)
- 3) PNKPの核内移行とDNA修復への寄与 (3.5章)
- 4) PNKPの核小体局在の制御機構 (3.6章)

また、3.7章ではこれらの結果を踏まえた考察を示す。

## 3.2 GFP-PNKP の細胞内局在解析

本章では、PNKP の細胞内での詳細な制御機構を解析するために、ライブセルイメージングによる観察を行う。そのためにまず、緑色蛍光タンパク質 GFP を発現するプラスミド DNA ベクター pEGFP-C1 ベクターをバックボーンとして、PCR 法により U2OS 細胞から PNKP 遺伝子の DNA 配列を増幅し、pEGFP ベクターに挿入することで、GFP-PNKP を発現する pEGFP-PNKP ベクターを構築した(図 3.2.1)。構築したベクターはアガロースゲル電気泳動によるインサートチェックと、DNA シークエンス解析による PNKP の DNA 配列確認を行った。

次に、細胞形態観察に適しており、遺伝子導入効率が高いため U2OS 細胞を用いて、pEGFP-C1 ベクターと pEGFP-PNKP ベクターの発現解析を行った。遺伝子導入はリポフェクション法を用いて、遺伝子導入の 2 日後に蛍光観察を行った(図 3.2.2)。Hoechst は膜透過性を持ち、DNA の構造に入り込む蛍光色素であり 350nm 付近の波長を持つ紫外光で励起すると 461nm で最大強度となる青-シアン光を放出する。本実験では、Hoechst は膜透過性を持つため生細胞の蛍光観察において、DNA、つまり細胞核を染色するために観察の 30 分前に添加した。また、重ね合わせは緑色蛍光と青色蛍光のチャンネルを重ね合わせたものであり、細胞核での GFP の局在を確認するために用いた。微分干渉観察像は、細胞の観察条件を統一するため、蛍光観察における Z 軸を合わせるために用いた。なお、Hoechst の染色と GFP-PNKP が共局在していない細胞があるが、これは本実験が GFP-PNKP の一過性発現細胞を用いたものであるため、約 60%の細胞でのみ GFP-PNKP が発現しているためである。

図 3.2.2 の結果として、GFP 単体を発現する細胞は緑色蛍光が細胞核と細胞質ともに確認できた。それに対して、GFP-PNKP は、Hoechst と共局在していることが観察でき、細胞核に有意に局在していることがわかった。つまり、通常時に PNKP 遺伝子は細胞核に局在するということがわかった。本章ではどちらの条件においても生細胞内で GFP の蛍光を用いてタンパク質の局在を観察することが可能であった。そこで、第 3.3 章ではこの“ライブセルイメージング”の実験系を用いて PNKP のどの領域が細胞内での局在に関わるのかを解明する。

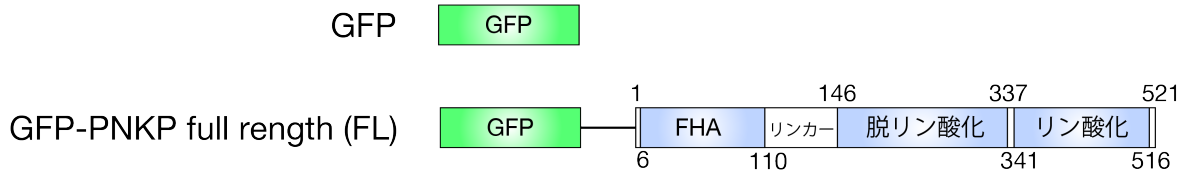


図 3.2.1 緑色蛍光タンパク質 GFP 発現ベクターと GFP-PNKP 発現ベクターの構築 : 細胞内で GFP を発現するプラスミド DNA ベクターである pEGFP-C1 をバックボーンとして PNKP の DNA 配列を U2OS 細胞から PCR によりコピーし、挿入することで GFP-PNKP を発現する GFP-PNKP ベクターを構築した。挿入した PNKP 遺伝子の配列は DNA シークエンス解析により確認した。PNKP は 3 つのドメイン(FHA、脱リン酸化、リン酸化)とリンカー領域で構成され、521 アミノ酸から成る。GFP-PNKP の図に示した数字は各領域の始まりと終わりのアミノ酸番号を表している。

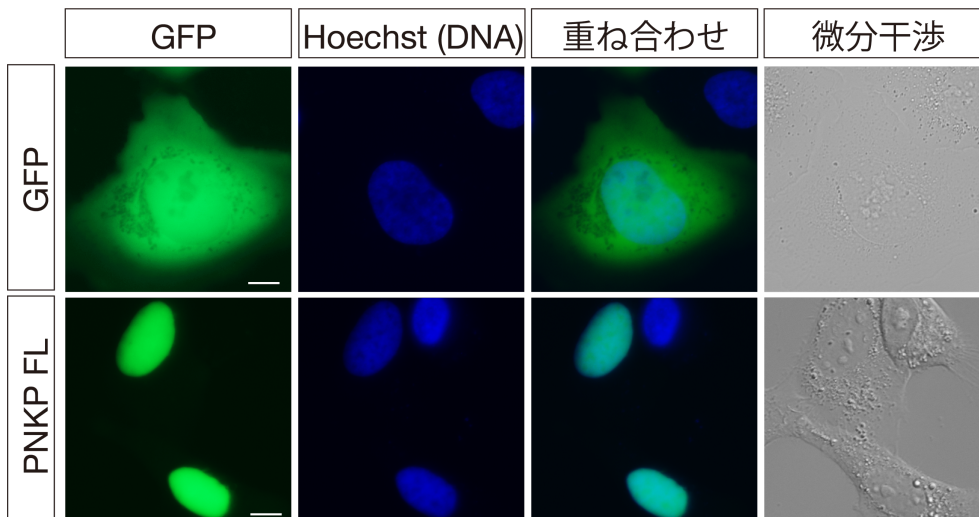


図 3.2.2 pEGFP-C1 ベクターと構築した pEGFP-PNKP ベクター導入後の蛍光顕微鏡観察画像 : U2OS 細胞に pEGFP-C1 ベクター (上図: GFP) と構築した pEGFP-PNKP ベクター (下図: PNKP FL) をリポフェクション法により遺伝子導入した。遺伝子導入 2 日後の生細胞の蛍光顕微鏡観察を行った。左から GFP 蛍光の観察、細胞核 (Hoechst: DNA) の観察、GFP と細胞核の重ね合わせ画像、微分干渉画像である。GFP 単体を発現する細胞では、細胞核とともに細胞質でも GFP 蛍光が観察できるのに対して、GFP-PNKP は細胞核内に有意に局在していることがわかる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

### 3.3 PNKP の細胞内局在を制御する領域解析

3.2 章において、GFP を用いたライブセルイメージングによって、PNKP が細胞核へ局在することがわかった。そこで、本章では、PNKP のどの領域が細胞核への局在に関係するのかを解析した。そのために、ミュータジェネシス PCR 法により上記の pEGFP-PNKP ベクターを改変し、各領域の欠損変異体(D1: FHA ドメイン欠損、D2: リンカー領域欠損、D3: 脱リン酸化ドメイン欠損、D4: リン酸化ドメイン)を作製した(図 3.3.1)。それぞれの変異体における欠損領域は図内にて示す。

次に、構築した 4 つの PNKP 変異体を U2OS 細胞にリポフェクション法により遺伝子導入し、2 日後に蛍光顕微鏡観察を行った(図 3.3.2)。観察の条件は第 3.2 章と同じである。次に、これらの変異体と GFP 単体、そして GFP-PNKP の細胞核と細胞質における GFP 蛍光強度を Image J ソフトウェアを用いて解析した(図 3.3.3)。細胞核内と細胞質内で一定領域を選択し、その領域内の蛍光強度を ImageJ にて 255 段階で評価した。図では細胞核内と細胞質内の GFP 蛍光強度の比率を縦軸としている。それぞれの条件において少なくとも 100 細胞以上を観察し統計解析に用いた。また、遺伝子導入後のそれぞれのタンパク質の発現確認は Western Blotting によって行った(図 3.3.4)。検出は GFP 抗体、PNKP 抗体、GAPDH 抗体を用いて行った。

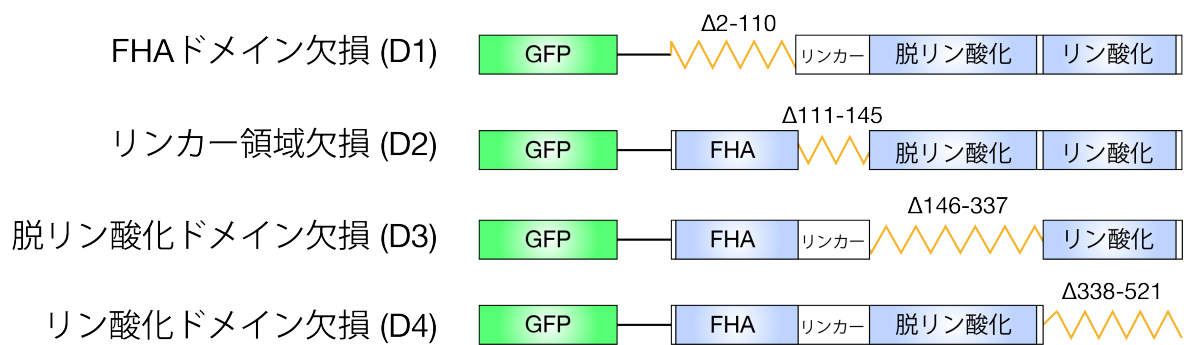
図 3.3.2 から、どの変異体においても生細胞内で GFP の蛍光が確認できた。D1、D3、D4 変異体においては顕微鏡観察レベルでの細胞内局在の変化は見られなかった。しかし、リンカー領域を欠失した PNKP D2 変異体においては、核内とともに細胞質に PNKP が局在することが確認できた。つまり、PNKP のリンカー領域が細胞核内への PNKP 移行に関わる可能性が示唆された。

図 3.3.3 から、GFP を単独で発現する細胞では細胞核/細胞質の蛍光強度比(N/C 比)が約 1 となることがわかった。つまり、細胞核と細胞質などはあまり関係なく全体的にベタ染まりしていることがわかる。それに対して野生型の PNKP と GFP の融合タンパク質は N/C 比が有意に上昇し、細胞核内での局在が優位になることが ImageJ を用いた解析からも明らかとなった。また、脱リン酸化ドメインとリン酸化ドメインを欠失した D3 と D4 変異体では、野生型 PNKP と比較しても有意な蛍光挙動の差は確認できなかった。それに対して FHA ドメインを欠失した PNKP D1 変異体と D2 変異体において有意な細胞核内局在量の低下が確認できた。特に、D2 変異体に関しては劇的に細胞核内の蛍光強度が低下、細胞質内の蛍光強度が増加したことにより N/C 比が GFP を単独で発現した細胞レベルに低下していることがわかった。よって、PNKP の細胞核への移行のおおよそを制御するのはリンカー領域であり、残りの一部を制御するのが FHA ドメインである可能性が示唆された。



図 3.3.4 では、タンパク質の Western Blotting による発現量解析を行った。Western Blotting では各サンプルを 20  $\mu\text{g}$  アプライした。今回は遺伝子導入により外部から導入した GFP 融合 PNKP タンパク質の発現を解析するために、GFP 抗体と PNKP 抗体の二種類を用いた。また、各レーンに流したサンプルのタンパク質量が同じであることを示すため、ローディングコントロールとして GAPDH 抗体を用いた。GAPDH 抗体を用いた検出結果から、今回アプライしたサンプルはほぼ同一量であることがわかる。さらに、GFP と PNKP 抗体を用いた検出から、タンパク質レベルでもどの変異体も細胞内で発現しており、それぞれの領域を欠失している分サイズが小さいことがわかる。また、脱リン酸化ドメインを欠失した D3 変異体は細胞内での存在量が低いことがわかる。脱リン酸化ドメインは PNKP 変異を原因とした遺伝性神経疾患の患者細胞において多くの変異が報告されており、これらの患者細胞では PNKP の安定性が低下することが報告されている [17]。つまり、今回の D3 変異体の存在量低下は、脱リン酸化ドメインの欠損により PNKP 自体の安定性が低下した結果だと考えられる。

第 3.3.章では、PNKP のリンカー領域が細胞核内への移行において重要な役割を持つことが明らかになった。そこで第 3.4 章ではリンカー領域内の更にどの領域がその細胞核への移行を制御するのかを解析する。



**図 3.3.1 PNKP 各領域欠損変異体の構築** :PNKP の細胞核局在における PNKP の各領域の重要性を解析するために第 3.2 章で構築した GFP-PNKP 発現ベクターをミュータジェネシス PCR 法により改変し、各領域の欠損変異体(D1: FHA ドメイン欠損、D2: リンカー領域欠損、D3: 脱リン酸化ドメイン欠損、D4: リン酸化ドメイン)を作製した。各変異体ではそれぞれの図に示した数字のアミノ酸領域を欠失させた。

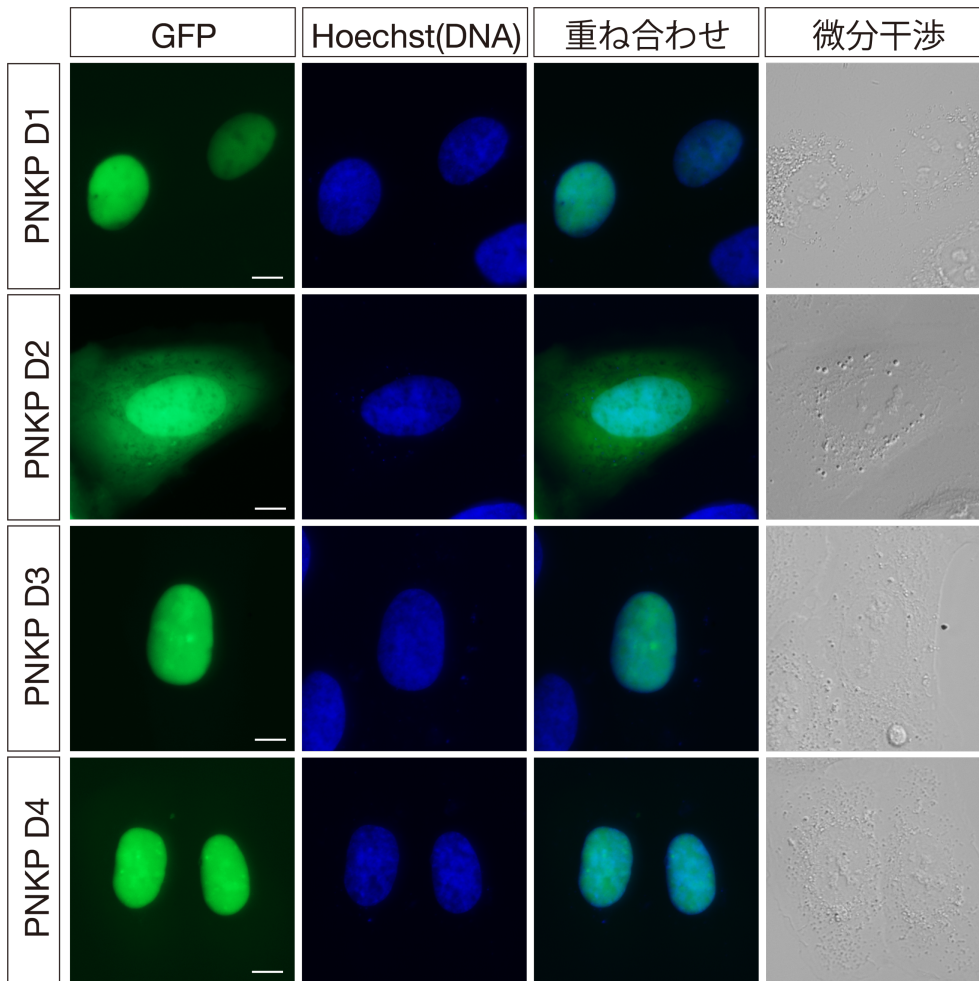


図 3.3.2 PNKP 各領域欠損変異体の蛍光顕微鏡観察画像 :U2OS 細胞に図 3.3.1 で示した PNKP の各領域欠損変異体 D1、D2、D3、D4 をリポフェクション法により遺伝子導入し、2 日後に蛍光顕微鏡観察した結果である。左から GFP 蛍光の観察、細胞核 (Hoechst:DNA) の観察、GFP と細胞核の重ね合わせ画像、微分干渉画像である。D2 変異体において細胞内局在の変化が観察された。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

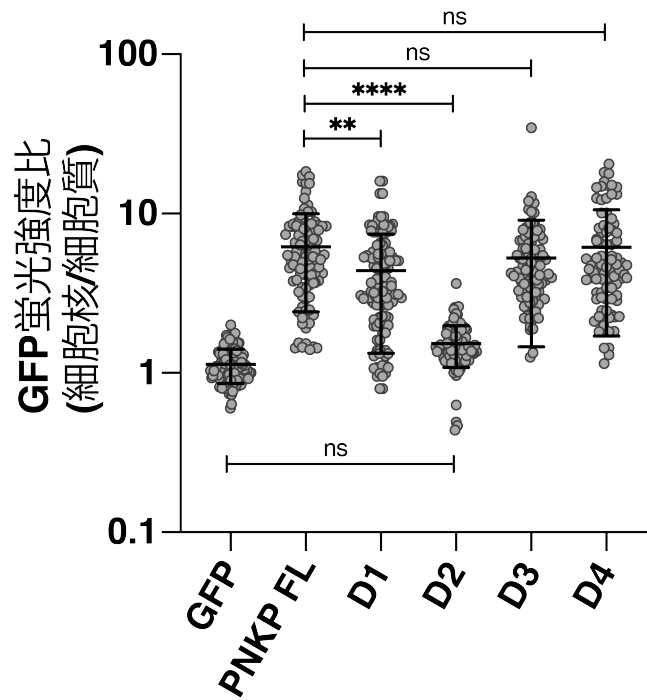
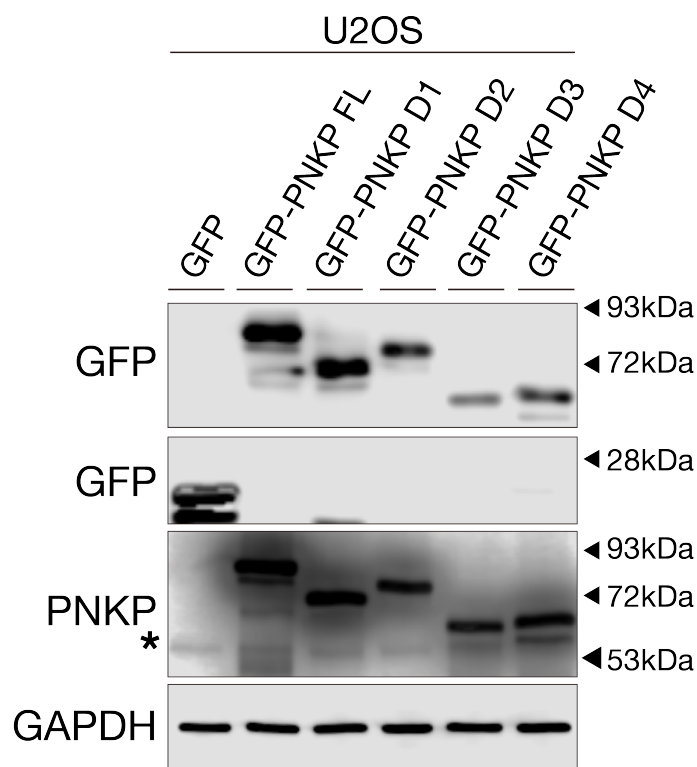


図 3.3.3 PNKP 各領域欠損変異体の細胞核内と細胞質内での蛍光強度比測定 : 図 3.3.2 を Image J ソフトウェアを用いて定量化した結果である。細胞核内と細胞質の GFP 蛍光強度を測定し、その比を求め、GFP 単体と GFP-PNKP、それぞれの PNKP 変異体と比較した。D1 変異体と D2 変異体において野生型の PNKP と比較し、細胞核内での局在が有意に減少していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\* は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\* は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\* は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\* は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。



**図 3.3.4 遺伝子導入後の細胞内での PNKP 各領域欠損変異体の発現量解析** : U2OS 細胞に GFP 単体、GFP-PNKP、PNKP 変異体を遺伝子導入し、細胞内での各タンパク質の発現量を Western Blotting によって確認した結果である。GFP タグを付けたタンパク質であるため、GFP 抗体を用いた検出と、PNKP 抗体を用いた検出を行った。GFP 抗体、PNKP 抗体ともに遺伝子導入により発現させた PNKP とその変異体が確認できた。図左側の “\*” は内在性の PNKP を表しており、図右側の数字は分子量を表している。GAPDH(分子量 37 kDa) はエネルギー産生において重要な解糖系に関わる酵素の一つで、多くの組織で高い発現が確認されているため Western Blotting においてタンパク質の泳動量を確認するためのコントロールタンパク質として広く用いられている[88]。各ウェルに流したタンパク質の総量は 20 $\mu$ g である。

### 3.4 核内移行シグナル(NLS)の同定

第 3.3 章では、PNKP のリンカー領域が PNKP の細胞核内への局在へ関わることを明らかにした。既往の研究において、核内に局在するタンパク質は様々な種類の核内移行シグナル(NLS: Nuclear Localization Signal)を持ち、Importin と呼ばれるタンパク質と結合することで細胞質から細胞核へ運ばれることが知られている[89]。そこで、様々な生物種間での PNKP リンカー領域の保存性を解析し、生物種間で高度に保存されているアミノ酸領域を同定(図 3.4.1)、さらに、これまでに報告されている他のタンパク質が持つ NLS との比較を行った(図 3.4.2)。

図 3.4.1、図 3.4.2 から、アミノ酸領域 137-142 (KKR-RK)が生物種間で高度に保存されており、NLS において頻繁に確認される Arginine(R)や Lysine(K)などのポジティブチャージのアミノ酸の並びが確認できた。特に SV40 に由来する Mono-partite NLS との相同性が高く、他のタンパク質が持つ Mono-partite NLS と比較すると非常に似た配列であることがわかった。Mono-partite NLS は 5 アミノ酸程度のポジティブチャージを持つアミノ酸で構成されたアミノ酸領域からなる核移行シグナルであり、他には Bipartite (2 つの mono-partite NLS が近くに存在する)と Tripartite (3 つの Mono-partite NLS が近くに存在する)と呼ばれる NLS が報告されている[90、91]。NLS は Importin と呼ばれるタンパク質との結合モチーフであると考えられており、この Importin タンパク質が結合タンパク質を細胞核内へと輸送する輸送タンパク質であるため、NLS を有するタンパク質は細胞核内へと局在すると考えられている[89]。

そこで、ミュータジェネシス PCR 法を用いて、アミノ酸 137-142 を欠失させた PNKP  $\Delta$ 137-142 変異体を作製した。そして、U2OS 細胞にリポフェクション法により遺伝子導入し、タンパク質発現量を Western Blotting(図 3.4.3)、GFP 蛍光を蛍光顕微鏡でこれまでの章と同様に観察した(図 3.4.4)。さらに、 $\Delta$ 137-142 変異体と GFP-PNKP の細胞核と細胞質における GFP 蛍光強度を Image J を用いて解析した(図 3.4.5)。

まず、図3.4.3において、GFP 抗体を用いたブロットから GFP-PNKP と  $\Delta$ 137-142 変異体がどちらも同程度発現していることがわかった。 $\Delta$ 137-142 変異体では領域を欠損させた分、若干のタンパク質分子量の低下が確認できる。

図 3.4.4 の蛍光観察の結果から、 $\Delta$ 137-142 変異体では、核内での PNKP の局在がほぼ消失し、細胞質に局在することが観察できた。この蛍光挙動は GFP 単独の蛍光挙動とはことなり、細胞質に優位に存在していることがわかる。

図 3.4.5 の ImageJ による定量解析の結果からも、GFP-PNKP と  $\Delta$ 137-142 変異体を比較すると  $\Delta$ 137-142 変異体が有意に N/C 比が低いことがわかる。また N/C 比が 1 を下回っていることから、GFP 単独の場合と比較して細胞質有意に局在していることが明らかとなった。そこで、PNKP リンカー領域内の核外移行シグナル (NES: Nuclear export signal、いくつかの疎水残基のアミノ酸からなるアミノ酸配列で Exportin によって細胞核内から細胞核外へと輸送される)の配列解析を行ったところ、137-142 の直前にあるアミノ酸配列が NES 様であることがわかり、NLS を欠失した PNKP は NES によって細胞核外へと輸送されたため、GFP 単独と比較しても細胞核内の発現量が有意に低下するということが示唆された。

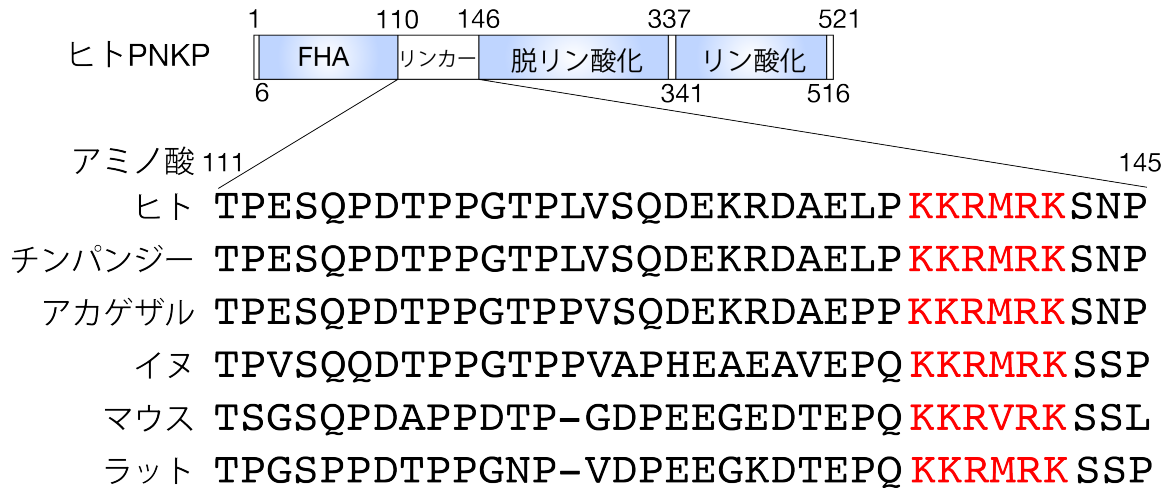


図 3.4.1 様々な生物種間での PNKP リンカー領域の保存性解析 : PNKP リンカー領域の生物種間(ヒト、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、マウス、ラット)での保存性を解析した結果。赤で示された領域(アミノ酸 137-142: KKR-RK)、が高度に保存されていることがわかる。Arginine(R)と Lysine(K)はポジティブチャージをもつアミノ酸であり、核移行シグナルには多くの R/K が含まれていることが知られている。各生物種でのアミノ酸配列は NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/>)より取得した。アミノ酸配列のアラインメントには MEGAX を用いた。

### Monopartite NLS 配列

ヒト PNKP (137-142) –**KKRMRK**  
 ヒト c-Myc (323-326) –**KRVK**–  
 ヒト NAB2 (343-346) –**KKLK**–  
 ヒト H2B (30-34) –**KKRSK**–  
 ヒト SAMHD1 (11-14) –**KRPR**–  
 SV40 large T antigen (127-131) –**KKKRK**–

図 3.4.2 他タンパク質が持つ既知の NLS 配列との相同性解析 : PNKP リンカー領域のアミノ酸領域 137-142 を既知の NLS のアミノ酸配列と比較した結果である。c-Myc(アミノ酸領域 323-326)、NAB2(アミノ酸領域 343-346)、H2B(アミノ酸領域 30-34)、SAMHD1(アミノ酸領域 11-14)、SV40(アミノ酸領域 127-131)のアミノ酸配列を用いた。これらは Monopartite NLS と呼ばれ、5 アミノ酸程度のポジティブチャージを持つアミノ酸で構成されたアミノ酸領域からなる核移行シグナルであり、SV40 の NLS に由来すると考えられている。



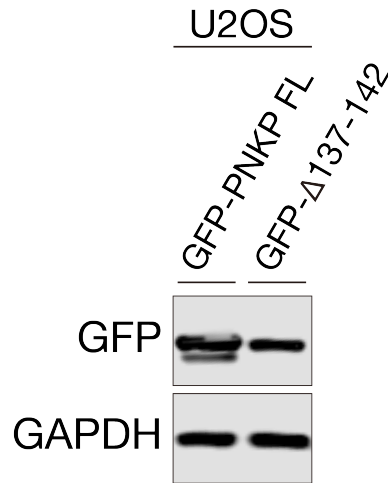


図 3.4.3 GFP-PNKP と PNKP  $\Delta$ 137-142 変異体の発現量解析： U2OS 細胞に GFP-PNKP、PNKP  $\Delta$ 137-142 変異体を遺伝子導入し、細胞内での各タンパク質の発現量を Western Blotting によって確認した結果である。GFP 抗体を用いて検出を行い、遺伝子導入により発現させた PNKP とその変異体の発現が確認できた。GAPDH はコントロールタンパク質として使用した。各ウェルに流したタンパク質の総量は  $20\mu\text{g}$  である。

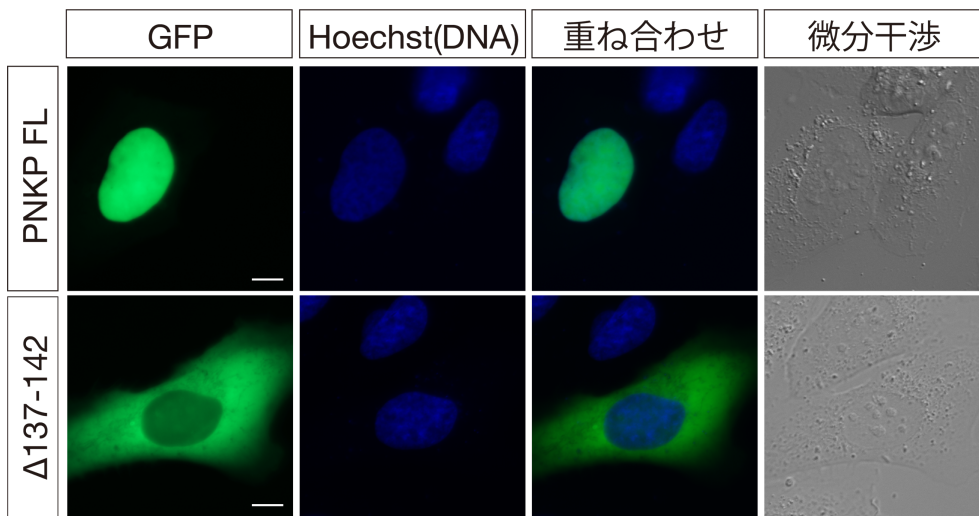
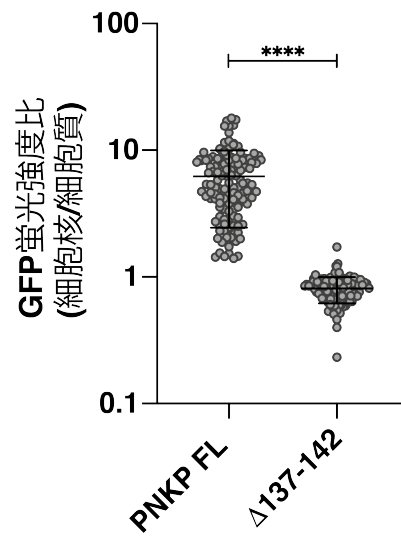


図 3.4.4 GFP-PNKP と PNKP  $\Delta$ 137-142 変異体の蛍光観察画像： U2OS 細胞に図 3.4.1 で示した PNKP の NLS 様配列欠失変異体 PNKP  $\Delta$ 137-142 変異体をリポフェクション法により遺伝子導入し、2 日後に蛍光顕微鏡観察した結果である。左から GFP 蛍光の観察、細胞核 (Hoechst: DNA) の観察、GFP と細胞核の重ね合わせ画像、微分干渉画像である。 $\Delta$ 137-142 変異体では細胞質への局在が優位になることが観察できる。白線は  $10\mu\text{m}$  を表すスケールバーである。



**図 3.4.5 GFP-PNKP と PNKP Δ137-142 変異体の細胞核と細胞質における蛍光強度比:**  
 図 3.4.4 を Image J ソフトウェアを用いて定量化した結果である。細胞核内と細胞質の GFP 蛍光強度を測定し、その比を求め、GFP-PNKP と PNKP Δ137-142 変異体で比較した。Δ137-142 変異体において野生型の PNKP と比較し、細胞核内での局在が有意に減少していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし、ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\* は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\* は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\* は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\* は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

図 3.4.5 までの結果から、PNKP のアミノ酸 137-142 が PNKP の細胞核内移行に関わることがわかった。そこで次に、これらの領域の中でどのアミノ酸が PNKP の核内局在に重要なのか解析を行った。前述したとおり、既知の NLS ではポジティブチャージのアミノ酸 Arginine: R と Lysine: K が重要であるということが報告されている。PNKP のアミノ酸 137-142 には 5 つの R/K(K137、K138、R139、R141、K142) がある。そこで、ミュータジェネシス PCR 法を用いて、これらのアミノ酸を Alanine(A)に置換し、ポジティブチャージを欠失した変異体(K137A、K138A、R139A、R141A、K142A)を作製した(図 3.4.6)。次に、U2OS 細胞にこれらの変異体を遺伝子導入し、細胞内における発現量を Western Blotting により確認した(図 3.4.7)。また、5 つの変異体の細胞内局在は遺伝子導入 2 日後に蛍光顕微鏡により観察し、細胞核と細胞質における GFP 蛍光強度比を測定した(図 3.4.8、図 3.4.9)。観察の条件はこれまでと同様である。

図 3.4.7 の Western Blotting によるタンパク質発現量解析では、GFP 抗体と GAPDH 抗体による検出を行った。GFP 抗体の結果から、今回作製した 5 つの変異体はどれも PNKP 野生型と同程度の発現量を示していることがわかった。また、今回はアミノ酸を置換した変異体であるため、タンパク質分子量の有意な変化は確認できなかった。

図 3.4.8、図 3.4.9 の生細胞内における蛍光挙動解析の結果から、5 つの Arginine/Lysine 変異体の内、3 つの変異体 K138A、R139A、R141A において有意な細胞核内 PNKP 局在の低下が確認できた。しかし、2 つの変異体 K137A、K142A においては野生型の PNKP と同様に細胞核内に局在することがわかった。このことから、PNKP のリンカー領域内のアミノ酸領域 137-142 の内、138-141 が PNKP の細胞核内移行において特に重要であることがわかった。

第 3.4 章では、PNKP リンカー領域内のアミノ酸領域 137-142 が他の核内タンパク質が持つ既知の細胞核内移行シグナル NLS と類似しており、生物種間でも高度に保存されていること、そしてその中でもアミノ酸 K138、R139、R141 が特に PNKP の細胞核内への移行には必須であることが明らかになった。そこで、3.5 章ではこれらの PNKP の核内移行能力が細胞の DNA 修復能力に関与するのか解析する。

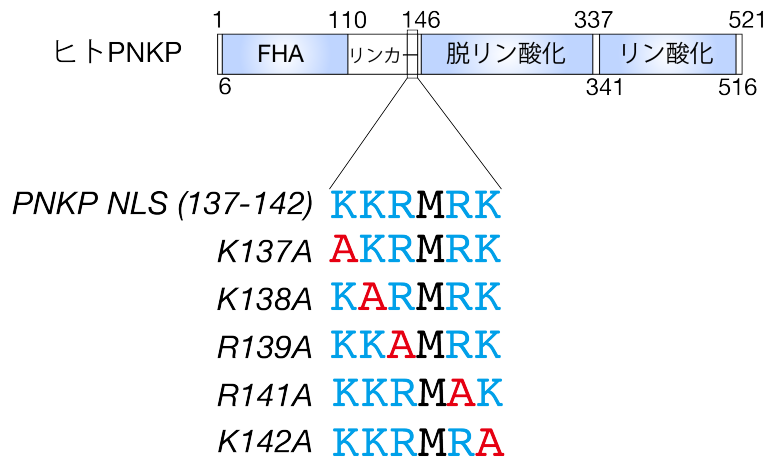


図 3.4.6 PNKP アミノ酸 137-142 領域に存在する 5 つの Arginine/Lysine 変異体の作製: PNKP リンカー領域のアミノ酸領域 137-142 に存在する 5 つのポジティブチャージを持つアミノ酸(Arginine:R, Lysine:K)を Alanine:A に置換し、プラスの電荷を失わせた 5 つの変異体を作製した(K137A、K138A、R139A、R141A、K142A)。

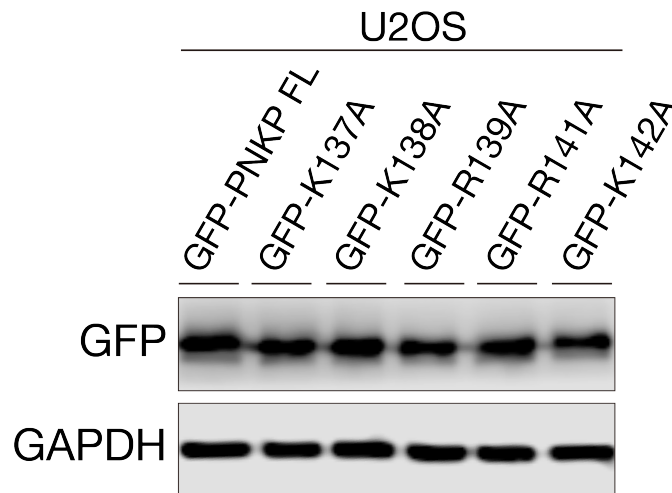


図 3.4.7 作製した 5 つの Arginine/Lysine 変異体の Western Blotting による発現量解析: GFP-PNKP、作製した 5 つの PNKP 変異体を遺伝子導入し、細胞内での各タンパク質の発現量を Western Blotting によって確認した結果である。GFP 抗体を用いて検出を行い、遺伝子導入により発現させた PNKP と 5 つの変異体の発現が確認できた。GAPDH はコントロールタンパク質として使用した。各ウェルに流したタンパク質の総量は 20 $\mu$ g である。

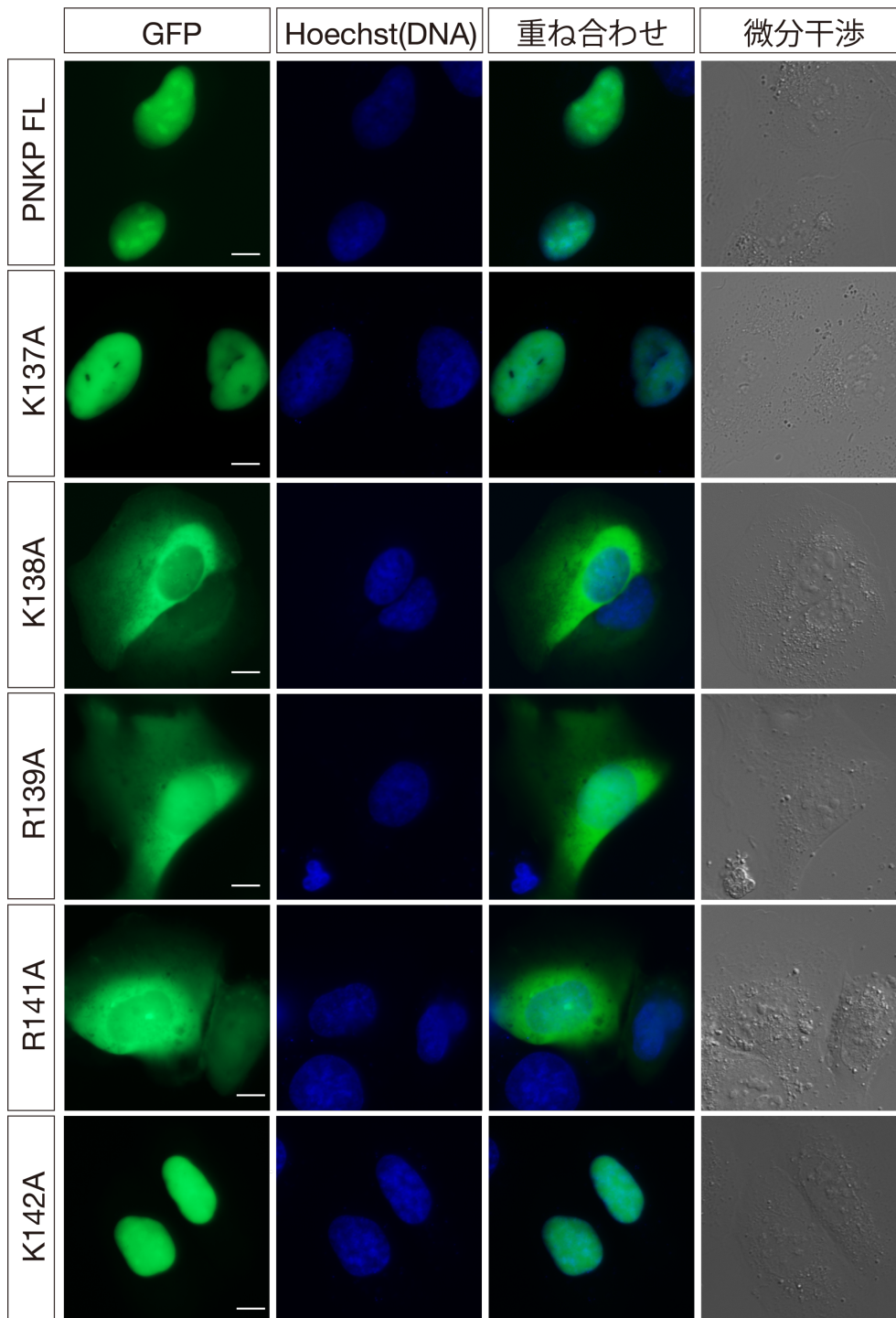


図 3.4.8 作製した 5 つの Arginine/Lysine 変異体の蛍光顕微鏡観察画像: U2OS 細胞に図 3.4.6 で示した PNKP の 5 つの Arginine/Lysine 変異体をリポフェクション法により遺伝子導入し、2 日後に蛍光顕微鏡観察した結果である。左から GFP 蛍光の観察、細胞核 (Hoechst: DNA) の観察、GFP と細胞核の重ね合わせ画像、微分干渉画像である。K138A、R139A、R141A 変異体において細胞質への局在が優位になることが観察できる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

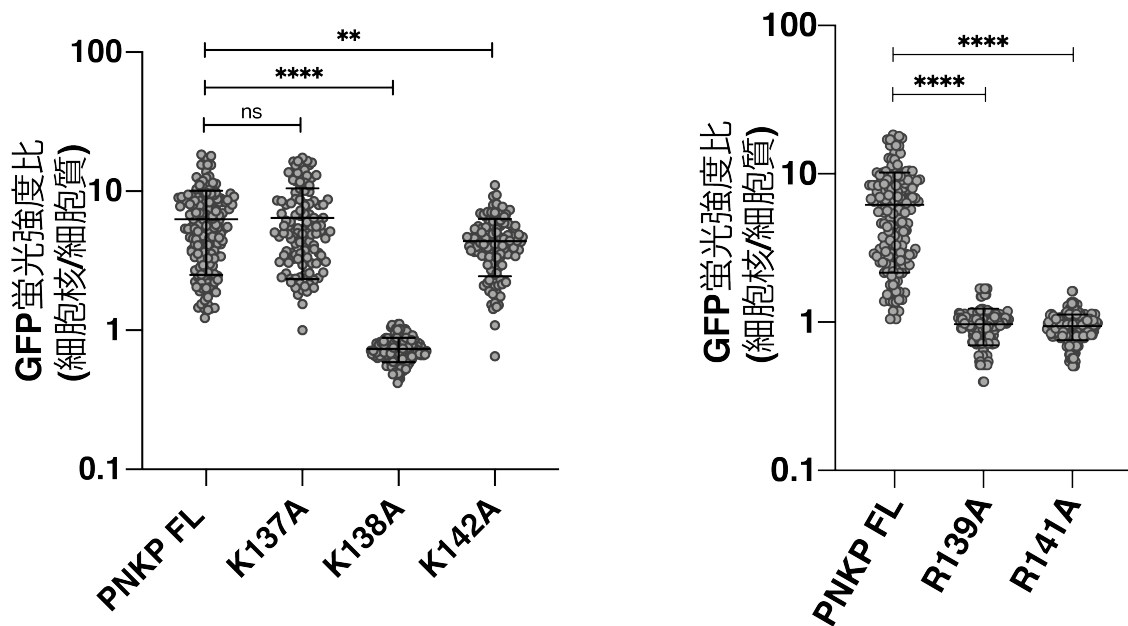


図 3.4.9 作製した 5 つの Arginine/Lysine 変異体の細胞核と細胞質内 GFP 蛍光強度比:  
 図 3.4.8 を Image J ソフトウェアを用いて定量化した結果である。細胞核内と細胞質の  
 GFP 蛍光強度を測定し、その比を求め、GFP-PNKP と 5 つの Arginine/Lysine 変異体で  
 比較した。K138A、R139A、R141A 変異体において野生型の PNKP と比較し、細胞核  
 内での局在が有意に減少していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの  
 実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\* は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、  
 \*\* は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\* は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\* は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表し  
 ている。

### 3.5 PNKP 核内移行の DNA 修復への寄与

第 3.4 章において、PNKP のリンカー領域内に存在するアミノ酸領域 137-142、特に K138/R139/R141 が PNKP の細胞核内移行に必要であることがわかった。本章では、この細胞核内移行能力と細胞の DNA 修復能力の関係を解析した。DNA 修復能力として DNA 二本鎖切断の修復能力と DNA 一本鎖切断の修復能力を免疫染色法により解析した。免疫染色では、siRNA により内在性の PNKP の発現量を抑制し、遺伝子導入により野生型の PNKP と NLS 変異型の PNKP を細胞内で再発現させた細胞を用いた。siRNA は PNKP の 3'側に存在する非翻訳領域(3'-UTR)を標的として設計し、遺伝子導入により再発現させた PNKP には干渉しないようにした。siPNKP による PNKP 発現抑制効率は Western Blotting によって確認した(図 3.5.1)。

DNA 二本鎖切断修復能力の解析は、DNA 二本鎖切断のマーカーとして広く用いられている $\gamma$ -H2AX 抗体を用いて行った[92]。DNA 損傷は 2Gy の放射線照射により誘導し、照射後 30 分後と 6 時間後に細胞を回収し、細胞内に 10 個以上の $\gamma$ -H2AX ドット(Foci)が確認出来る細胞を DNA 二本鎖切断が残存している $\gamma$ -H2AX 陽性細胞としてカウントし、陽性細胞の割合を解析した(図 3.5.2、図 3.5.3)。理論上、2Gy の $\gamma$ 線照射後には約 80 個の DNA 二本鎖切断が発生し、時間経過に伴い DNA 修復機構によって DNA 二本鎖切断が修復されていく。 $\gamma$ -H2AX のドットがそれぞれの DNA 二本鎖切断を表すと仮定すると、時間経過に伴う $\gamma$ -H2AX 陽性細胞の割合をカウントすることで細胞集団間の DNA 二本鎖切断がどのくらい修復されているのかを評価できる。

DNA 一本鎖切断修復能力の解析は、DNA 一本鎖切断のマーカーとして広く用いられている ADP-ribose 抗体を用いて行った[93]。DNA 損傷は 2Gy の放射線照射により誘導し、照射後 30 分後に細胞を回収し、細胞内での ADP-ribose 蛍光強度を ImageJ ソフトウェアにより計測し、蛍光強度を細胞内での DNA 一本鎖切断の残存率として考え解析を行った(図 3.5.4、図 3.5.5)。DNA 一本鎖切断の発生量は、DNA 二本鎖切断と比較して多く、理論上 2Gy 当たり約 2000 個発生すると考えられている。このことから、DNA 一本鎖切断のマーカーである ADP-ribose のドットがそれぞれ DNA 一本鎖切断を表すとしても、細胞核内でドットとして認識することが困難である。よって、DNA 一本鎖切断修復の状況を判断するために細胞核内での ADP-ribose の蛍光強度を評価した。

図 3.5.1 の Western Blotting の結果から、PNKP mRNA の 3'末端側の非翻訳領域を標的とした siRNA (siPNKP 3'-UTR)を導入した細胞では、ホタルのルシフェラーゼを標的とした siControl 導入細胞と比較して、PNKP の発現が顕著に減少している

ことがわかる。つまり、今回設計した siPNKP 3'-UTR は細胞内の PNKP の発現を抑制できることがわかった。

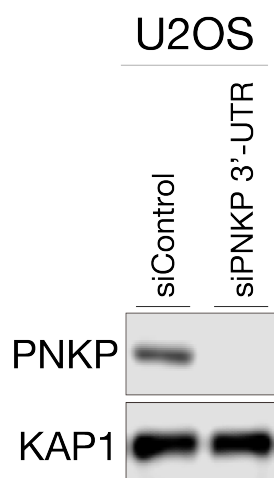
図 3.5.2 と図 3.5.3 では 4 つの PNKP NLS 変異体発現細胞での DNA 二本鎖切断修復能力を、U2OS 細胞に siRNA を用いて内在性 PNKP の発現抑制をした後、野生型 PNKP と 4 つの PNKP 変異体( $\Delta$ 137-142、K138A、R139A、R141A)を再発現させることで解析した。DNA 二本鎖切断は 2Gy の放射線照射により誘導し、放射線照射 30 分後と 6 時間後のそれぞれの条件の細胞における DNA 二本鎖切断の残存率を、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞をカウントすることで定量化した。NT は未処理細胞を表しており、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞はほとんど観察できなかった。結果として、放射線照射 30 分後ではどの条件の細胞でもほぼ 100%が $\gamma$ H2AX 陽性細胞であった。放射線照射 6 時間後では PNKP 抑制細胞と 4 つの PNKP 変異体発現細胞において、コントロール細胞 (siCTRL)や siPNKP+PNKP 細胞と比較して、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞の割合の有意な増加が確認できた。このことから、PNKP の細胞核内への移行能力は DNA 二本鎖切断の修復に必要であり、核移行能力が欠失した PNKP を発現する細胞では放射線照射後の DNA 二本鎖切断の修復が遅延することが明らかになった。

図 3.5.4 と図 3.5.5 では 4 つの PNKP NLS 変異体発現細胞での DNA 一本鎖切断修復能力を、DNA 二本鎖切断と同様の細胞条件で解析した。DNA 一本鎖切断は 2Gy の放射線照射により誘導し、PARG 阻害剤(PARGi)により poly ADP-ribose の分解を遅延させることで DNA 一本鎖切断を ADP-ribose 抗体により検出した[93]。そして、細胞核内での ADP-ribose の蛍光強度を ImageJ ソフトウェアで定量化することで、残存している DNA 一本鎖切断を定量化した。結果として、放射線のみ照射後と比較して、PARGi+放射線照射後では全体的に ADP-ribose の蛍光強度が増加していることがわかった。そして、PARGi+放射線照射後の PNKP 抑制細胞と 4 つの PNKP 変異体発現細胞では、コントロール細胞(siCTRL)や siPNKP+PNKP 細胞と比較して、ADP-ribose 蛍光強度の有意な増加が確認できた。このことから、PNKP の細胞核内への移行能力は DNA 二本鎖切断同様、DNA 一本鎖切断の修復にも必要であり、核移行能力が欠失した PNKP を発現する細胞では放射線照射後の DNA 一本鎖切断の修復能力が低下することが明らかとなった。

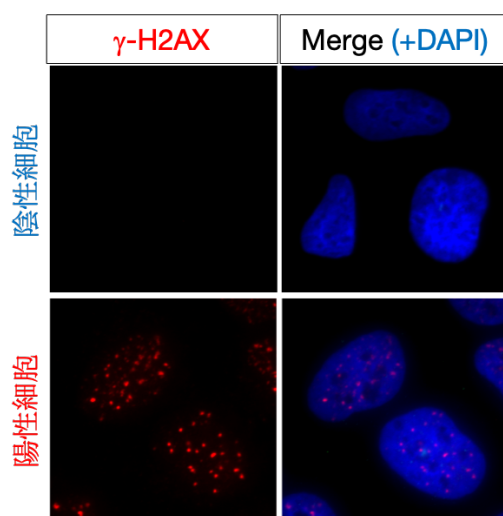
第 3.5 章では、PNKP の細胞核内移行能力が低下した 4 つの変異体 ( $\Delta$ 137-142、K138A、R139A、R141A)を用いて、PNKP の核内移行能力と細胞の DNA 損傷修復能力の関係を解析した。その結果、PNKP の核内移行能力は放射線照射後の細胞の DNA 一本鎖切断と DNA 二本鎖切断の修復において極めて重要であることがわかった。第 3.6 章では、第 3.3 章においてリンカー領域を欠損させた D2 変異体程ではな



いが、PNKP の核内での局在が有意に低下した FHA ドメイン欠損 D1 変異体について解析した。

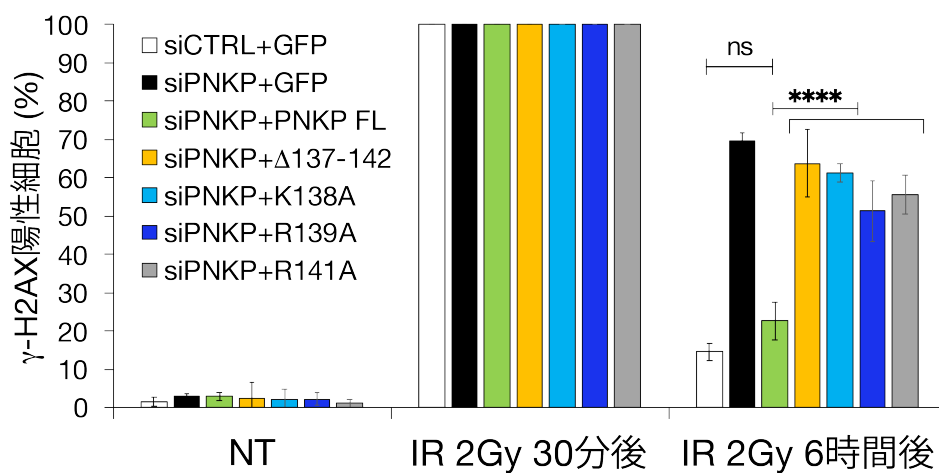


**図 3.5.1 Western Blotting による siRNA による細胞内 PNKP の発現抑制確認** : siRNA 導入後の細胞内 PNKP の発現量を Western Blotting によって解析した。siControl ではホタルが持つルシフェラーゼを標的としているため、ヒトの細胞においては相補鎖を形成する mRNA が存在せず、遺伝子発現量は変わらないとされる。PNKP の抑制には PNKP mRNA の 3'末端側に存在する非翻訳領域(UTR: Untranslated region)を標的とすることで、内在性の PNKP mRNA とのみ相補鎖を形成し、干渉するように設計した。PNKP 抗体を用いて検出を行い、siPNKP の導入により PNKP の発現抑制が起きていることが確認できた。KAP1 は細胞核内に局在するタンパク質であり、本実験ではコントロールタンパク質として使用した。各ウェルに流したタンパク質の総量は 20 $\mu$ g である。



**図 3.5.2 放射線 2Gy 照射後の  $\gamma$ H2AX による DNA 二本鎖切断の検出** : U2OS 細胞に放射線を 2Gy 照射し、30 分経過後の細胞内の  $\gamma$ H2AX を免疫染色法で検出した結果であ

る。 $\gamma$ H2AX のドット(foci)が 10 個以上存在する細胞を、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞(DNA 二本鎖切断が残存する細胞)としてカウントし、細胞の処理条件と時間経過に伴う $\gamma$ H2AX 陽性細胞割合の変化を解析した。左の赤の染色図が DNA 二本鎖切断のマーカとして用いた $\gamma$ H2AX であり、右側の図は $\gamma$ H2AX と DNA を染色する DAPI(青色染色)を重ね合わせた図である。上の陰性細胞は放射線未照射の細胞で、下の陽性細胞は放射線 2Gy 照射 30 分後の細胞で免疫染色を行った結果である。放射線照射後は $\gamma$ H2AX のドット(foci)が検出でき、DNA 二本鎖切断が蓄積していることがわかる。



**図 3.5.3 放射線 2Gy 照射後の時間経過に伴う DNA 二本鎖切断残存細胞の定量的解析結果** : U2OS 細胞に siRNA を用いて内在性 PNKP の発現抑制をした後、野生型 PNKP と 4 つの PNKP 変異体( $\Delta$ 137-142、K138A、R139A、R141A)を再発現させ、放射線照射 30 分と 6 時間後のそれぞれの条件の細胞における DNA 二本鎖切断の残存率を、 $\gamma$ H2AX foci 陽性細胞をカウントすることで定量化した結果である。NT(未処理)では $\gamma$ H2AX 陽性細胞はほとんど確認できない。放射線照射 30 分後ではどの条件の細胞でもほとんどが $\gamma$ H2AX 陽性細胞であるのに対し、6 時間後ではコントロール細胞や野生型 PNKP 再発現細胞と比較し、PNKP 抑制細胞と 4 つの PNKP 変異体発現細胞では $\gamma$ H2AX 陽性細胞の割合が有意に増加していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

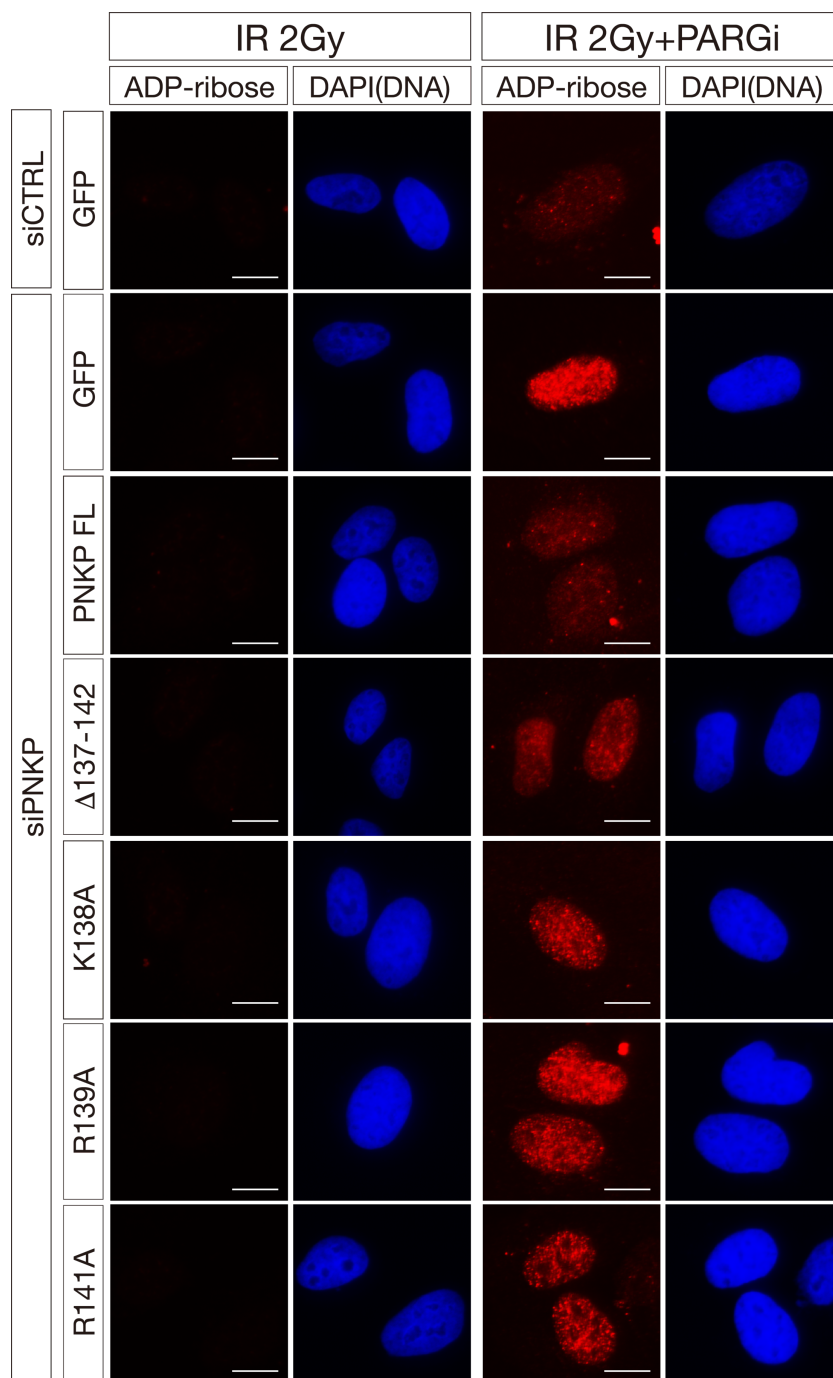


図 3.5.4 放射線 2Gy 照射後の ADP-ribose による DNA 一本鎖切断の検出結果: U2OS 細胞に放射線を 2Gy 照射し、30 分経過後の細胞内の ADP-ribose を免疫染色法で検出した結果である。左二列が放射線照射のみ、右二列が放射線照射と PARG 阻害剤(PARGi) を添加し、DNA 一本鎖切断のマーカである poly ADP-ribose の蛍光強度を増幅させた細胞である。二列の中の左の赤の染色図が DNA 一本鎖切断のマーカとして用いた ADP-ribose であり、右側の青色の図は DNA を DAPI で染色した図である。縦がそれぞれの細胞の siRNA や再導入した PNKP の条件などを示している。PARGi 添加細胞において、PNKP を抑制した細胞と 4 つの変異型 PNKP を再発現させた細胞において、赤色の蛍光強度が増加していることがわかる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

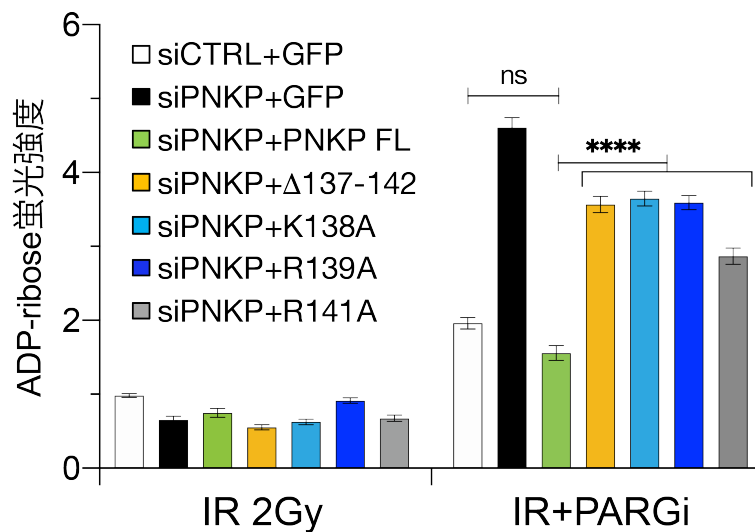


図 3.5.5 放射線 2Gy 照射後の残存 DNA 一本鎖切断の定量的解析結果 : U2OS 細胞に siRNA を用いて内在性 PNKP の発現抑制をした後、野生型 PNKP と 4 つの PNKP 変異体( $\Delta$ 137-142、K138A、R139A、R141A)を再発現させ、放射線照射 30 分のそれぞれの条件の細胞における DNA 一本鎖切断の残存率を、ADP-ribose の蛍光強度を測定することで定量化した結果である。PARG 阻害剤(PARGi)処理により poly ADP-ribose の分解を阻害することで、DNA 一本鎖切断を検出した。PARGi 処理後の放射線照射細胞では、コントロール細胞や野生型 PNKP 再発現細胞と比較し、PNKP 抑制細胞と 4 つの PNKP 変異体発現細胞では ADP-ribose の蛍光強度が有意に増加していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

## 3.6 FHA ドメインと PNKP の核小体内移行

第 3.6 章では、第 3.3 章においてリンカー領域欠損 PNKP とともに PNKP の核内での局在が減少した FHA ドメイン欠損 PNKP に関して解析した。第 4 章において後述するが、PNKP の FHA ドメインは PNKP と他のタンパク質との結合を制御するドメインであり、リン酸化された Threonine を認識することが知られている[46、51]。その中でも、PNKP FHA ドメイン内に存在する 35 番目の Arginine (R35) が FHA ドメインの構造上重要であり、リン酸化タンパク質との結合に必要であることがわかっている。そのため、R35 を Alanine:A に置換した R35A 変異体を作製し、第 3.3 章で確認できた PNKP D1 変異体の細胞核内局在の低下がタンパク質との結合に依存するものなのかを解析した。FHA ドメインに依存した PNKP の細胞核内局在とリンカー領域に依存した核内移行が独立したものなのかを解析するために、PNKP の核内移行シグナル NLS に変異を入れた K138A、K138A/R139A 変異体とダブルで変異を導入した R35A/K138A 変異体を用いて解析を行った。遺伝子導入後のタンパク質の発現両解析は Western Blotting により行った(図 3.6.1)。また、R35A 変異体と既知の PNKP 結合タンパク質(XRCC1、XRCC4)との結合の有無を解析するために GFP タグを用いた免疫沈降を行い、GFP-PNKP に結合するタンパク質を精製した後、こちらも Western Blotting により PNKP 結合タンパク質の検出を行った(図 3.6.2)。また、これらの変異体の細胞内局在は遺伝子導入 2 日後に蛍光顕微鏡により観察し、細胞核と細胞質における GFP 蛍光強度比を測定した(図 3.6.3)。野生型 PNKP と R35A 変異体を比較したもの(図 3.6.4)、K138A 変異体と R35A/K138A 変異体を比較したもの(図 3.6.5)、R35A/K138A と K138A/R139A を比較したもの(図 3.6.6)の 3 種類に分けて解析を行った。測定条件はこれまでと同様である。

図 3.6.1 の Western Blotting によるタンパク質発現量解析では、GFP 抗体と GAPDH 抗体による検出を行った。GFP 抗体の結果から、今回作製した 3 つの変異体はどれも PNKP 野生型と同程度の発現量を示していることがわかった。また、今回はアミノ酸を置換した変異体であるため、タンパク質分子量の有意な変化は確認できなかった。

図 3.6.2 の GFP タグを用いた免疫沈降と Western Blotting によるタンパク質発現量解析の結果、免疫沈降後のサンプルである IP:GFP において野生型 PNKP と K138A 変異体では XRCC1 や XRCC4 と結合しているのに対して、R35A を含む 2 つの変異体では XRCC1 と XRCC4 との結合が欠失していることがわかった。免疫沈降の後の GFP-PNKP と GFP タグ付き PNKP 変異体の発現量は Ponceau により検出した。

図 3.6.3 の蛍光観察の結果から、細胞質への局在が確認できたのは、K138A または R139A 変異を含む PNKP 変異体のみであることがわかった。リン酸化依存的なタンパク質結合を欠失した R35A 変異体では野生型 PNKP と同様に細胞核への局在が優位であり、細胞質内への局在はあまり見られないことがわかった。

しかし、図 3.6.4 の定量解析の結果から、野生型 PNKP と比較して R35A 変異体では細胞核内での PNKP の蛍光強度が有意に低下していることがわかった。そこで、蛍光観察画像を詳細に観察した結果、R35A 変異体では細胞核内の一部で発現が欠失している領域があることがわかった。

そこで、R35A 変異体が示した核内一部での局在欠失が NLS に依存したものなのか、別の経路で発生しているのかを解析するために、図 3.6.5 で K138A 変異体と R35A/K138A 変異体の定量解析を行った。その結果、R35A を欠失することにより K138A 変異体と比較しても有意に細胞核内の蛍光強度が低下することがわかった。

次に K138A のみの置換では PNKP の核内移行能力の欠失が十分でない場合を考えて、図 3.6.6 では K138A/R139A 変異体と R35A/K138A 変異体で定量解析を行った。その結果、R35A/K138A 変異体は K138A/R139A 変異体と比較しても有意に細胞核内での蛍光強度が低下していることがわかった。

これらの結果から、R35A において確認できた核内蛍光強度の減少は、FHA ドメインによるリン酸化タンパク質との結合依存的であり、リンカー領域内に存在する NLS の影響を受けていないことがわかった。そこで、PNKP の FHA ドメインを介した他のタンパク質との結合が PNKP を核小体などの細胞核内構造体への移行に関わるのではないかと仮説を立てた。

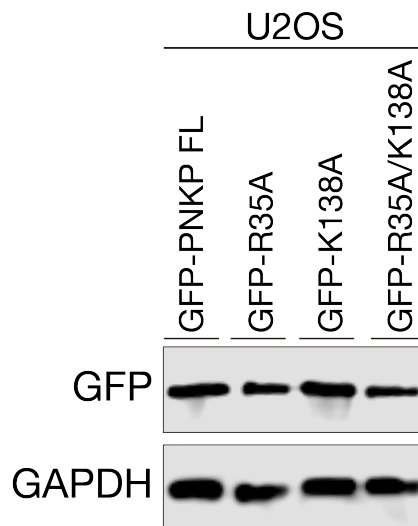


図 3.6.1 野生型 PNKP と変異型 PNKP の細胞内での発現量解析 : GFP-PNKP、作製した 3 つの PNKP 変異体を遺伝子導入し、細胞内での各タンパク質の発現量を Western Blotting によって確認した結果である。GFP 抗体を用いて検出を行い、遺伝子導入により発現させた PNKP と 3 つの変異体の発現が確認できた。GAPDH はコントロールタンパク質として使用した。各ウェルに流したタンパク質の総量は 20 $\mu$ g である。

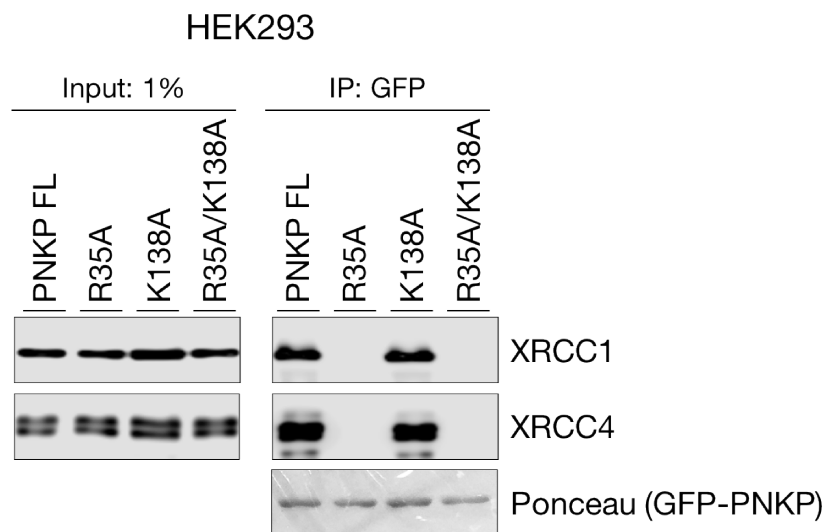


図 3.6.2 GFP タグを用いた免疫沈降法による PNKP の結合タンパク質と R35A 変異体における結合能力解析 : GFP-PNKP と作製した 3 つの GFP タグ付き PNKP 変異体を HEK293 細胞に遺伝子導入し、24 時間後に細胞内のすべてのタンパク質を回収し(Input)、免疫沈降法により GFP に結合したタンパク質のみを精製した(IP: GFP)。それぞれの条件での各タンパク質の発現量を Western Blotting によって確認した結果である。PNKP と結合することがわかっている XRCC1 と XRCC4 を検出し、R35A 変異を含む 2 つの変異

体では PNKP と XRCC1 と XRCC4 との結合が欠失していることがわかる。免疫沈降前の細胞溶出液は 1% Input コントロールとして使用した。Ponceau はタンパク質を染色しており、免疫沈降後の過剰発現させた GFP-PNKP タンパク質の量を検出した。

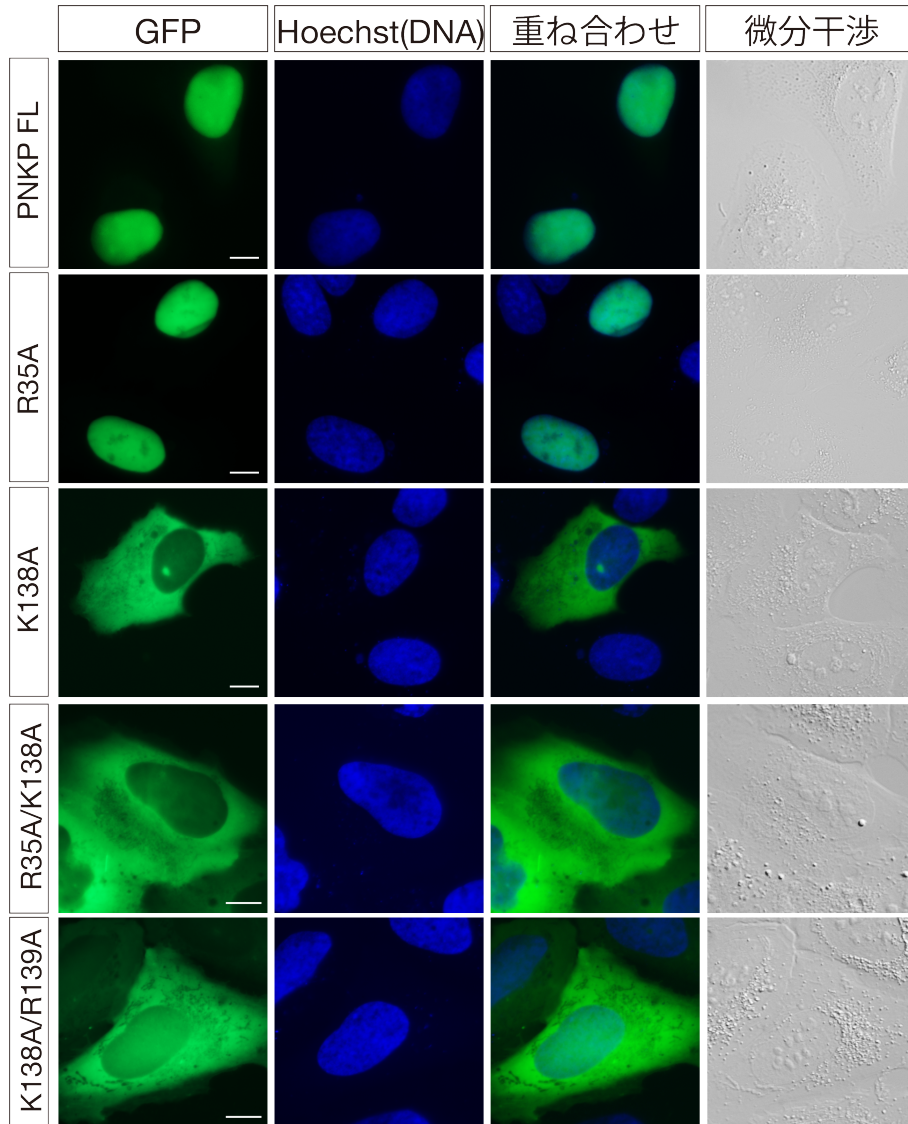


図 3.6.3 作製した 4 つの PNKP 変異体の蛍光顕微鏡観察画像： U2OS 細胞に野生型 PNKP と 4 つの PNKP 変異体(R35A、K138A、R35A/K138A、K138A/R139A)をリポフェクション法により遺伝子導入し、2 日後に蛍光顕微鏡観察した結果である。左から GFP 蛍光の観察、細胞核 (Hoechst: DNA)の観察、GFP と細胞核の重ね合わせ画像、微分干渉画像である。K138A、K138A/R139A 変異体において細胞質への局在が優位になることが観察できる。また、R35A 変異体では、細胞核内の一部のみで PNKP の局在が低下していることがわかる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。



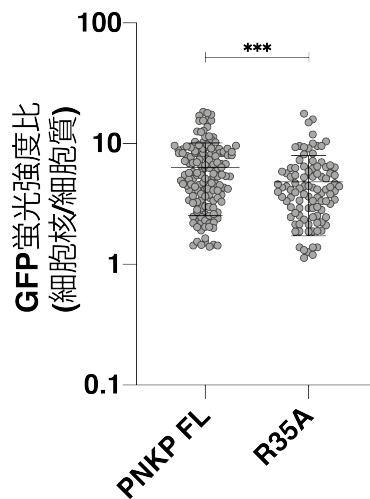


図 3.6.4 野生型 PNKP と PNKP R35A 変異体の細胞核と細胞質内 GFP 蛍光強度比: 図 3.6.3 の中から、野生型 PNKP と R35A 変異体の緑色蛍光を Image J ソフトウェアにより定量化した結果である。細胞核内と細胞質の GFP 蛍光強度を測定し、その比を求めた。R35A 変異体では野生型 PNKP と比較して、細胞核内での局在が有意に減少していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

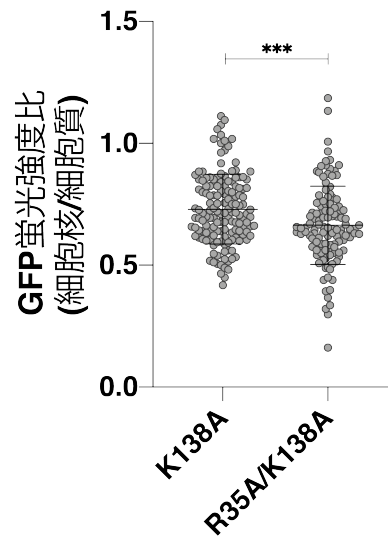
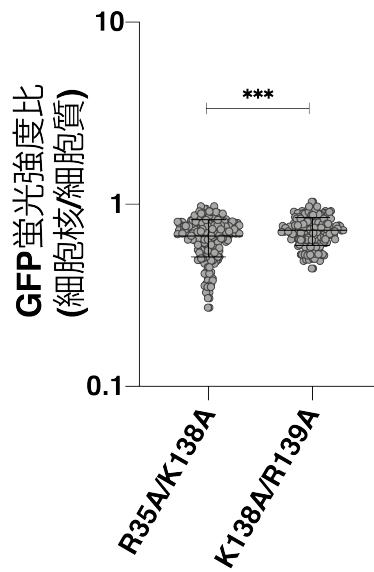


図 3.6.5 PNKP K138A 変異体と PNKP R35A/K138A 変異体の細胞核と細胞質内 GFP 蛍光強度比： 図 3.6.3 の中から、K138A 変異体と R35A/K138A 変異体の緑色蛍光を Image J ソフトウェアにより定量化した結果である。細胞核内と細胞質の GFP 蛍光強度を測定し、その比を求めた。R35A/K138A 変異体では K138A 変異体と比較して、細胞核内での局在が有意に減少していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。



**図 3.6.6 R35A/K138A 変異体と K138A/R139A 変異体の細胞核と細胞質内 GFP 蛍光強度比**： 図 3.6.3 の中から、R35A/K138A 変異体と K138A/R139A 変異体の緑色蛍光を Image J ソフトウェアにより定量化した結果である。細胞核内と細胞質の GFP 蛍光強度を測定し、その比を求めた。R35A/K138A 変異体では K138A/R139A 変異体と比較して、細胞核内での局在が有意に減少していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

図 3.6.1 から図 3.6.6 までの結果より、PNKP は他のタンパク質とのリン酸化依存的な結合を介して、細胞核内の核小体などの核内構造体に局在している可能性が示唆された。核小体は、タンパク質合成を制御するリボソームの構成物質であるリボソーム RNA を生成する機能を持った核内構造体である。核小体は、近年がん細胞や老化細胞において核小体の数や大きさに異常が出ることで報告されており、注目されている核内構造体である。もし、PNKP が結合したタンパク質に誘導され核小体内に局在するのであれば、PNKP の新たな機能を明らかにする可能性がある。そこで、蛍光観察により、PNKP の核内での局在の詳細を観察した(図 3.6.7)。さらに、核小体タンパク質である Fiblliralin と赤色蛍光タンパク質である mCherry との融合タンパク質発現ベクターを作製し、GFP-PNKP と R35A 変異体と同時に細胞へ遺伝子導入、蛍光観察により PNKP と Fiblliralin の局在の解析を行った(図 3.6.8)。さらに、細胞核と核小体内での蛍光強度を ImageJ ソフトウェアにより測定し、核小体/細胞核での蛍光強度比を定量化解析した(図 3.6.9)。

図 3.6.7 では、微分干渉観察により細胞核内の核小体を観察し、その部分に PNKP と R35A 変異体が局在するのかを解析した。微分干渉画像内の破線で囲んだ領域が核小体である。その結果、野生型の PNKP は核小体内に強く局在しており、R35A 変異体では明らかに核小体内での緑色蛍光強度が低下していることがわかった。

さらに、図 3.6.8 ではより正確に核小体での局在を観察するため、核小体に局在することが既にわかっている Fiblliralin を生細胞内において赤色蛍光で同時観察し、PNKP と R35A 変異体の局在の詳細を観察した。その結果、野生型 PNKP と Fiblliralin が共局在していることと、R35A 変異体は Fiblliralin との共局在が欠失することを突き止めた。

また、図 3.6.9 に示した定量解析の結果からも、野生型 PNKP の核小体/細胞核での緑色蛍光強度比は 1 を超えることから、核小体に強く局在すること、R35A 変異体では 1 を下回るため核小体への局在が欠失することがわかった。

第 3.6 章では、PNKP の FHA ドメインが、リンカー領域の核内移行シグナルとは別の機構で PNKP を細胞核内、特に核小体などに局在させる機構を持つことが明らかになった。この制御機構には、PNKP と他のリン酸化タンパク質との結合を司る R35 が関与していることから、PNKP の結合パートナーがタンパク質結合を介して PNKP を細胞核内、そして核小体内まで運んでいることが示唆された。そして、PNKP が核小体内に強く局在することから、PNKP が核小体においてこれまでに報告されていない未知の機能を持つことが示唆された。

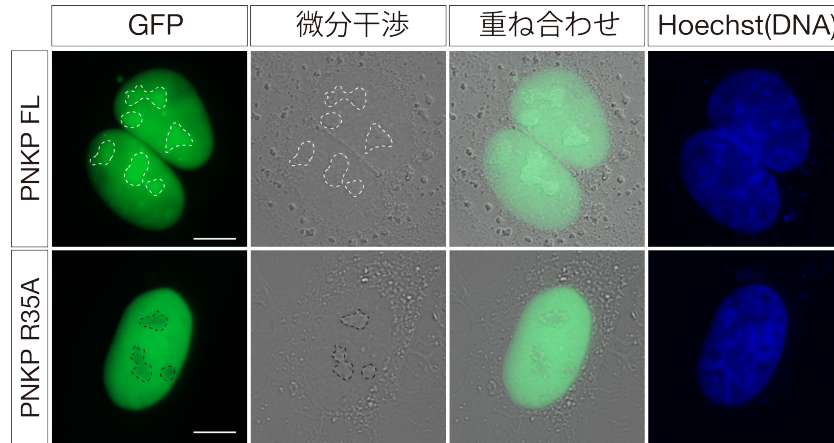


図 3.6.7 野生型 PNKP と R35A 変異体の生細胞での蛍光顕微鏡観察画像(微分干渉画像)： U2OS 細胞に野生型 PNKP と R35A 変異体をリポフェクション法により遺伝子導入し、2 日後に蛍光顕微鏡観察した結果である。左から GFP 蛍光の観察、微分干渉観察画像、GFP と微分干渉画像の重ね合わせ画像、細胞核 (Hoechst: DNA) の観察画像である。微分干渉画像内の破線は核小体の領域を示している。野生型 PNKP が破線内での局在が強いのにに対して、R35A 変異体では、破線部分内での蛍光が減少していることがわかる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

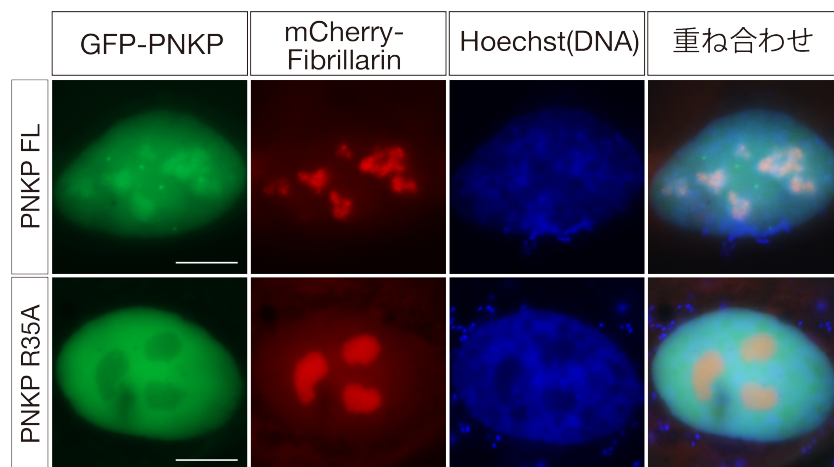


図 3.6.8 野生型 PNKP と R35A 変異体の生細胞での蛍光顕微鏡観察画像(核小体タンパク質 Fibrillarin との同時観察)： U2OS 細胞に野生型 PNKP と R35A 変異体、さらに核小体タンパク質である Fibrillarin と赤色蛍光タンパク質である mCherry の融合タンパク質発現ベクターをリポフェクション法により同時に遺伝子導入し、2 日後に蛍光顕微鏡観察した結果である。左から緑色蛍光観察、赤色蛍光観察、細胞核 (Hoechst: DNA) の観察画像、3 つの蛍光を重ね合わせた画像である。Fibrillarin は核小体タンパク質であり、赤色蛍光の強い領域が核小体を示している。野生型 PNKP では Fibrillarin と共局在しているのにに対して、R35A 変異体では、Fibrillarin 局在領域内での蛍光が明らかに減少していることがわかる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

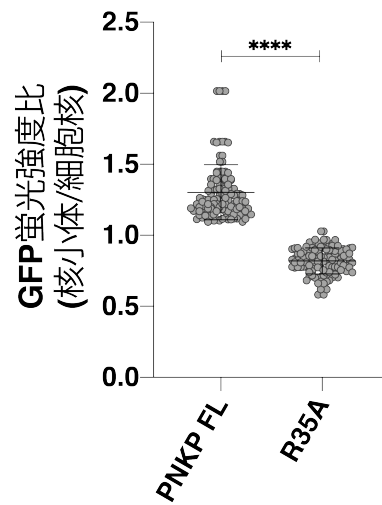


図 3.6.9 野生型 PNKP と R35A 変異体の核小体と細胞核 GFP 蛍光強度比： 図 3.6.8 の核小体内と細胞核の緑色蛍光強度を Image J ソフトウェアにより定量化した結果である。核小体内と細胞核内の GFP 蛍光強度を測定し、その比を求めた。R35A 変異体では野生型 PNKP と比較して、核小体内の局在が有意に減少していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

## 3.7 第3章のまとめ

本章では、「DNA 修復因子 PNKP の細胞内局在の制御機構を解明すること」を目的として、以下4つの実験項目を実行し、以下の内容を明らかにした。

### 1) GFP-PNKP の構築とライブセルイメージング系の確立 (3.2 章)

第3.2章では、遺伝子工学技術により GFP-PNKP 融合タンパク質を発現するベクターを構築し、生細胞内で GFP の蛍光を用いて PNKP の局在を観察するライブセルイメージングの実験系を確立した。

### 2) PNKP の細胞核内移行シグナル(NLS)の同定 (3.3 章、3.4 章)

第3.3章では、ライブセルイメージングと PNKP の領域欠損体を用いることで、PNKP のリンカー領域が細胞核内への移行において重要な役割を持つことを明らかにした。

第3.4章では、*In silico* 解析により、PNKP リンカー領域内に他のタンパク質を持つ既知の核内移行シグナルと非常に類似し、生物種間でも高度に保存されているアミノ酸領域 137-142 を同定し、その中のアミノ酸 K138、R139、R141 が PNKP の細胞核内への移行に必要な領域(NLS)であることを明らかにした。

### 3) PNKP の核内移行と DNA 修復への寄与 (3.5 章)

第3.5章では、PNKP の細胞核内移行能力を欠失させた変異体を用いて、PNKP の核内移行能力と細胞の DNA 損傷修復能力の関係を解析した。その結果、PNKP の核内移行能力は放射線照射後の DNA 損傷修復において極めて重要であることを解明した。

### 4) PNKP の核小体局在の制御機構 (3.6 章)

第3.6章では、生細胞内での核小体タンパク質 Fiblliralin との同時観察により、PNKP が FHA ドメイン内の R35 を介して他のタンパク質と結合し、核小体内へ誘導され、強く局在していることを明らかにした。そして、この制御機構はリンカー領域の NLS とは独立して制御されていることを解明した。

これらの結果を統合すると、PNKP は通常時から細胞核内に局在することで、放射線などにより DNA 二本鎖切断や DNA 一本鎖切断などの DNA 損傷が発生した時に、迅速に修復できるようにしていることがわかった。そして、その細胞内局在はリンカー領域内の核移行シグナル(アミノ酸領域 138-141)によって制御されていること

を明らかにした。また、PNKPはFHAドメインによるタンパク質結合を介して細胞核の核小体内に独立した制御機構で誘導される。核小体の中にはリボソームDNAやリボソームRNAと呼ばれる核酸が存在する。このことから、核酸脱リン酸化・リン酸化酵素であるPNKPは核小体内のDNAやRNAの修復にも関わる可能性が示唆された。また、リボソームDNA損傷などの核小体ストレスは核小体異常、そして細胞のがん化や老化に関わることが知られており[94、95]、PNKPががん化や老化の防止に関わっている可能性が併せて示唆された(図3.7)。

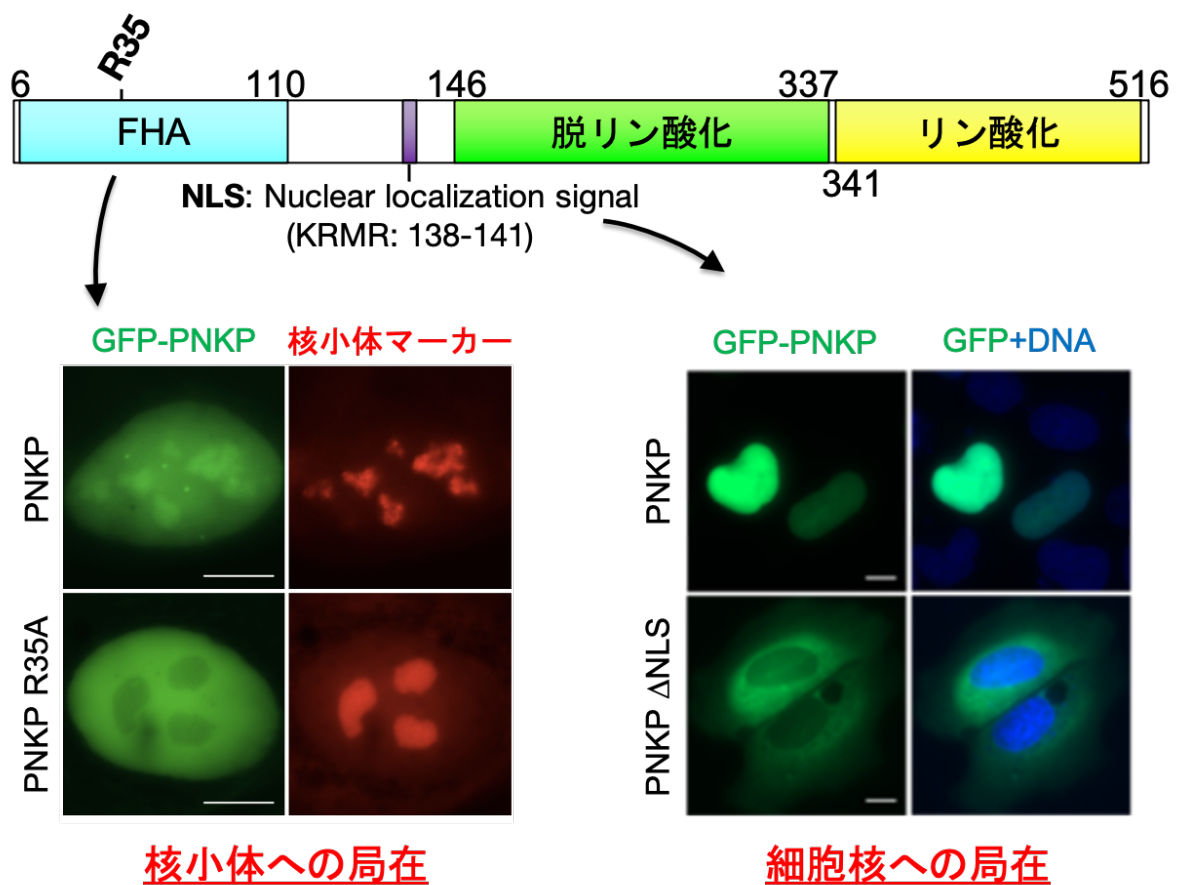


図3.7 細胞内でのPNKP局在の制御機構：PNKPはR35によるタンパク質間相互作用により核小体内に強く局在する。また、リンカー領域内のアミノ酸領域138-141によって細胞核内へ局在し、核内でDNA損傷が生じた場合に迅速に対応できるようにしている。



## 第 4 章

# Laser micro-irradiation 法を用いた DNA 損傷部位への PNKP 集積動態 解析

## 4.1 第4章の目的

DNA 損傷応答は、数百ものタンパク質が関わる細胞応答の一つであり、一連のタンパク質間相互作用によって制御されている。タンパク質間相互作用は、リン酸化などの翻訳後修飾によるタンパク質状態の時間的な制御や、結合タンパク質を目的地としたタンパク質動員といった空間的な制御という役割を持ち、膨大な数のタンパク質間相互作用が複雑に絡み合うことで DNA 損傷応答が時空間的に制御されている。そして、DNA 損傷応答は単細胞生物より多細胞生物と生物の分化・進化、構造の高度化に伴い急速に複雑化しており、アポトーシスなどは異常な細胞の無秩序な増殖(がん化)を抑制するための多細胞生物特有の細胞応答機構だと考えられている。このような多細胞化に伴う DNA 損傷応答の制御機構の違いに関しては不明な部分が多いが、細胞のがん化や遺伝病発症のメカニズム解明に向けた重要なミッシングリンクであると考えられる。

第1章で述べたように PNKP の酵素活性ドメインは T4 バクテリオファージなどのファージから無脊椎動物、そして脊椎動物に渡り多くの生物種で共通して存在しているが、FHA ドメインとリンカー領域は高等生物種への進化の過程で獲得された領域である。つまり、高等生物への進化に伴うゲノム DNA サイズの増加や複雑化によって必要となった複雑な DNA 修復や DNA 複製、細胞周期制御、アポトーシスなどの細胞応答に必要なために FHA ドメインとリンカー領域は追加されたのではないかと仮説を立てた。本章ではその中でも PNKP とリン酸化タンパク質との結合を司る FHA ドメインの機能・重要性に着目して研究を進めた。

本章の目的は、「タンパク質間相互作用の観点から DNA 損傷部位への PNKP 集積の制御メカニズムを明らかにすること」である。さらに、PNKP の DNA 損傷部位への集積能力が最終的な DNA 修復や細胞のゲノム安定性維持に与える影響を明らかにすることを旨とする。そのために、以下の4点を解析する。

- 1) 生細胞への Laser micro-irradiation による DNA 損傷誘導系の確立 (4.2 章)
- 2) PNKP の DNA 損傷応答に必要なアミノ酸の同定 (4.3 章)
- 3) DNA 損傷部位への PNKP 集積の時空間的制御機構 (4.4 章、4.5 章)
- 4) Arg35/Arg48 のゲノム安定性維持における重要性 (4.6 章)

また、4.7 章ではこれらの結果を踏まえた考察を示す。

## 4.2 Laser micro-irradiation 法による DNA 損傷応答の可視化

本章では、DNA 損傷応答における PNKP の制御メカニズムをタンパク質間相互作用の観点から明らかにすることを目的としている。既往の DNA 損傷応答因子の制御メカニズム研究において、最も一般的な研究方法は放射線や DNA 損傷を誘導する薬剤などを用いて、細胞内に DNA 損傷を人為的に誘導し、DNA 損傷発生部位に集積するタンパク質の挙動を解析する方法である[96]。しかし、PNKP は細胞核内での発現量が極めて多く、既往の方法で誘導した DNA 損傷部位には差を識別できるレベルでは集積しない。そこで、本章ではまず DNA 損傷応答部位での PNKP 集積を可視化できるような実験系を確立した。具体的には、第 3 章で作製した GFP タグ付きの PNKP を生細胞内で発現させた細胞に共焦点レーザー顕微鏡を用いて、細胞核内の微小領域のみに 405nm のレーザーを照射することで DNA 損傷を誘導、その後の DNA 損傷部位への PNKP の集積挙動を緑色蛍光強度で可視化する Laser micro-irradiation 法を確立した。さらに、第 3 章でも用いた PNKP の各領域の欠失変異体(D1: FHA ドメイン欠失、D2: リンカー領域欠失、D3: 脱リン酸化ドメイン欠失、D4: リン酸化ドメイン欠失)を用いて、Laser micro-irradiation 法を行うことで、PNKP の DNA 損傷部位への集積に必要な領域を生細胞内で解析した(図 4.2.1)。また、レーザー照射部位の緑色蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、野生型 PNKP とそれぞれの領域欠失変異体で比較した(図 4.2.2)。野生型 PNKP と 4 つの PNKP 変異体の細胞内での発現量は Western Blotting 法で解析した(図 4.2.3)。

まず、図 4.2.1 上は使用した GFP-PNKP と 4 つの PNKP 欠損変異体のドメインマップである。図内の数字はそれぞれの領域のアミノ酸番号と欠失しているアミノ酸領域を示している。図 4.2.1 下は、これらの GFP タグ付きの PNKP を細胞内で発現させ、実際に Laser micro-irradiation により細胞核内の一部に DNA 損傷を誘導し、60 秒後までのそれぞれの PNKP の集積挙動を観察したものである。赤色の矢印の間の線上に 405nm のレーザーを 0.25 秒照射し、DNA 損傷を誘導した。0s は 0 秒を表しており、レーザー照射前の GFP-PNKP の蛍光観察画像である。そして、その後 0.25 秒のスキャンにより赤色矢印間に DNA 損傷を発生させ、その後 1-60 秒の GFP-PNKP の集積挙動を観察した蛍光画像である。また、レーザー照射の 30 分前には DNA 損傷の増感剤として Hoechst を添加後再び培養した。一番上の野生型の PNKP を発現した細胞ではレーザー照射の 3 秒後には、レーザーライン上に PNKP が集積していることがわかる。そして、時間の経過に伴いレーザーライン上の

GFP-PNKP の蛍光強度が増加しており、DNA 損傷部位への集積量が増加していくことがわかった。しかし興味深いことに、FHA ドメインを欠失した D1 変異体はレーザー照射後のレーザーライン上に GFP-PNKP の集積が見られなくなることがわかった。また、PNKP の D2、D3、D4 変異体においてはレーザー照射後、レーザーライン上に集積することがわかった。

そこで、図 4.2.2 では図 4.2.1 の蛍光観察の結果を Leica LASX ソフトウェアで定量化した。その結果野生型 PNKP(FL)では、レーザー照射後に DNA 損傷部位での GFP-PNKP の蛍光強度が秒単位で増加し始め、約 30 秒後にピークとなり 60 秒まで平衡状態に入ることがわかる。それに対して、PNKP の 4 つの領域欠失変異体 (D1、D2、D3、D4 変異体)の全てにおいて、野生型の PNKP と比較すると蛍光強度の低下は見られた。その中でも特に、D1 変異体ではレーザー照射後の GFP 蛍光強度の増加が観察できず、DNA 損傷部位への集積能力をほぼ完全に消失することが明らかになった。つまり、PNKP は DNA 損傷の約数秒後には動員されており、この動員には FHA ドメインを介したタンパク質間相互作用が必須であることが明らかとなった。

図 4.2.3 では、野生型 PNKP とこれら 4 つの PNKP 欠失変異体の発現量を Western Blotting 法で解析した。GFP 抗体で野生型 PNKP と 4 つの変異体の発現量を解析した結果、第 3 章での結果と同様に、D3 変異体で安定性の低下に伴う細胞内存在量の低下が確認できた。また、ローディングコントロールとして用いた PCNA 抗体ではどの細胞でも同様のプロットが確認できた。

第 4.2 章では、PNKP の DNA 損傷部位への集積挙動を秒単位で可視化することが可能な Laser micro-irradiation の実験系を確立し、野生型の PNKP と 4 つの PNKP 変異体の DNA 損傷部位への集積挙動を解析した。その結果、PNKP と FHA ドメインを介したリン酸化タンパク質との結合が DNA 損傷部位への集積に必要不可欠であることを突き止めた。そこで第 4.3 章では、FHA ドメインの中でも特にどのアミノ酸が PNKP の DNA 損傷応答に関わるのかを解析する。

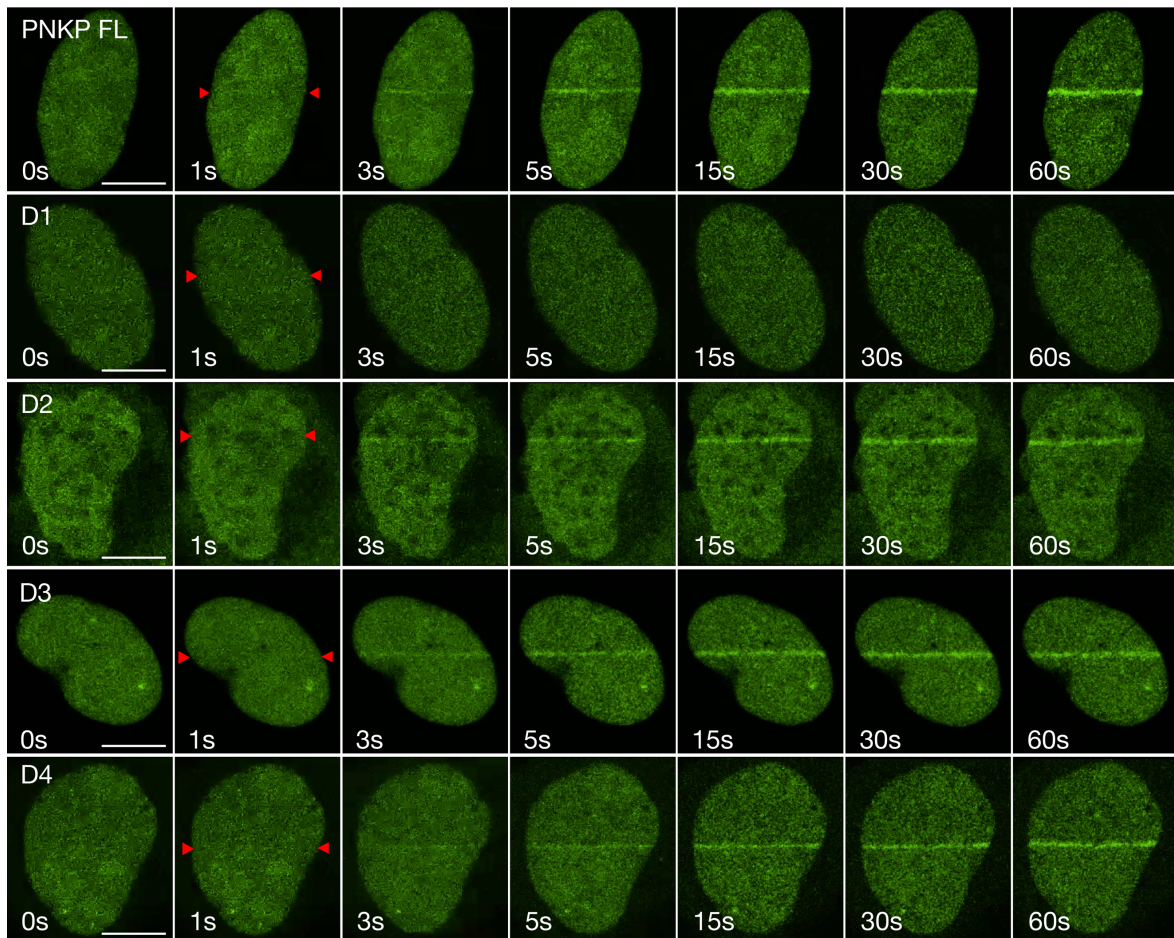
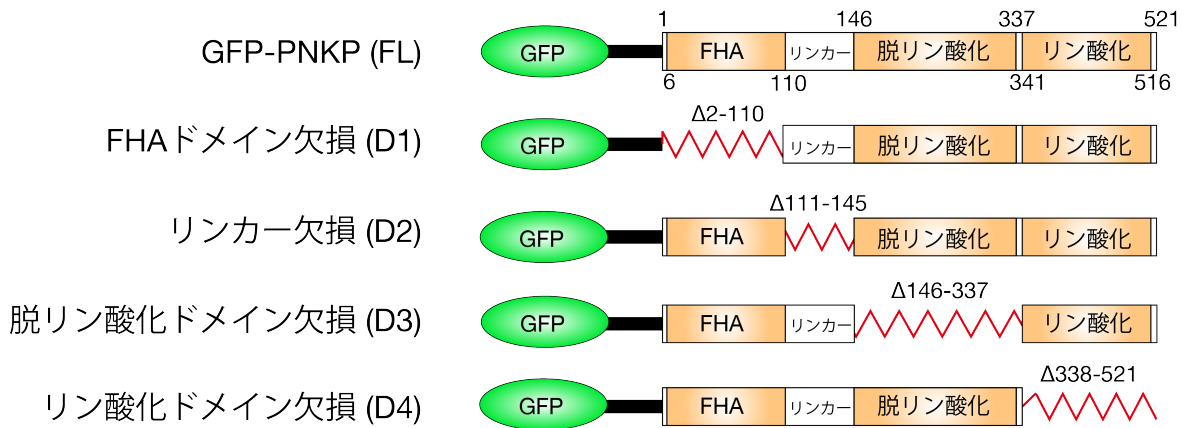


図 4.2.1 PNKP の DNA 損傷応答に関わる領域の解析 : (上) PNKP の DNA 損傷応答における各領域の重要性を解析するために GFP-PNKP 発現ベクターをミュータジェネシス PCR 法により改変し、各領域の欠損変異体(D1: FHA ドメイン欠損、D2: リンカー領域欠損、D3: 脱リン酸化ドメイン欠損、D4: リン酸化ドメイン)を作製した。各変異体ではそれぞれの図に示した数字のアミノ酸領域を欠失させた。(下) 作製した GFP-PNKP と 4 つの PNKP 変異体を生細胞内で発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、赤色の矢印の間に 405nm のレーザーを 0.25 秒照射し、DNA 損傷を誘導した。レーザー照射の 30 分前には DNA 損傷の増感剤として Hoechst を添加し、再度 CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C で培

養した。レーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に緑色蛍光観察画像を撮影し、図は照射前(0s)、1 秒、3 秒、5 秒、15 秒、30 秒、60 秒での観察画像である。レーザー照射後に秒単位で GFP-PNKP が集積していることがわかる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

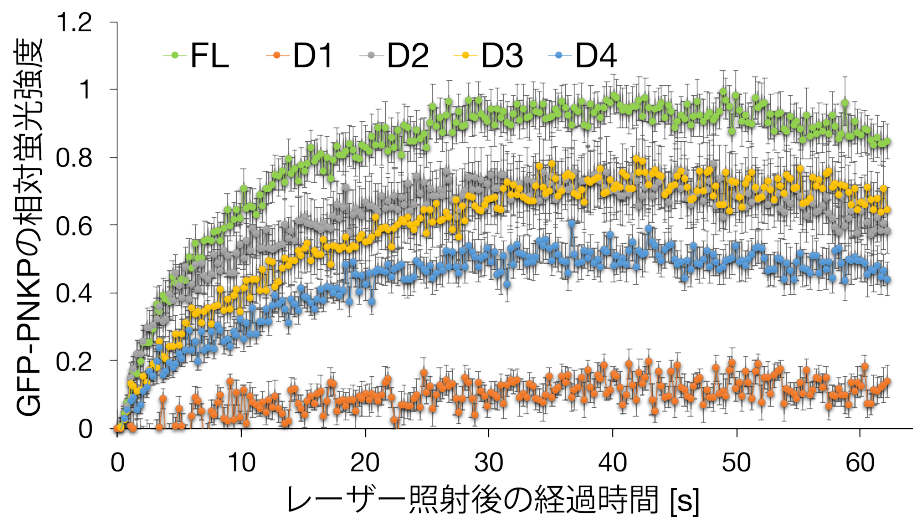
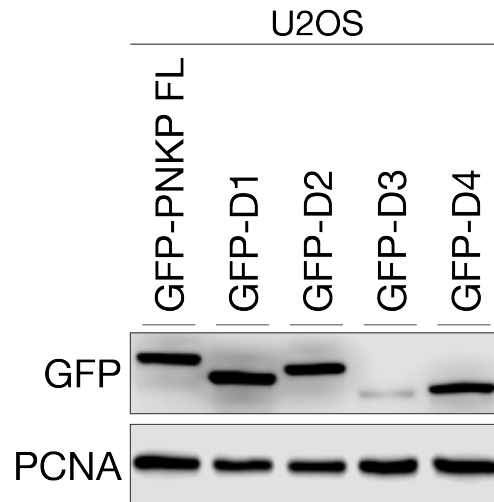


図 4.2.2 PNKP と 4 つの PNKP 変異体の DNA 損傷部位への集積挙動の定量解析結果:

図 4.2.1 下で行った Laser micro-irradiation 後のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、野生型 PNKP と 4 つの PNKP 変異体での蛍光強度を比較した結果である。蛍光観察画像はレーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に撮影し、1 細胞当たり合計約 250 枚の蛍光観察画像を定量化解析した。それぞれの条件毎に約 20 細胞で実験を行い、その平均値をそれぞれのプロット、標準誤差をエラーバーとしてグラフを作成した。縦軸の GFP-PNKP 相対蛍光強度はレーザー照射前後での蛍光強度差を、バックグラウンド領域の蛍光強度で割ることで求めた。横軸はレーザー照射後の経過時間を表している。



**図 4.2.3 Western Blotting による野生型 PNKP と 4 つの PNKP 変異体の発現量解析 :**  
 U2OS 細胞に GFP-PNKP、作製した 4 つの PNKP 変異体を遺伝子導入し、細胞内での各タンパク質の発現量を Western Blotting によって確認した結果である。GFP タグを付けたタンパク質であるため、GFP 抗体を用いた検出を行った。GFP 抗体による検出で、遺伝子導入により発現させた野生型 PNKP と 4 つの変異体が確認できた。PCNA 抗体はローディングコントロールとして使用した。各ウェルに流したタンパク質の総量は 20 $\mu$ g である。

## 4.3 PNKP の DNA 損傷部位への集積に必要なアミノ酸の同定

第 4.3 章では、FHA ドメインが制御する PNKP の DNA 損傷部位への集積機構の詳細を解析するため、FHA ドメインの中でも特にどのアミノ酸が重要なのかを解析する。FHA ドメインは、DNA 二本鎖切断のセンサー複合体の一つである NBS1 や DNA 損傷応答のメディエーターと考えられている MDC1 など多くの DNA 損傷応答タンパク質の中で保存されているドメインであり、リン酸化したタンパク質との結合を制御することがわかっている[97、98]。そして、それらの FHA ドメインの構造を解析すると、FHA ドメインの中央付近に存在する Arginine がしばしば FHA ドメインとリン酸化タンパク質との結合を構造的に支えるための中心となっていることがわかった。そこで、PNKP の FHA ドメイン内のアミノ酸配列を哺乳類から魚類まで様々な生物種間で比較すると、35 番目と 48 番目の Arginine が極めて高度に保存されており、PNKP FHA ドメインの結合中心となる可能性が示唆された(図 4.3.1)。これらのアミノ酸の重要性を解析するためにミュータジェネシス PCR 法を用いて、3 つの変異体 (R35A、R48A、R35A/R48A) を作製した(図 4.3.2)。3 つの PNKP 変異体を U2OS 細胞に遺伝子導入し、Laser micro-irradiation 法により DNA 損傷部位への集積挙動を観察した(図 4.3.3)。また、DNA 損傷部位での GFP-PNKP の蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化・比較した(図 4.3.4)。野生型 PNKP と 3 つの PNKP 変異体の細胞内での発現量は Western Blotting で解析した(図 4.3.5)。さらに、作製した 3 つの FHA ドメイン変異体の既知の PNKP 結合タンパク質(XRCC1、XRCC4)との結合能力は、GFP を用いた免疫沈降と Western Blotting により解析した(図 4.3.6)。

図 4.3.1 と図 4.3.2 から、PNKP FHA ドメイン内の様々な生物種間で高度に保存されている 35 番目と 48 番目の Arginine (R35、R48) の Alanine (A) への置換変異体を作製した。Arginine を Alanine に置換することでアミノ酸のポジティブチャージが欠失した変異体となる。

図 4.3.3 では、これらの GFP-PNKP と 3 つの FHA ドメイン変異体を細胞内で発現させ、実際に Laser micro-irradiation により細胞核内の一部に DNA 損傷を誘導し、60 秒後までの GFP の集積挙動を観察したものである。実験方法の詳細はこれまでと同様である。興味深いことに、3 つの FHA ドメイン変異体では FHA ドメインを欠失した D1 変異体と同様に、レーザー照射後のレーザーライン上への GFP-PNKP の



集積が見られなくなることがわかった。特に R35A と 2RA 変異体において顕著に減少する。

図 4.3.4 では、図 4.3.3 のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化した結果である。その結果 3 つすべての FHA ドメイン変異体において、有意な DNA 損傷部位への集積量低下が確認できた。特に R35A と 2RA 変異体では D1 変異体と同程度まで、DNA 損傷部位での GFP 蛍光強度が低下することが明らかになった。

図 4.3.5 では、野生型 PNKP とこれら 3 つの FHA ドメイン変異体の発現量を Western Blotting 法で解析した。GFP 抗体で野生型 PNKP と 3 つの変異体の発現量を解析した結果、全てのサンプルにおいて同程度の発現量が確認できた。また、ローディングコントロールとして用いた PCNA 抗体でも同様のプロットが確認できた。

図 4.3.6 での GFP タグを用いた免疫沈降と Western Blotting によるタンパク質発現量解析の結果、免疫沈降後のサンプルである IP:GFP において野生型 PNKP では XRCC1 や XRCC4 と結合しているのに対して、GFP 単体と 2RA 変異体では XRCC1 や XRCC4 と結合がしないことがわかった。免疫沈降の前後での GFP、GFP-PNKP と GFP-PNKP 2RA 変異体の発現量は GFP 抗体により検出した。

第 4.3 章では、Arg35 と Arg48 が PNKP とリン酸化タンパク質との結合を制御するアミノ酸であることを明らかにした。さらに、これらのアミノ酸に変異を入れた PNKP は DNA 損傷が発生しても DNA 損傷部位へ集積できなくなることが明らかになった。つまり、PNKP の Arg35 と Arg48 を介したタンパク質間結合により、DNA 損傷部位への集積が制御されていることがわかった。第 4.4 章では、siRNA によるタンパク質発現抑制などにより、FHA に結合するタンパク質に異常が発生した場合の PNKP の DNA 損傷部位への集積能力を解析する。

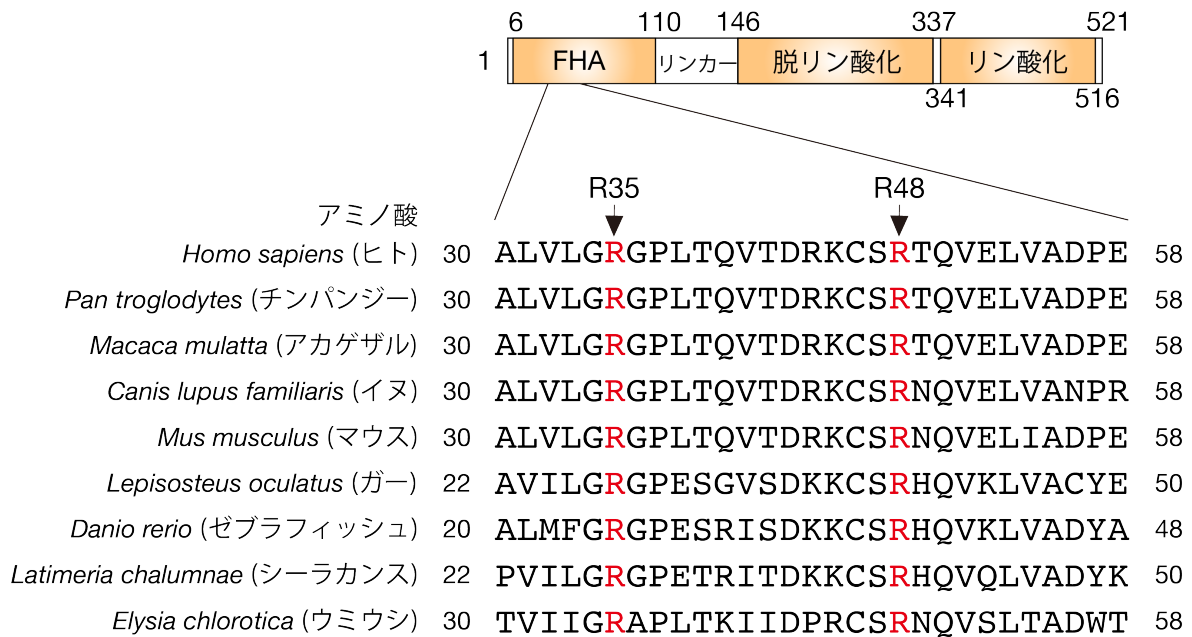


図 4.3.1 PNKP FHA ドメインの様々な生物種間でのアミノ酸保存性解析：PNKP FHA ドメインの生物種間(ヒト、チンパンジー、アカゲザル、イヌ、マウス、ガー、ゼブラフィッシュ、シーラカンス、ウミウシ)でのアミノ酸保存性を解析した結果である。赤で示された 2 つの Arginine (35 番目と 48 番目、R35/R48)が、高度に保存されていることがわかる。Arginine(R)はポジティブチャージをもつアミノ酸であり、FHA ドメインとリン酸化タンパク質との結合では Arginine がタンパク質間結合の重要な役割を果たすことがわかっている。PNKP の FHA ドメインでは、R35 と R48 が結合中心である可能性が高いため、この 2 つのアミノ酸に着目して研究を進めた。各生物種でのアミノ酸配列は NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/homologene/>)より取得した。アミノ酸配列のアライメントには MEGAX を用いた。

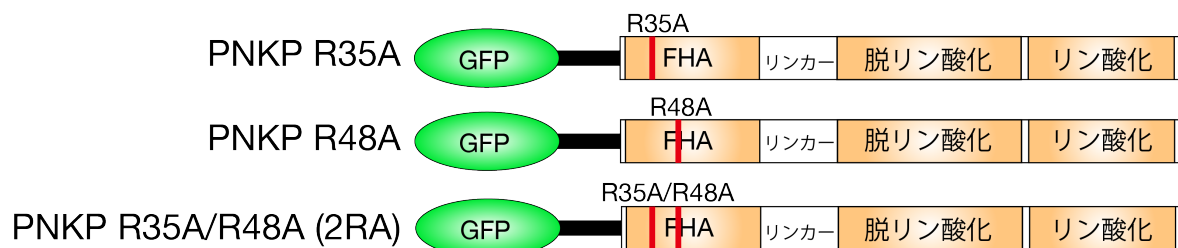
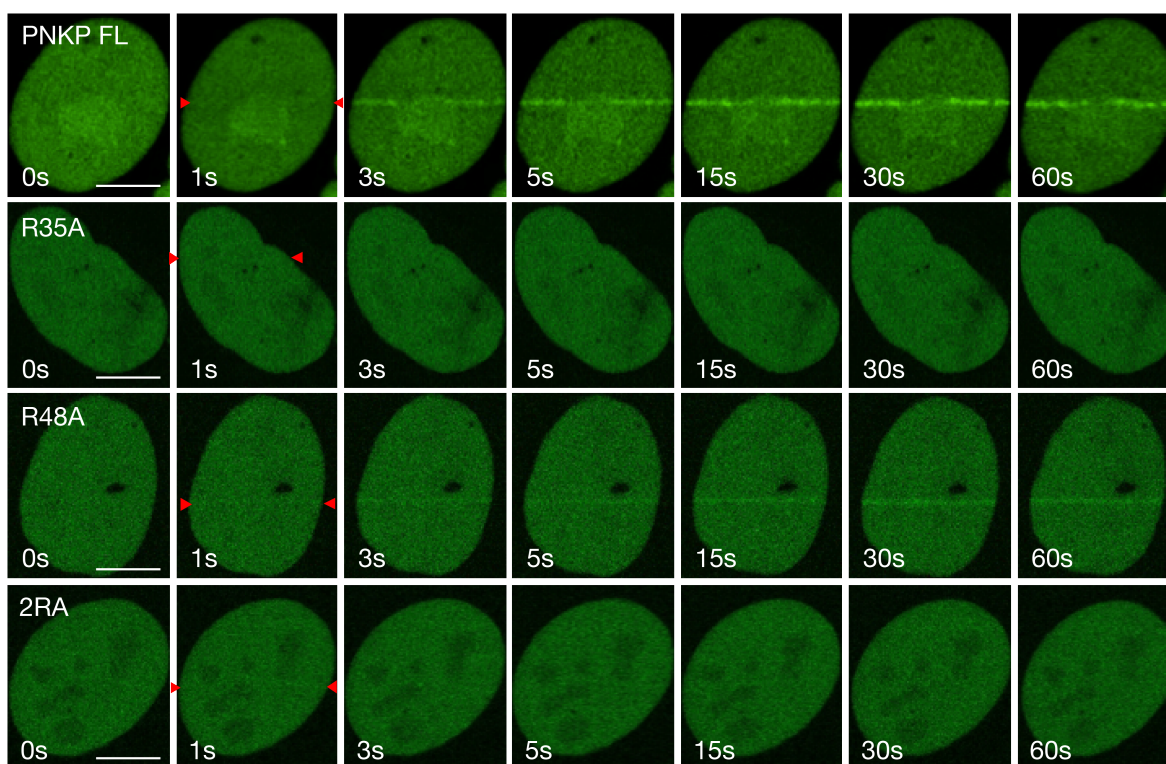
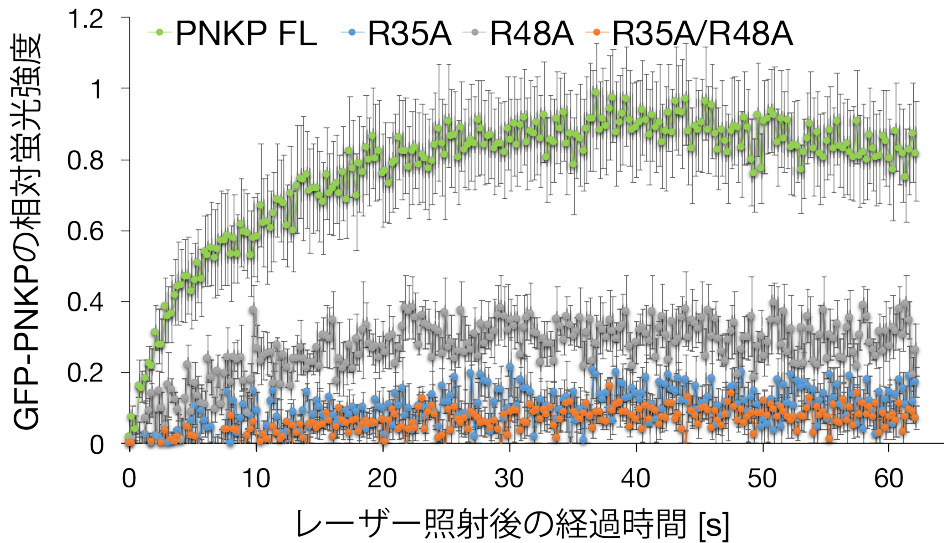


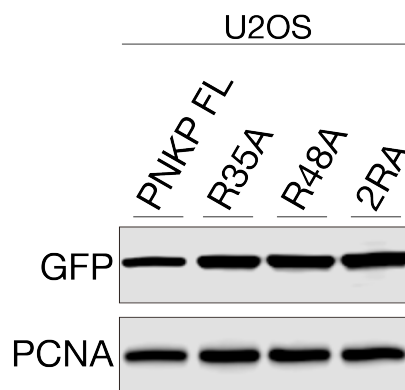
図 4.3.2 PNKP FHA ドメイン内の高度に保存された 2 つの Arginine を Alanine に置換した 3 つの変異体作製結果：PNKP FHA ドメインの R35 と R48 の DNA 損傷応答における重要性を解析するために GFP-PNKP 発現ベクターをミュータジェネシス PCR 法により改変し、Arginine: R を Alanine: A に置換した 3 つの変異体(R35A、R48A、R35A/R48A)を作製した。Alanine 変異体では Arginine 特有のポジティブチャージを欠失した変異体となる。



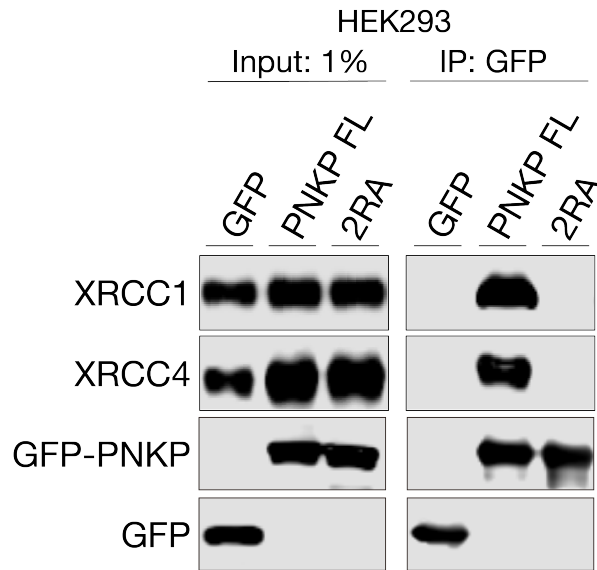
**図 4.3.3 3つの PNKP FHA 変異体の DNA 損傷部位への集積動態観察結果:GFP-PNKP**  
 と作製した 3 つの PNKP FHA ドメイン変異体を生細胞内で発現させ、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、赤色の矢印の間に 405nm のレーザーを 0.25 秒照射し、DNA 損傷を誘導した。レーザー照射の 30 分前には DNA 損傷の増感剤として Hoechst を添加し、再度 CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C で培養した。レーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に緑色蛍光観察画像を撮影し、図は照射前(0s)、1 秒、3 秒、5 秒、15 秒、30 秒、60 秒での観察画像である。作製した 3 つの FHA ドメイン変異体ではレーザー照射後の GFP の集積が欠失することがわかる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。



**図 4.3.4 PNKP と 3 つの PNKP FHA ドメイン変異体の DNA 損傷部位への集積挙動の定量解析結果:** 図 4.3.3 で行った Laser micro-irradiation 後のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、野生型 PNKP と 3 つの PNKP FHA ドメイン変異体での蛍光強度を比較した結果である。蛍光観察画像はレーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に撮影し、1 細胞当たり合計約 250 枚の蛍光観察画像を定量化解析した。それぞれの条件毎に約 20 細胞で実験を行い、その平均値をそれぞれのプロット、標準誤差をエラーバーとしてグラフを作成した。縦軸の GFP-PNKP 相対蛍光強度はレーザー照射前後での蛍光強度差を、バックグラウンド領域の蛍光強度で割ることで求めた。横軸はレーザー照射後の経過時間を表している。



**図 4.3.5 Western Blotting による野生型 PNKP と 3 つの PNKP FHA ドメイン変異体の発現量解析:** U2OS 細胞に GFP-PNKP と作製した 3 つの FHA ドメイン変異体を遺伝子導入し、細胞内での各タンパク質の発現量を Western Blotting によって確認した結果である。GFP 抗体による検出で、遺伝子導入により発現させた野生型 PNKP と 3 つの変異体の発現が確認できた。PCNA 抗体はローディングコントロールとして使用した。各ウェルに流したタンパク質の総量は 20 $\mu$ g である。



**図 4.3.6** GFP タグを用いた免疫沈降法による PNKP 2RA (R35A/R48A)変異体におけるタンパク質結合能力解析:GFP 単体、GFP-PNKP、または GFP-2RA 変異体を HEK293 細胞に遺伝子導入し、24 時間後に細胞内のすべてのタンパク質を回収し(Input)、免疫沈降法により GFP に結合したタンパク質のみを精製した(IP: GFP)。それぞれの条件での各タンパク質の発現量を Western Blotting によって確認した結果である。PNKP と結合することがわかっている XRCC1 と XRCC4 を検出し、2RA 変異体では PNKP と XRCC1・XRCC4 との結合が欠失していることがわかる。免疫沈降前の細胞溶出液は 1% Input コントロールとして使用した。GFP 抗体により、免疫沈降後の過剰発現させた GFP-PNKP と GFP-2RA、また GFP のタンパク質発現を検出した。

## 4.4 PNKP のタンパク質間相互作用による DNA 損傷部位への集積

第 4.4 章では、PNKP の FHA ドメイン欠損が PNKP の DNA 損傷部位への集積に与えた影響が、タンパク質との結合に由来するものなのかを確認するため、RNA 干渉によるタンパク質発現抑制などにより、実際に FHA ドメインに結合するタンパク質に異常が発生した場合の PNKP の DNA 損傷部位への集積能力を解析する。既往の研究において、PNKP は FHA ドメインを介して DNA 一本鎖切断の足場タンパク質として XRCC1、DNA 二本鎖切断の足場タンパク質として XRCC4 と結合することが知られている。そこで、これら 2 つのタンパク質を RNA 干渉により発現抑制した場合の DNA 損傷部位への PNKP の集積を解析した。RNA 干渉による細胞内での XRCC1 と XRCC4 の発現量抑制は Western Blotting により解析した(図 4.4.1)。次にこれらの siRNA を用いて 4 つの条件 (siControl、siXRCC1、siXRCC4、siXRCC1/XRCC4)で Laser micro-irradiation 法により、DNA 損傷部位への GFP-PNKP の集積挙動を秒単位で観察した(図 4.4.2)。また、レーザー照射部位での GFP 蛍光強度は Leica LASX ソフトウェアにより定量化した(図 4.4.3)。本実験では、GFP-PNKP を安定的に発現した U2OS 細胞に siRNA を用いて目的タンパク質の発現を抑制することで実験を行い、それぞれの siRNA 処理条件による比較を行った。

また、逆に siPNKP による PNKP 発現の抑制が XRCC1 と XRCC4 の DNA 損傷部位への集積に関わる可能性も考慮し、siPNKP 状態での XRCC1 と XRCC4 の DNA 損傷部位への集積能力解析も併せて行った(図 4.4.4、図 4.4.5)。XRCC1 と XRCC4 の DNA 損傷部位への集積量は、赤色蛍光タンパク質 RFP(mCherry)と XRCC1、XRCC4 融合タンパク質発現ベクターを作製し、Laser micro-irradiation アッセイを行うことで解析した。

図 4.4.1 の Western Blotting の結果から、XRCC1 と XRCC4 の mRNA の 3'末端側の非翻訳領域を標的とした siRNA (siXRCC1 3'-UTR、siXRCC4 3'-UTR)を導入した細胞では、ホタルのルシフェラーゼを標的とした siControl 導入細胞と比較して、それぞれのタンパク質発現量が顕著に減少していることがわかる。つまり、今回設計した 3'-UTR を標的にした siRNA は細胞内の XRCC1 と XRCC4 の発現を抑制できることがわかった。

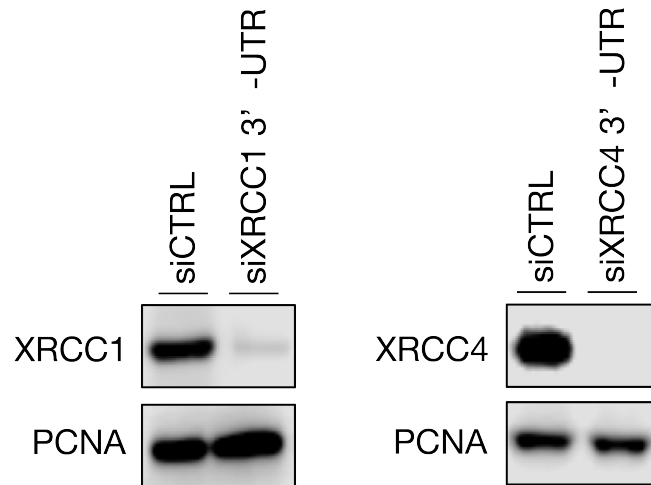
図 4.4.2 では、GFP-PNKP を安定発現する U2OS に、図 4.4.1 の siRNA により XRCC1 と XRCC4 の発現抑制を行った細胞を用いて、Laser micro-irradiation により細胞核内の一部に DNA 損傷を誘導し、60 秒後までの GFP の集積挙動を観察した

ものである。実験方法の詳細はこれまでと同様である。興味深いことに、siXRCC1 と siXRCC4、siXRCC1/XRCC4 の 3 つの条件において、DNA 損傷部位での GFP 蛍光強度が部分的に減少している様子が観察できた。

図 4.4.3 では、図 4.4.2 のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化した結果である。定量化の結果からも、siXRCC1 と siXRCC4、siXRCC1/XRCC4 の 3 つの条件において、DNA 損傷部位での GFP 蛍光強度が有意に低下することがわかった。つまり、PNKP は XRCC1 と XRCC4 との結合を介して DNA 損傷部位に動員されていることが明らかになった。さらに興味深いことに、siXRCC1 や siXRCC4 などの片方の抑制と比較し、同時に XRCC1/XRCC4 を抑制した細胞ではより GFP 蛍光強度減少することがわかった。このことから、XRCC1 と XRCC4 との結合を介した PNKP の DNA 損傷部位への動員は、それぞれが独立した制御機構であることがわかった。しかし、第 4.3 章の FHA ドメイン変異体と比較すると、siXRCC1/XRCC4 の条件では DNA 損傷部位への PNKP 動員が完全には欠損していないことから、siRNA による一過性発現抑制であることが原因の可能性もあるが、PNKP の動員に関わる足場タンパク質は XRCC1 や XRCC4 以外にも存在する可能性が示唆された。

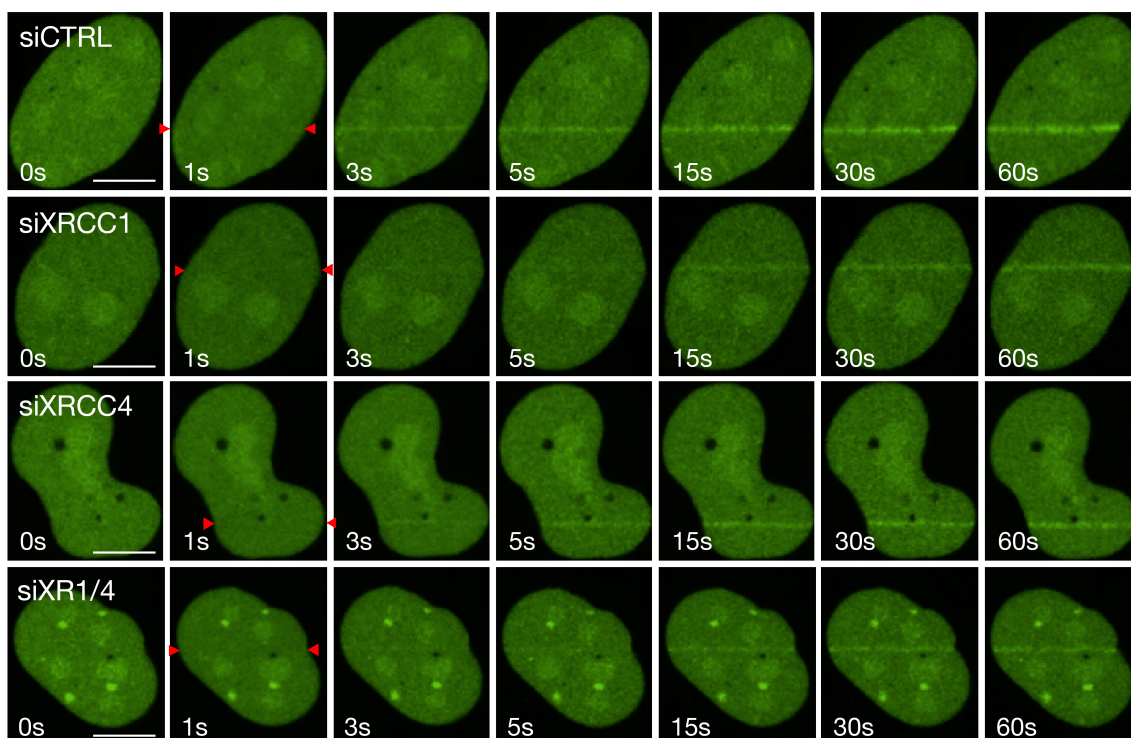
図 4.4.4 と図 4.4.5 の PNKP 発現抑制下での XRCC1 と XRCC4 の DNA 損傷部位への集積挙動の解析結果から、XRCC1 と XRCC4 の動員は PNKP の発現抑制の有無に関わらないことがわかった。つまり、これら 2 つのタンパク質の DNA 損傷部位への動員に関しては、PNKP よりも XRCC1 と XRCC4 が上流に位置していることが示唆された。

第 4.4 章では、PNKP の結合タンパク質 XRCC1 と XRCC4 を発現抑制した状態での PNKP の DNA 損傷部位への動員を解析することで、FHA ドメインにより制御される PNKP の DNA 損傷部位への動員が他のタンパク質との結合により制御されていることを明らかにした。第 4.5 章では PNKP の DNA 損傷部位への動員とタンパク質リン酸化との関係性について解析する。



**図 4.4.1 Western Blotting による siRNA による細胞内 XRCC1/XRCC4 の発現抑制確認** : siRNA 導入後の細胞内 XRCC1 と XRCC4 の発現量を Western Blotting によって解析した。siControl ではホタルが持つルシフェラーゼを標的としているため、ヒトの細胞においては相補鎖を形成する mRNA が存在せず、遺伝子発現量は変わらないとされる。XRCC1 と XRCC4 の抑制には mRNA の 3'末端側に存在する非翻訳領域(UTR: Un-translated region)を標的とすることで、内在性の mRNA とのみ相補鎖を形成し、干渉するように設計した。XRCC1 と XRCC4 抗体を用いて検出を行い、siRNA の導入によりそれぞれのタンパク質の発現抑制が起きていることが確認できた。PCNA 抗体はコントロールタンパク質として使用した。各ウェルに流したタンパク質の総量は 20 $\mu$ g である。





**図 4.4.2 siRNA による XRCC1 と XRCC4 発現抑制下での GFP-PNKP の DNA 損傷部位への集積動態観察結果** : GFP-PNKP を安定発現した U2OS 細胞に上記の siRNA を用いて XRCC1 と XRCC4 の発現抑制を行い、GFP-PNKP の DNA 損傷部位への集積挙動の観察を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて赤色の矢印の間に 405nm のレーザーを 0.25 秒照射することで DNA 損傷を誘導した。レーザー照射の 30 分前には DNA 損傷の増感剤として Hoechst を添加し、再度 CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37℃ で培養した。レーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に緑色蛍光観察画像を撮影し、図は照射前(0s)、1 秒、3 秒、5 秒、15 秒、30 秒、60 秒での観察画像である。白線は 10μm を表すスケールバーである。

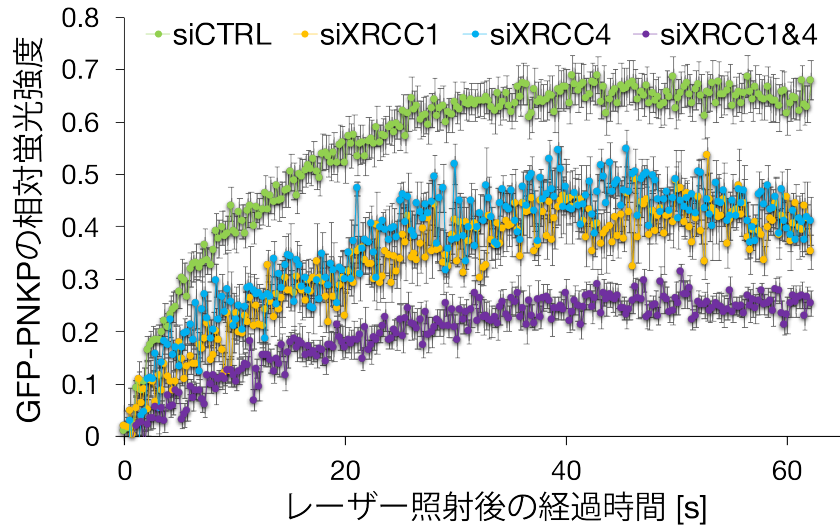
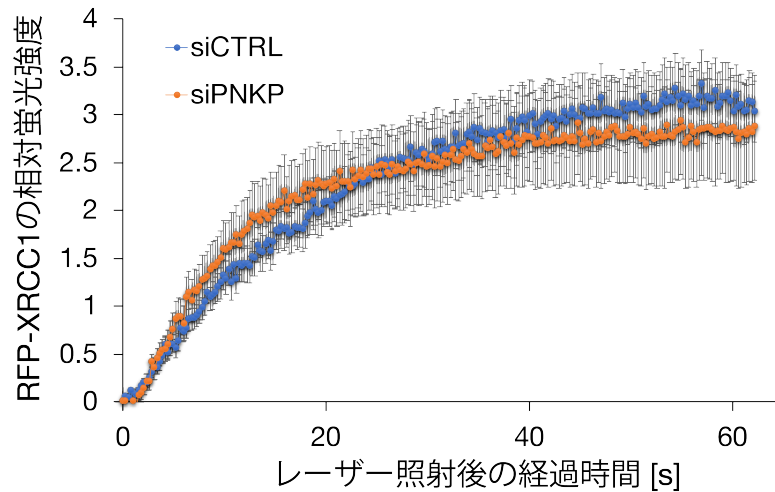
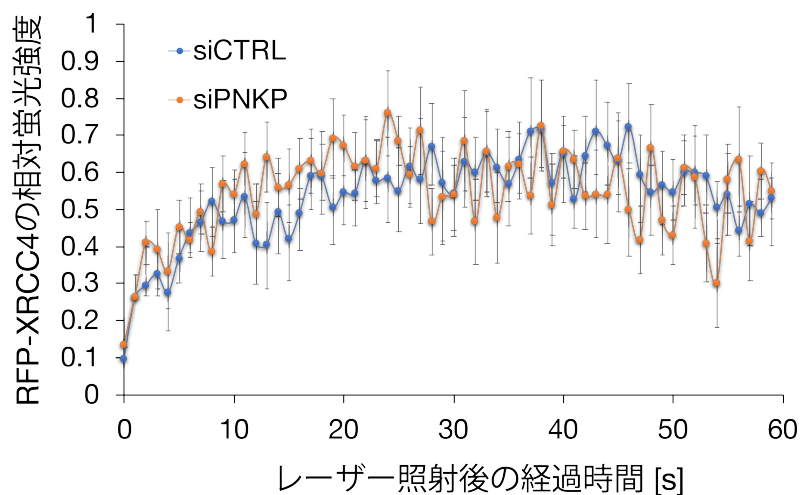


図 4.4.3 siRNA による XRCC1 と XRCC4 発現抑制下での GFP-PNKP の DNA 損傷部位への集積挙動の定量解析結果: 図 4.4.2 で行った Laser micro-irradiation 後のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、siRNA による XRCC1、XRCC4、XRCC1/XRCC4 発現抑制状態での GFP-PNKP のレーザーライン上での蛍光強度変化を比較した結果である。蛍光観察画像はレーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に撮影し、1 細胞当たり合計約 250 枚の蛍光観察画像を定量化解析した。それぞれの条件毎に約 20 細胞で実験を行い、その平均値をそれぞれのプロット、標準誤差をエラーバーとしてグラフを作成した。縦軸の GFP-PNKP 相対蛍光強度はレーザー照射前後での蛍光強度差を、バックグラウンド領域の蛍光強度で割ることで求めた。横軸はレーザー照射後の経過時間を表している。



**図 4.4.4** siRNA による PNKP 発現抑制下での RFP-XRCC1 の DNA 損傷部位への集積挙動の定量解析結果: siRNA による PNKP 発現抑制状態での RFP-XRCC1 のレーザーライン上での蛍光強度変化を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、比較した結果である。蛍光観察画像はレーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に撮影し、1 細胞当たり合計約 250 枚の蛍光観察画像を定量化解析した。それぞれの条件毎に約 20 細胞で実験を行い、その平均値をそれぞれのプロット、標準誤差をエラーバーとしてグラフを作成した。縦軸の RFP-XRCC1 相対蛍光強度はレーザー照射前後での蛍光強度差を、バックグラウンド領域の蛍光強度で割ることで求めた。横軸はレーザー照射後の経過時間を表している。



**図 4.4.5** siRNA による PNKP 発現抑制下での RFP-XRCC4 の DNA 損傷部位への集積挙動の定量解析結果: siRNA による PNKP 発現抑制状態での RFP-XRCC4 のレーザーライン上での蛍光強度変化を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、比較した結果である。基本的な実験方法は図 4.4.4 と同様である。

## 4.5 リン酸化による PNKP DNA 損傷応答の制御

上述したように、PNKP が持つ FHA ドメインは様々な DNA 損傷応答因子間で共有されているドメインであり、リン酸化されたタンパク質依存的なタンパク質間相互作用を制御する。第 4.5 章ではタンパク質のリン酸化に関わる酵素の発現抑制を行った状態において、DNA 損傷部位での PNKP の集積挙動を解析することでリン酸化とタンパク質動員の関係性について解析する。既往の研究において、既知の PNKP 結合タンパク質である XRCC1 と XRCC4 は Casain Kinase 2 (CK2)によりそれぞれ Thr519 と Thr233 をリン酸化されることにより PNKP と結合することがわかっている。また、Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM)と DNA-Dependent Protein Kinase Catalytic Subunit (DNA-PKcs)は DNA 二本鎖切断のセンサータンパク質として知られており、DNA 損傷応答経路内において様々タンパク質をリン酸化することで活性化することが報告されている[99、100]。PNKP においても Ser114 と Ser126 が ATM と DNA-PKcs によってリン酸化され DNA 二本鎖切断に関わることが報告されている。そこで本研究では、CK2、ATM、DNA-PKcs を siRNA により発現抑制した状態で、DNA 損傷部位への PNKP の集積挙動を解析する。siRNA による発現量抑制は Western Blotting によって検出した(図 4.5.1)。CK2 はいくつかのタンパク質から成る複合体であり、サブユニットの中でもタンパク質のリン酸化活性を持つサブユニットが CK2 $\alpha$ と CK2 $\alpha'$ の 2 つである。そこで、本実験ではこれら 2 つを同時に siRNA により発現抑制した。次にこれらの siRNA を用いて 4 つの条件 (siControl、siATM、siDNA-PKcs、siCK2)で Laser micro-irradiation 法により、DNA 損傷部位への GFP-PNKP の集積挙動を秒単位で観察した(図 4.5.2)。また、それぞれの条件でのレーザー照射部位の GFP 蛍光強度は Leica LASX ソフトウェアにより定量化した(図 4.5.3)。本実験では、第 4.4 章と同様に GFP-PNKP を安定的に発現した U2OS 細胞に siRNA を用いて目的タンパク質の発現を抑制することで実験を行い、それぞれの siRNA 処理条件による比較を行った。さらに、第 4.4 章で確認した XRCC1/XRCC4 との結合による PNKP の DNA 損傷部位への動員が XRCC1 と XRCC4 のリン酸化に依存するものなのかを解明するため、RFP と融合させた XRCC1 T519A と XRCC4 T233A 変異体を作製し、リン酸化能を欠失させた状態での PNKP の DNA 損傷部位への集積挙動を解析した(図 4.5.4-図 4.5.7)。

図 4.5.1 の Western Blotting の結果から、ATM、DNA-PKcs、CK2 を標的とした siRNA を導入した細胞では、siControl 導入細胞と比較して、それぞれのタンパク質発現量が顕著に減少していることがわかる。つまり、今回設計した siRNA は細胞内の ATM、DNA-PKcs、CK2 の発現を抑制できることがわかった。

図 4.5.2 では、GFP-PNKP を安定発現する U2OS に、図 4.4.1 の siRNA により ATM、DNA-PKcs、CK2 の発現抑制を行った細胞を用いて、Laser micro-irradiation により細胞核内の一部に DNA 損傷を誘導し、60 秒後までの GFP の集積挙動を観察したものである。実験方法の詳細はこれまでと同様である。興味深いことに、siATM と siDNA-PKcs、siCK2 の 3 つの条件において、DNA 損傷部位での GFP 蛍光強度が部分的に減少している様子が観察できた。また、DNA 二本鎖切断修復は細胞周期による影響を受けることが予想される。本研究の目的は、レーザー照射後の DNA 損傷部位への PNKP の集積挙動を秒単位で観察するものであり、使用した siRNA の標的も細胞周期進行に直接関わるものではないため、各細胞周期の割合の変化は今回の実験結果にはあまり考慮しなかった。しかし、DNA 損傷部位への PNKP の集積量と細胞周期の関係を解析してみても興味深い結果が得られるかもしれない。

図 4.5.3 では、図 4.5.2 のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化した結果である。定量化の結果からも、siATM と siDNA-PKcs、siCK2 の 3 つの条件において、DNA 損傷部位での GFP 蛍光強度が有意に低下することがわかった。つまり、これらのタンパク質リン酸化酵素による PNKP や関連タンパク質のリン酸化は PNKP が DNA 損傷部位へ動員されるために必要であることがわかった。

図 4.5.4-図 4.5.7 では、第 4.4 章で使用した siXRCC1 3'-UTR と siXRCC4 3'-UTR を用いて内在性のタンパク質を抑制した GFP-PNKP 安定発現細胞に、RFP-XRCC1 野生型または T519A、RFP-XRCC4 野生型または T233A を再導入した細胞で、Laser micro-irradiation 後の PNKP の DNA 損傷部位での集積量を観察した結果と定量化解析したものである。結果として、それぞれの野生型の XRCC1 と XRCC4 を再導入した細胞と比較して、リン酸化サイトを置換した変異体を再導入した細胞では、顕著な GFP-PNKP の集積量の減少が確認できた。このことから、PNKP と XRCC1 や XRCC4 の結合を介した DNA 損傷部位への動員のタイミングはリン酸化により厳密に制御されていることがわかった。

第 4.5 章では、リン酸化酵素の発現抑制や既知のリン酸化部位に変異を入れた PNKP の足場タンパク質を用いた実験を行うことで、PNKP の DNA 損傷部位への集積が数々のリン酸化により制御されていることがわかった。第 4.6 章では、PNKP の DNA 損傷部位への集積のゲノム安定性維持における役割や重要性を解析する。

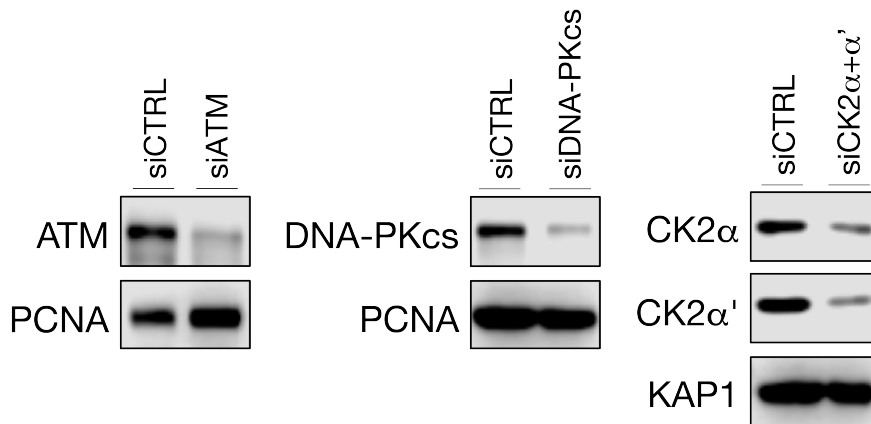
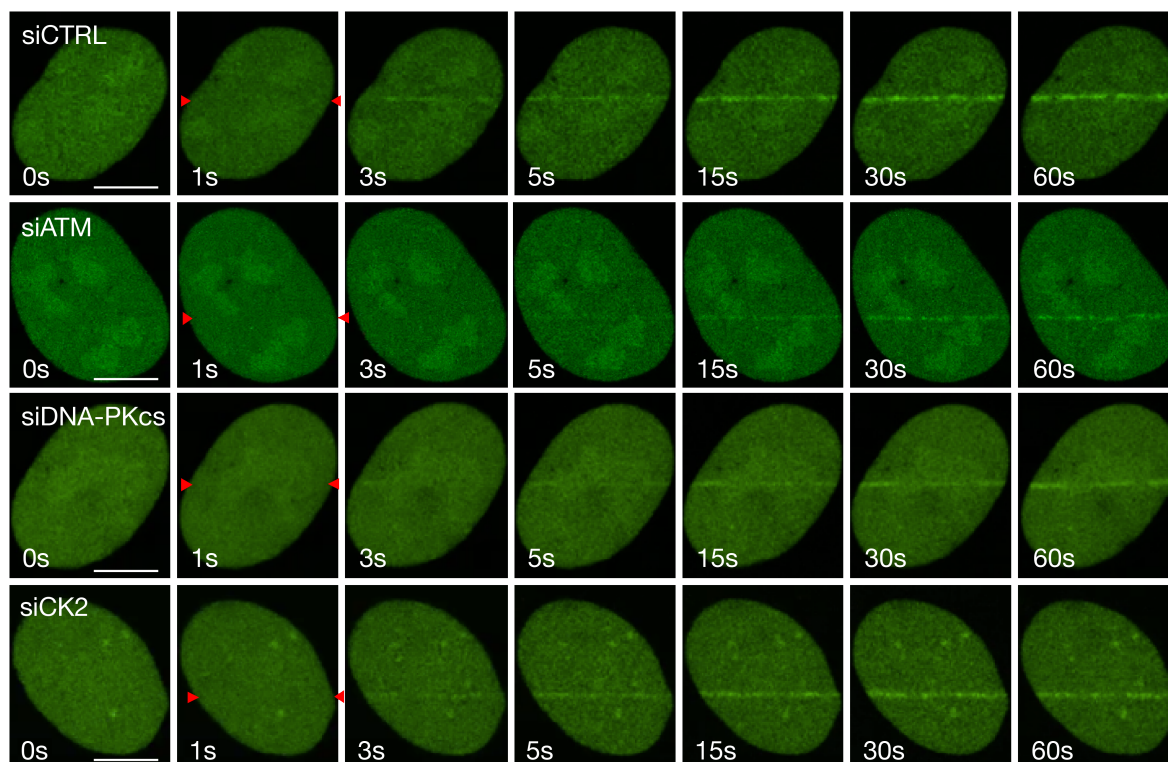
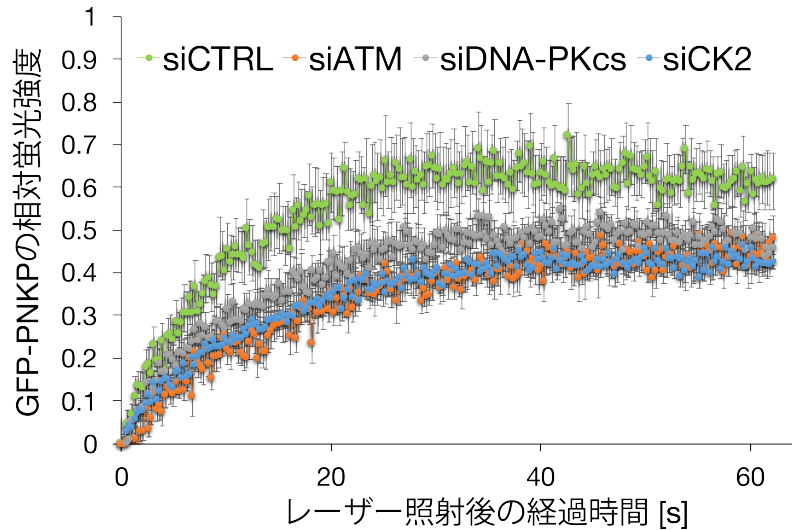


図 4.5.1 Western Blotting による siRNA による細胞内 ATM、DNA-PKcs、CK2 の発現抑制確認 : siRNA 導入後の細胞内 ATM、DNA-PKcs、CK2 の発現量を Western Blotting によって解析した。siControl ではホタルが持つルシフェラーゼを標的としているため、ヒトの細胞においては相補鎖を形成する mRNA が存在せず、遺伝子発現量は変わらないとされる。ATM、DNA-PKcs、CK2 抗体を用いて検出を行い、siRNA の導入によりそれぞれのタンパク質の発現抑制が起きていることが確認できた。PCNA 抗体と KAP1 抗体はコントロールタンパク質として使用した。各ウェルに流したタンパク質の総量は 20 $\mu$ g である。



**図 4.5.2 siRNA による ATM、DNA-PKcs、CK2 発現抑制下での GFP-PNKP の DNA 損傷部位への集積動態観察結果:** GFP-PNKP を安定発現した U2OS 細胞に上記の siRNA を用いて ATM、DNA-PKcs、CK2 の発現抑制を行い、GFP-PNKP の DNA 損傷部位への集積挙動の観察を行った。共焦点レーザー顕微鏡を用いて赤色の矢印の間に 405nm のレーザーを 0.25 秒照射することで DNA 損傷を誘導した。レーザー照射の 30 分前には DNA 損傷の増感剤として Hoechst を添加し、再度 CO<sub>2</sub> 濃度 5%、37°C で培養した。レーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に緑色蛍光観察画像を撮影し、図は照射前(0s)、1 秒、3 秒、5 秒、15 秒、30 秒、60 秒での観察画像である。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。





**図 4.5.3 siRNA による ATM、DNA-PKcs、CK2 発現抑制下での GFP-PNKP の DNA 損傷部位への集積挙動の定量解析結果:** 図 4.5.2 で行った Laser micro-irradiation 後のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、siRNA による ATM、DNA-PKcs、CK2 発現抑制状態での GFP-PNKP のレーザーライン上での蛍光強度変化を比較した結果である。蛍光観察画像はレーザー照射直前からレーザー照射後約 60 秒までの 0.25 秒毎に撮影し、1 細胞当たり合計約 250 枚の蛍光観察画像を定量化解析した。それぞれの条件毎に約 20 細胞で実験を行い、その平均値をそれぞれのプロット、標準誤差をエラーバーとしてグラフを作成した。縦軸の GFP-PNKP 相対蛍光強度はレーザー照射前後での蛍光強度差を、バックグラウンド領域の蛍光強度で割ることで求めた。横軸はレーザー照射後の経過時間を表している。



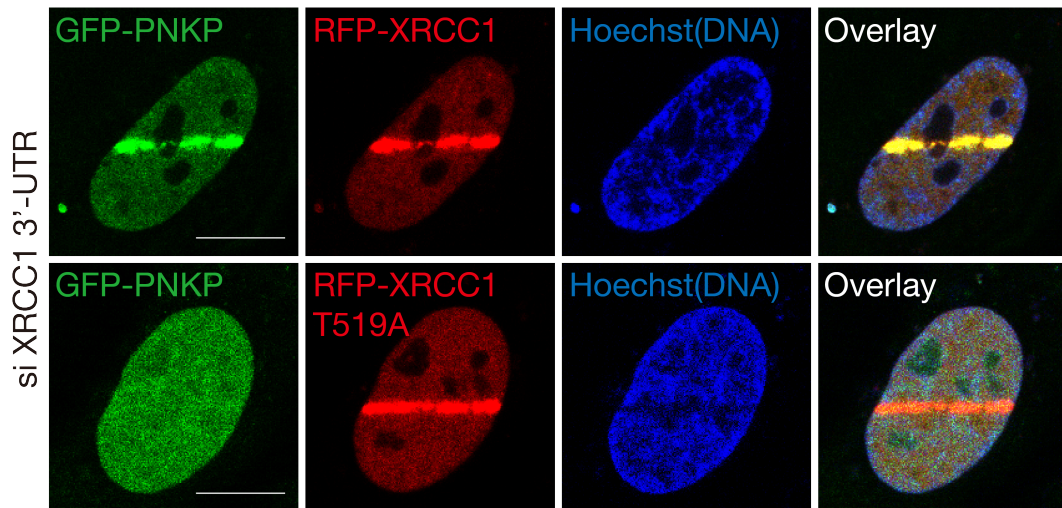


図 4.5.4 XRCC1 リン酸化部位の置換が DNA 損傷部位への PNKP 集積に与える影響の観察 : siXRCC1 3' -UTR を用いて内在性の XRCC1 を抑制した GFP-PNKP 安定発現細胞に、RFP-XRCC1 野生型(上)または T519A(下)を再導入した細胞で、Laser micro-irradiation 後の PNKP の DNA 損傷部位での集積量を観察した画像である。左から、GFP-PNKP、RFP-XRCC1、Hoechst、3 チャンネルの重ね合わせ画像である。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

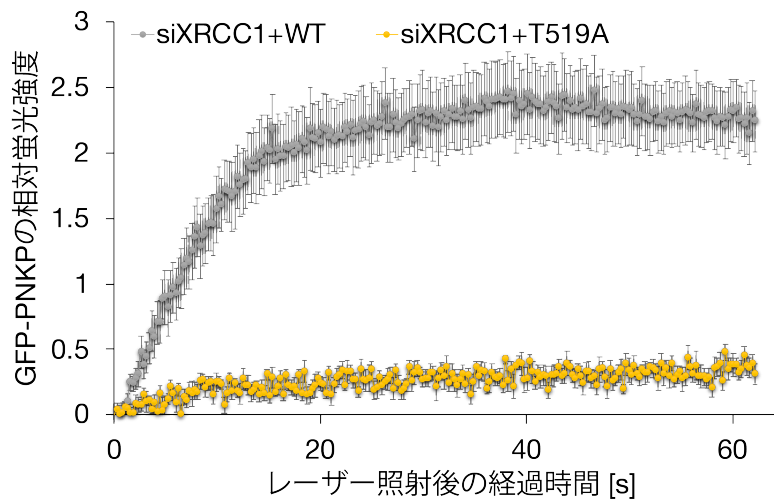


図 4.5.5 XRCC1 リン酸化部位の置換が DNA 損傷部位への PNKP 集積に与える影響の定量的解析結果 : 図 4.5.4 で行った Laser micro-irradiation 後のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、XRCC1 T519 のリン酸化が PNKP の DNA 損傷部位への集積に与える影響を比較した結果である。観察条件は図 4.5.3 と同様である。

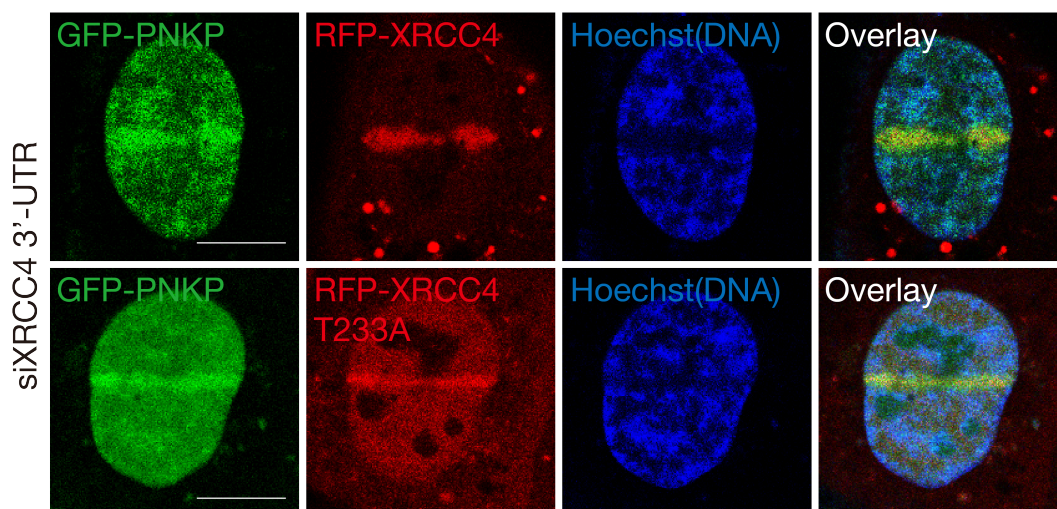


図 4.5.6 XRCC4 リン酸化部位の置換が DNA 損傷部位への PNKP 集積に与える影響の観察 : siXRCC4 3' -UTR を用いて内在性の XRCC4 を抑制した GFP-PNKP 安定発現細胞に、RFP-XRCC4 野生型(上)または T233A(下)を再導入した細胞で、Laser micro-irradiation 後の PNKP の DNA 損傷部位での集積量を観察した画像である。左から、GFP-PNKP、RFP-XRCC4、Hoechst、3 チャンネルの重ね合わせ画像である。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

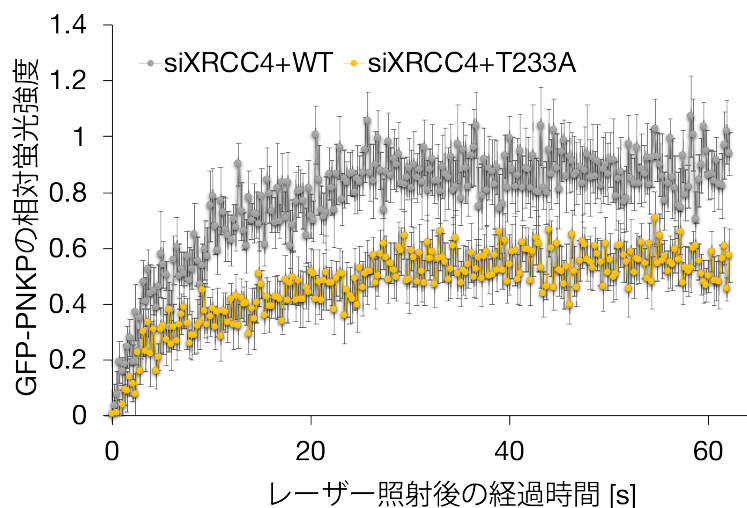


図 4.5.7 XRCC4 リン酸化部位の置換が DNA 損傷部位への PNKP 集積に与える影響の定量的解析結果 : 図 4.5.6 で行った Laser micro-irradiation 後のレーザー照射部位での GFP 蛍光強度を Leica LASX ソフトウェアにより定量化し、XRCC4 T233 のリン酸化が PNKP の DNA 損傷部位への集積に与える影響を比較した結果である。観察条件は図 4.5.3 と同様である。

## 4.6 Arg35 と Arg48 の DNA 修復・ゲノム安定性維持における重要性

第 4.6 章では、これまでに作製した GFP タグ付きの PNKP 変異体ベクターや siRNA による特定タンパク質の発現抑制などを駆使して、PNKP の DNA 損傷部位への集積のゲノム安定性維持においてどのような役割を持つのかを解析する。まずは、PNKP の 2RA 変異体 (Arg35 と Arg48 を置換した変異体でリン酸化タンパク質との結合を欠失する)を用いて放射線に対する感受性をコロニーアッセイにより解析した(図 4.6.1、図 4.6.2)。次に、PNKP と XRCC4 との結合が DNA 二本鎖切断に関わるとされていることから、siPNKP と siXRCC4 を用いてそれぞれのタンパク質の発現を抑制し、DNA 二本鎖切断を効率的に誘導する放射線に対する感受性をコロニーアッセイにより解析した(図 4.6.3)。また、PNKP と XRCC1 との結合は DNA 一本鎖切断修復において重要だと考えられていることから、siPNKP と siXRCC1 を用いてそれぞれのタンパク質の発現を抑制し、DNA 一本鎖切断を効率的に誘導する過酸化水素(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)に対する感受性を WST-8 アッセイにより解析した(図 4.6.4)。

図 4.6.1 は、それぞれの細胞に放射線を未照射、1Gy、3Gy、5 Gy 照射し、約 2 週間後の細胞生存率をコロニー形成率により解析した結果である。図 4.6.2 は図 4.6.1 の 5Gy のみを定量化解析した結果である。siCTRL 細胞と比較し、siPNKP 細胞では 5Gy の放射線照射後の細胞生存率が有意に減少した。また、siPNKP 細胞に PNKP を再導入した細胞では siCTRL と同程度の細胞生存率を示すこと、2RA 変異体を再導入した細胞は siPNKP と同程度の細胞生存率を示すことがわかった。このことから、PNKP は放射線に対する細胞生存に必要であり、FHA ドメインを介したタンパク質間結合が重要な役割を担うことがわかった。

図 4.6.3 は図 4.6.1 と同様の細胞処理条件で、siCTRL、siPNKP、siXRCC4 の放射線に対する感受性を解析した結果である。その結果、siPNKP と siXRCC4 において 5Gy の放射線照射後の細胞生存率が、siCTRL と比較して有意に減少することがわかった。つまり、PNKP は XRCC4 同様に DNA 二本鎖切断の修復に重要であることがわかる。

図 4.6.4 は siCTRL、siPNKP、siXRCC1 細胞を H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (NT、0.125mM、0.25mM、0.5mM)で処理し、約 3 日後の細胞生存率を WST-8 アッセイによって解析した結果である。その結果、siPNKP と siXRCC1 細胞では siCTRL 細胞と比較して、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> に対する感受性が有意に低下することがわかり、PNKP が DNA 一本鎖切断修復における重要性が明らかとなった。

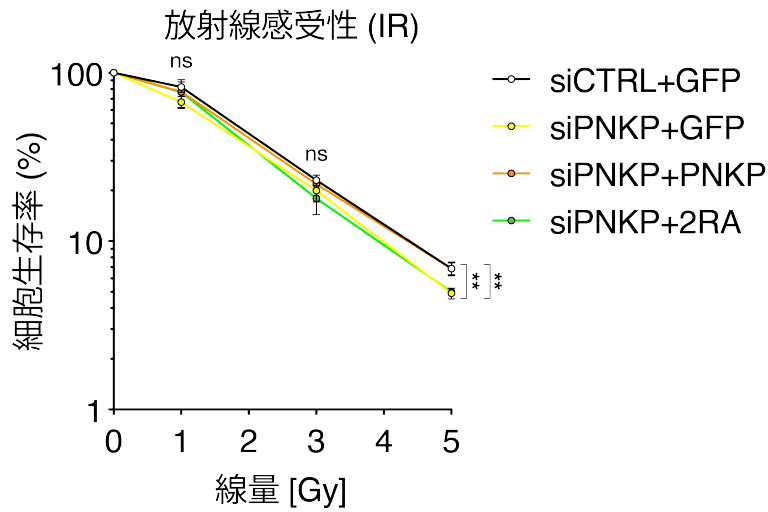


図 4.6.1 PNKP 2RA 変異体における放射線に対する細胞生存率解析 : HCT116 細胞に siRNA による PNKP の発現抑制を行い、野生型 PNKP または 2RA 変異体を遺伝子導入により再発現させた。その後、放射線を 1Gy、3Gy、5Gy 照射し、未処理の細胞と比較した細胞生存率を解析した。縦軸は細胞生存率、横軸は放射線量を示す。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの条件で 50 コロニー以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

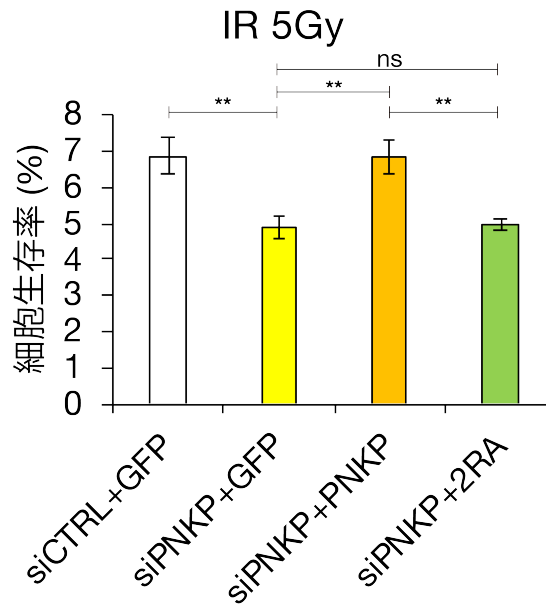


図 4.6.2 PNKP 2RA 変異体における放射線 5Gy 照射後の細胞生存率 : 図 4.6.1 の 5Gy の細胞生存率を拡大し、統計解析を行った結果である。siPNKP と siPNKP+2RA 細胞では、それぞれ siCTRL と siPNKP+PNKP 細胞と比較して有意な細胞生存率の低下が確認

できた。nsは有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

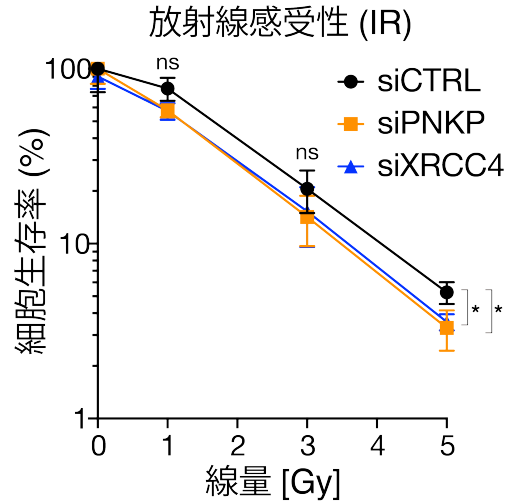
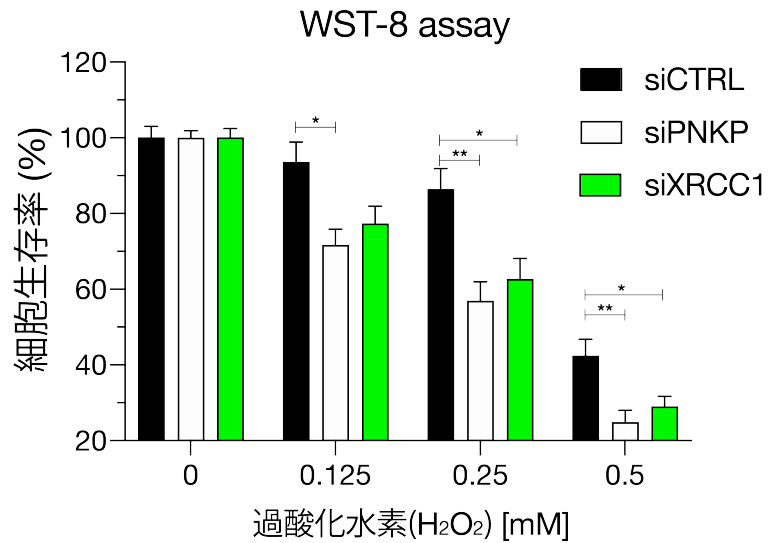


図 4.6.3 siPNKP または siXRCC4 細胞における放射線感受性解析：HCT116 細胞に siRNA による PNKP または XRCC4 の発現抑制を行い、1Gy、3Gy、5Gy の放射線を照射、未処理の細胞と比較した細胞生存率を解析した。縦軸は細胞生存率、横軸は放射線量を示す。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの条件で 50 コロニー以上をカウントした。nsは有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。



**図 4.6.4** siPNKP または siXRCC1 細胞における過酸化水素感受性解析: HCT116 細胞に siRNA による PNKP または XRCC1 の発現抑制を行い、0.125mM、0.25mM、0.5mM の過酸化水素処理を行い、未処理の細胞と比較した細胞生存率を解析した。縦軸は細胞生存率、横軸は濃度を示す。実験は 3 回繰り返し行った。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\* は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\* は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\* は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\* は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

次に、図 4.6.1 と同様の条件の細胞で DNA 一本鎖切断修復能力と DNA 二本鎖切断修復能力を、放射線照射後の ADP-ribose 抗体と  $\gamma$ -H2AX 抗体の免疫染色により第 3.5 章と同様の方法で解析した。免疫染色では、siRNA により内在性の PNKP の発現量を抑制し、遺伝子導入により野生型の PNKP と 2RA 変異体を細胞内で再発現させた細胞を用いた。

DNA 一本鎖切断修復能力の解析では、放射線照射の 30 分前に PARGi を添加し、2Gy の放射線照射により DNA 損傷を誘導した。その後、30 分後に細胞を回収し、細胞内での ADP-ribose 蛍光強度を ImageJ ソフトウェアにより計測し、蛍光強度を細胞内での DNA 一本鎖切断の残存率として考え解析を行った(図 4.6.5、図 4.6.6)。

DNA 二本鎖切断修復能力の解析では、2Gy の放射線照射により DNA 損傷を誘導し、30 分後と 6 時間後に細胞を回収、細胞内に 10 個以上の  $\gamma$ -H2AX ドット(Foci)が確認出来る細胞を DNA 二本鎖切断が残存している  $\gamma$ -H2AX 陽性細胞としてカウントし、陽性細胞の割合を解析した(図 4.6.7、図 4.6.8)。

さらに、ゲノム不安定性の指標として考えられている微小核と染色体架橋の形成率解析も併せて行った (図 4.6.9-図 4.6.11)。5Gy の放射線照射後 24 時間細胞を再培養し、免疫染色と同様の方法で DAPI により DNA の染色を行い、DNA のフラグメント化を表す微小核と細胞分裂後の DNA の絡まりを表す染色体架橋を検出した。そして、全細胞における微小核、または染色体架橋を持つ細胞の割合を siCTRL、siPNKP、siPNKP+PNKP、siPNKP+2RA の 4 種類の細胞条件で比較した。

図 4.6.5 と図 4.6.6 から、どの細胞においても放射線の照射に伴い残存した DNA 一本鎖切断を表す ADP-ribose の蛍光強度が強くなっていることがわかる。特に siPNKP と siPNKP+2RA 細胞では、それぞれ siCTRL、siPNKP+PNKP 細胞と比較して ADP-ribose の蛍光強度が有意に増加することがわかった。つまり、Arg35 と Arg48 が PNKP の持つ DNA 一本鎖切断修復能力に影響を与えることが明らかになった。しかし、siPNKP 細胞と siPNKP+2RA 細胞を比較すると、siPNKP 細胞の方が若干ながら ADP-ribose の蛍光強度が高いことから、別の機構による PNKP の DNA 一本鎖切断修復能力制御が存在する可能性がある。

次に、図 4.6.7 と図 4.6.8 では 2RA 変異体発現細胞での DNA 二本鎖切断修復能力を解析した。結果として、放射線照射 30 分後ではどの条件の細胞でもほぼ 100%が  $\gamma$ H2AX 陽性細胞であった。しかし、放射線照射 6 時間後では PNKP 抑制細胞と 2RA 変異体発現細胞において、siCTRL や siPNKP+PNKP 細胞と比較して、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞の割合が有意に増加することが確認できた。このことから、PNKP の FHA ドメインを介したリン酸化タンパク質との結合能力は DNA 二本鎖切断の修復に必要で

あり、Arg35 と Arg48 を置換した PNKP を発現する細胞では放射線照射後の DNA 二本鎖切断の修復が遅延することが明らかになった。

次に細胞のゲノム不安定性を解析した。図 4.6.9 は左からそれぞれ通常の細胞核と微小核を持つ細胞(青矢印が微小核)、染色体架橋を持つ細胞(赤矢印が染色体架橋)の画像である。図 4.6.10 と図 4.6.11 は実際に 5Gy の放射線照射 24 時間後に siCTRL、siPNKP、siPNKP+PNKP、siPNKP+2RA 細胞を回収し、微小核と染色体架橋を持つ細胞の割合を定量化した。その結果、非照射においても放射線照射後においても siPNKP と siPNKP+2RA 細胞では微小核と染色体架橋ともに有意な形成率の増加が確認できた。また、siPNKP+PNKP 細胞での微小核、染色体架橋形成率が siCTRL 細胞と同程度であることから、ゲノム安定性の維持において PNKP FHA ドメインのタンパク質結合能力は極めて重要であることがわかった。

第 4.6 章では、FHA ドメインのタンパク質間結合能力を司る Arg35 と Arg48 に変異を入れた 2RA 変異体発現細胞を用いて、DNA 損傷に対する細胞生存率、DNA 一本鎖切断・DNA 二本鎖切断などの修復能力、そして細胞のゲノム安定性維持能力を解析した結果、DNA 修復能力の欠損、それによるゲノム不安定性の誘発、そして DNA 損傷に対する細胞生存率の低下へと繋がることがわかった。つまり、FHA ドメインを介した PNKP と他タンパク質との結合はゲノム安定性の維持において極めて重要な役割をもつ。



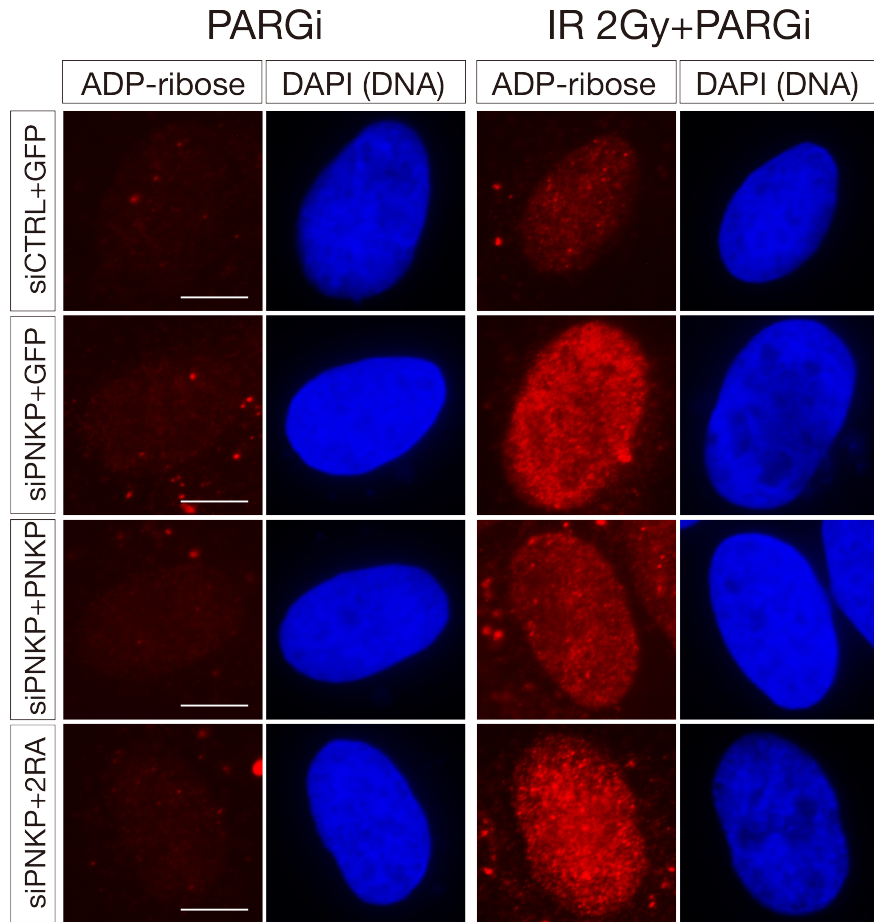


図 4.6.5 放射線 2Gy 照射前後での ADP-ribose による DNA 一本鎖切断の検出結果 : U2OS 細胞で 2Gy の放射線照射 30 分経過後の細胞内の ADP-ribose を免疫染色法で検出した結果である。左二列が PARG 阻害剤(PARGi)処理のみ、右二列が放射線照射と PARG 阻害剤(PARGi)処理である。PARGi 添加により DNA 一本鎖切断のマーカーである poly ADP-ribose の蛍光強度を増幅させた。それぞれの列の左の赤の染色図が DNA 一本鎖切断のマーカーとして用いた ADP-ribose であり、右側の青色の図は DNA を DAPI で染色した図である。縦がそれぞれの細胞の siRNA や再導入した PNKP の条件などを示している。放射線照射後の siPNKP と siPNKP+2RA 細胞において、赤色の蛍光強度が増加していることがわかる。白線は 10 $\mu$ m を表すスケールバーである。

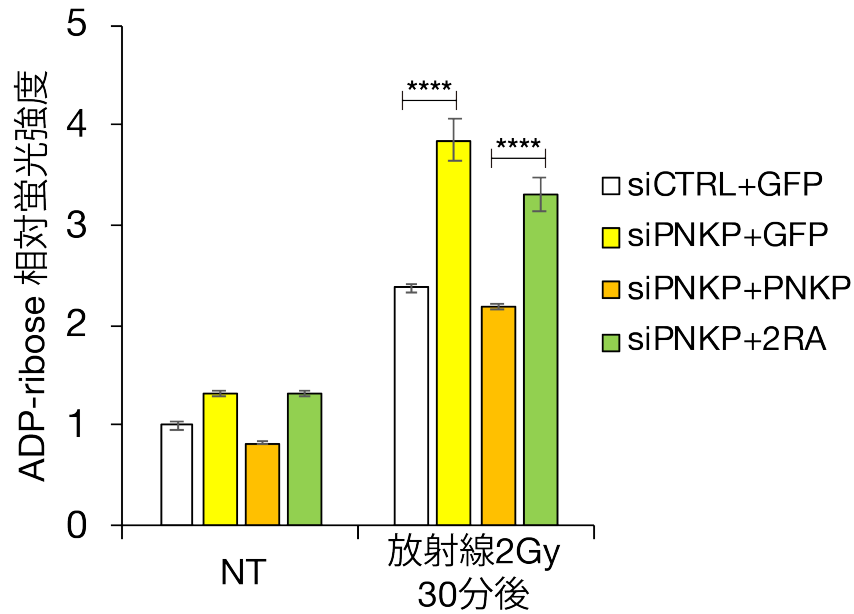


図 4.6.6 放射線 2Gy 照射前後での残存 DNA 一本鎖切断の定量的解析結果: U2OS 細胞に siRNA を用いて内在性 PNKP の発現抑制をした後、野生型 PNKP と 2RA 変異体を再発現させ、放射線照射前後でのそれぞれの条件の細胞における DNA 一本鎖切断の残存率を、ADP-ribose の蛍光強度を測定することで定量化した結果である。PARG 阻害剤 (PARGi) 処理により poly ADP-ribose の分解を阻害することで、DNA 一本鎖切断を検出した。PARGi 処理後の放射線照射細胞では、siCTRL 細胞や siPNKP+PNKP 細胞と比較し、siPNKP 細胞と siPNKP+2RA 細胞で ADP-ribose の蛍光強度が有意に増加していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\* は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\* は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\* は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\* は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

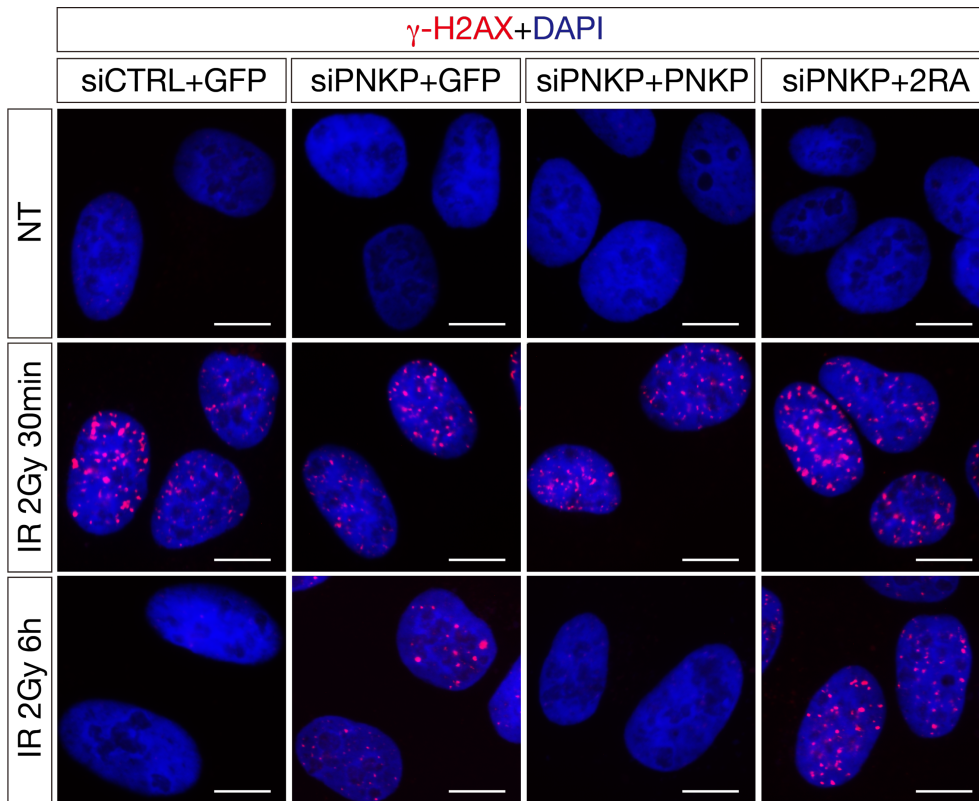
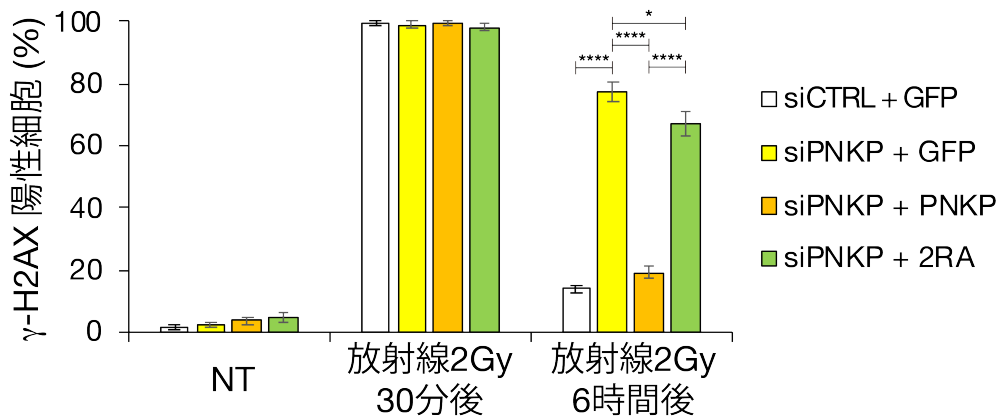


図 4.6.7 放射線 2Gy 照射後の 2RA 変異体発現細胞での DNA 二本鎖切断修復能力の解析: U2OS 細胞に放射線を 2Gy 照射し、30 分後と 6 時間後の細胞で免疫染色法を行い、 $\gamma$ H2AX を検出した結果である。 $\gamma$ H2AX のドット(foci)が 10 個以上存在する細胞を、 $\gamma$ H2AX 陽性細胞(DNA 二本鎖切断が残存する細胞)としてカウントし、細胞の処理条件と時間経過に伴う $\gamma$ H2AX 陽性細胞割合の変化を解析した。それぞれの画像は各処理条件において DNA 二本鎖切断のマーカとして用いた $\gamma$ H2AX(赤)と DNA を染色する DAPI(青)を重ね合わせた図である。



**図 4.6.8 2RA 変異体発現細胞での放射線 2Gy 照射後の時間経過に伴う DNA 二本鎖切断残存細胞の定量的解析結果** : U2OS 細胞に siRNA を用いて内在性 PNKP の発現抑制をした後、野生型 PNKP と 2RA 変異体を再発現させ、放射線照射 30 分と 6 時間後のそれぞれの条件の細胞における DNA 二本鎖切断の残存率を、 $\gamma$ H2AX foci 陽性細胞をカウントすることで定量化した結果である。放射線照射 30 分後ではどの条件の細胞でもほとんどが $\gamma$ H2AX 陽性細胞であるのに対し、6 時間後ではコントロール細胞や野生型 PNKP 再発現細胞と比較し、PNKP 抑制細胞と 2RA 変異体発現細胞では $\gamma$ H2AX 陽性細胞の割合が有意に増加していることがわかる。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 100 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

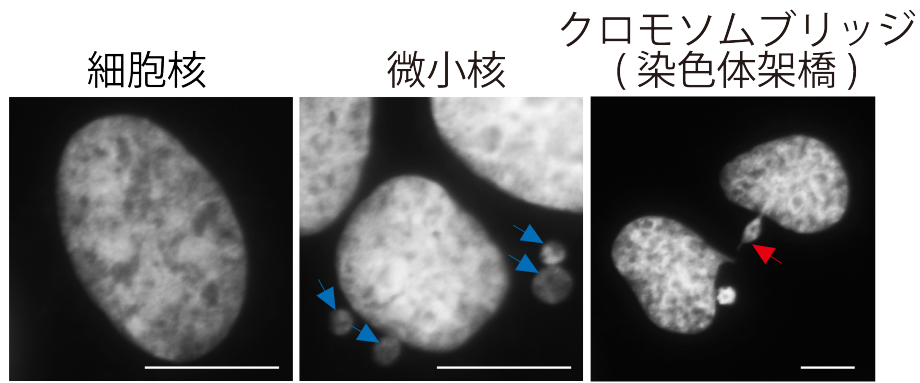


図 4.6.9 ゲノム不安定性の指標である微小核と染色体架橋の形成：5Gy の放射線照射後 24 時間培養を行った U2OS 細胞で DNA を DAPI により染色し、通常の細胞核とゲノム不安定性の指標である微小核保有細胞、染色体架橋保有細胞を撮影した結果である。青の矢印が微小核、赤の矢印が染色体架橋を示している。

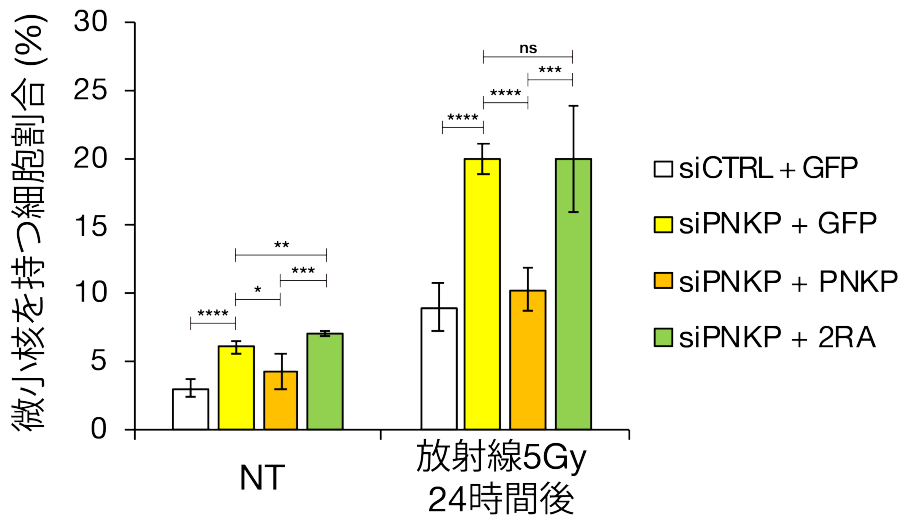


図 4.6.10 2RA 変異体発現細胞の放射線照射後のゲノム安定性維持能力(微小核)：U2OS 細胞に siRNA を用いて内在性 PNKP の発現抑制をした後、野生型 PNKP と 2RA 変異体を再発現させ、5Gy の放射線を照射後 24 時間後の細胞の微小核保有率を解析した結果である。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 500 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している。

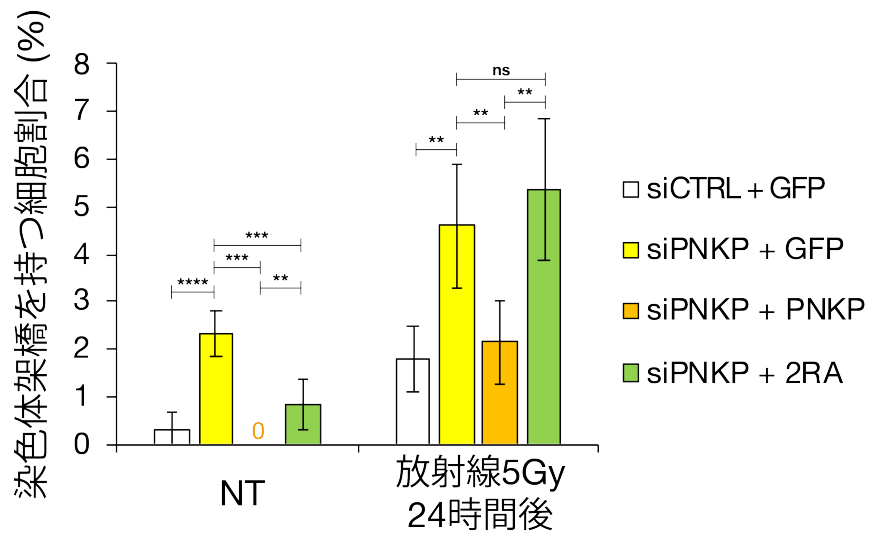


図 4.6.11 2RA 変異体発現細胞の放射線照射後のゲノム安定性維持能力(染色体架橋) : U2OS 細胞に siRNA を用いて内在性 PNKP の発現抑制をした後、野生型 PNKP と 2RA 変異体を再発現させ、5Gy の放射線を照射後 24 時間後の細胞の染色体架橋保有率を解析した結果である。実験は 3 回繰り返し行い、それぞれの実験で 500 細胞以上をカウントした。ns は有意差なし ( $p > 0.05$ )、\*は  $0.01 < p \leq 0.05$ 、\*\*は  $0.005 < p \leq 0.01$ 、\*\*\*は  $0.001 < p \leq 0.005$ 、\*\*\*\*は  $0.0005 < p \leq 0.001$  を表している

## 4.7 第4章のまとめ

本章では、「タンパク質間相互作用の観点から DNA 損傷部位への PNKP 集積の制御メカニズムを明らかにすること」を目的として、以下4つの実験項目を実行し、以下の内容を明らかにした。

### 1) 生細胞への Laser micro-irradiation による DNA 損傷誘導系の確立 (4.2 章)

第4.2章では、細胞内の一部に DNA 損傷を誘導する Laser micro-irradiation 法を確立し、PNKP の生細胞内での DNA 損傷部位への集積挙動を秒単位で可視化する実験系を確立した。また、FHA ドメインが PNKP の DNA 損傷部位への集積能力に関わることがわかった。

### 2) PNKP の DNA 損傷応答に必要なアミノ酸の同定 (4.3 章)

第4.3章では、FHA ドメイン内の Arg35 と Arg48 が PNKP とリン酸化タンパク質との結合を制御するアミノ酸であること、Arg35 と Arg48 を置換すると PNKP が DNA 損傷部位へ集積できなくなることを明らかにした。

### 3) DNA 損傷部位への PNKP 集積の時空間的制御機構 (4.4 章、4.5 章)

第4.4章では、既知の PNKP 結合タンパク質 XRCC1 と XRCC4 を発現抑制した状態で、PNKP の DNA 損傷部位への動員を解析することで、PNKP の DNA 損傷部位への集積が他タンパク質との結合により制御されていることを明らかにした。

第4.5章では、リン酸化酵素 ATM、DNA-PKcs、CK2 の発現抑制や既知のリン酸化部位に変異を入れた XRCC1、XRCC4 を用いた実験を行うことで、PNKP の DNA 損傷部位への集積がリン酸化により厳密に制御されていることがわかった。

### 4) Arg35/Arg48 のゲノム安定性維持における重要性 (4.6 章)

第4.6章では、PNKP FHA ドメイン内の Arg35 と Arg48 が制御する PNKP と単タンパク質との相互作用が、細胞の DNA 修復能力、ゲノム安定性維持能力、そして DNA 損傷に対する細胞生存率に関わることを解明した。

図 4.7.1 と図 4.7.2 は、これらの結果を統合した DNA 損傷応答における PNKP 制御機構のモデル図である。図 4.7.1 は分子レベルでのモデル図であり、図 4.7.2 は細胞レベルでのモデル図である。第4章では、PNKP が FHA ドメインを介したタンパク質間相互作用により、DNA 損傷部位へ集積し、DNA 修復を促進、細胞のゲノム安定性を保つことを解明した。さらに、PNKP は結合のタイミングやパートナーの種

類により、適切なタイミングで適切な DNA 損傷部位へ動員されるなど、タンパク質間相互作用による厳密な制御を受けていることがわかった。FHA ドメインは様々な DNA 損傷応答タンパク質に見られる構造であるため、今回の成果は他のタンパク質の DNA 損傷応答制御機構研究においても大いに貢献できるものであると考えられる。

また、PNKP を欠失した細胞と FHA ドメイン変異体細胞では放射線に感受性を示したことから、PNKP が放射線増感剤として有用である可能性も示唆された。



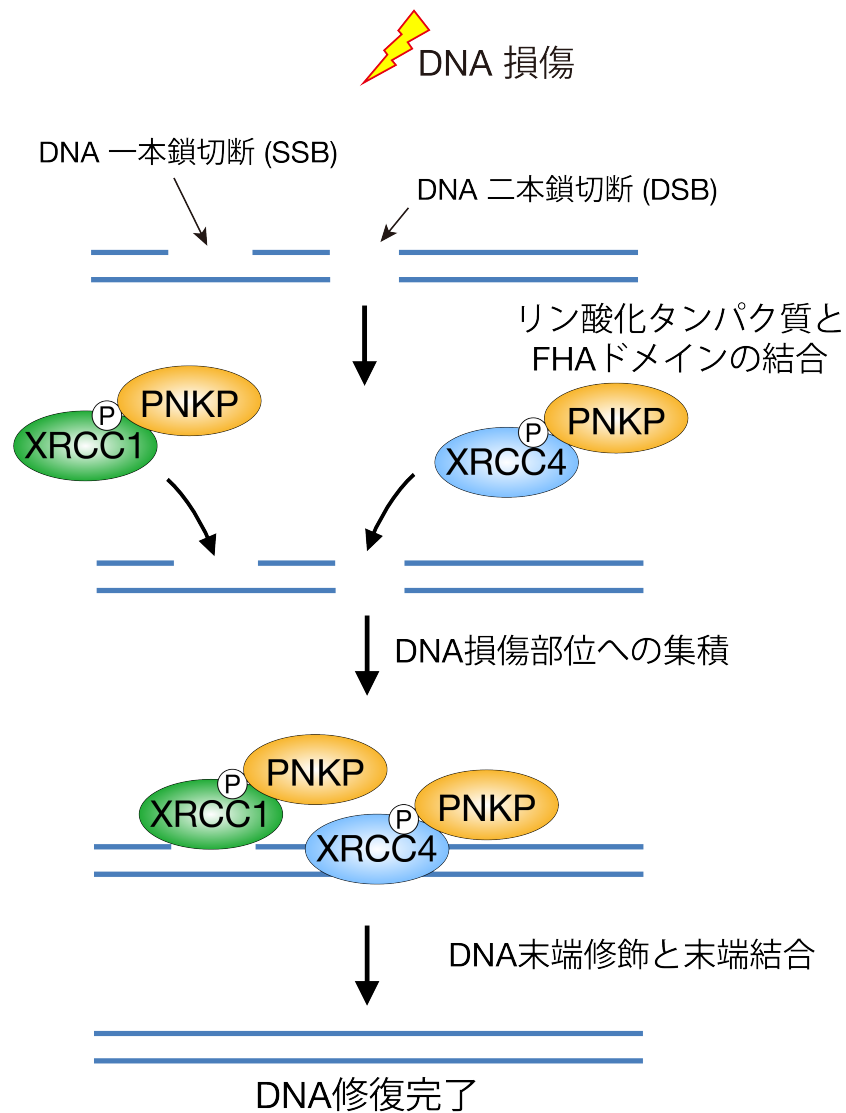


図 4.7.1 分子レベルでの DNA 損傷応答における PNKP 制御機構のモデル図：放射線などにより DNA 一本鎖切断や DNA 二本鎖切断が生じた場合、PNKP は FHA ドメインの Arg35 と Arg48 を結合の中心として、リン酸化された足場タンパク質(XRCC1 や XRCC4 など)と結合する。そして、その結合により PNKP はそれぞれの DNA 損傷部位へと動員され DNA 末端の脱リン酸化・リン酸化を行いその後の DNA 末端結合を促進する。

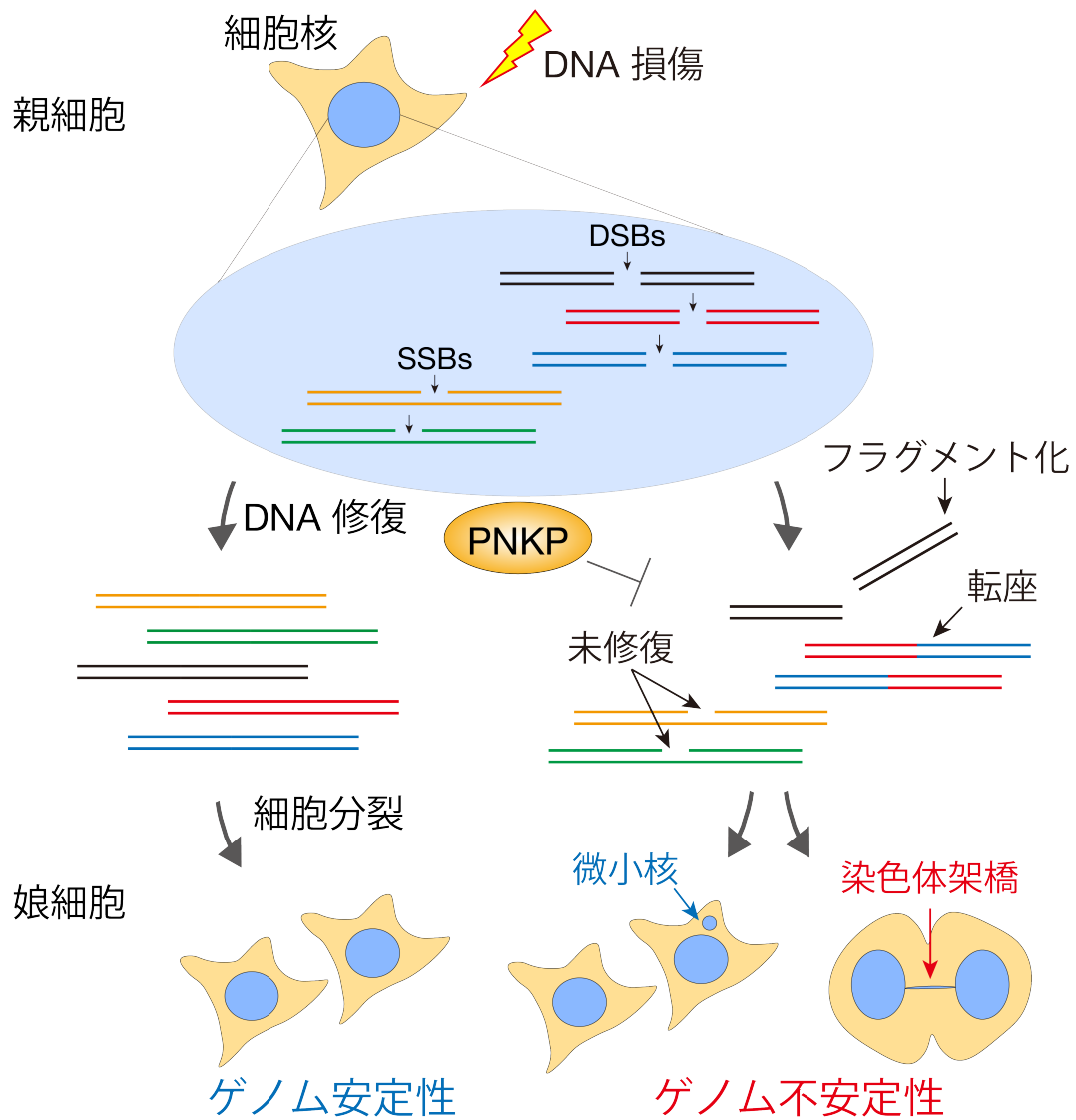


図 4.7.2 細胞レベルでの DNA 損傷応答における PNKP 制御機構のモデル図 : 図 4.7.1 のように、PNKP は足場タンパク質との結合を介して DNA 修復を行い、その後のゲノム安定性を保つ。しかし、PNKP が欠失した細胞、または FHA ドメインの機能が異常になった細胞では DNA 鎖切断などが発生しても正しく修復することができず、DNA のフラグメント化や染色体の転座が発生する。これにより、細胞のゲノム安定性維持能力が欠失し、微小核や染色体架橋などの形成率が上昇、ゲノム不安定性を獲得する。

## 第 5 章

リンカー領域内の新規リン酸化部位  
の同定と DNA 修復・複製における  
役割

# 第 6 章

## 結論

## 6.1 まとめ

本研究では、“DNA 損傷に応答した PNKP の制御機構を解明”することを目的として研究を進めてきた。そのためにバイオイメージング・細胞生物学・分子生物学・遺伝子工学的手法を駆使して、DNA 損傷応答における PNKP の制御機構を分子・アミノ酸レベルで明らかにすることを目指した。

具体的に本研究では、下記 3 つの研究項目を実行し、細胞内における PNKP の制御機構を分子・アミノ酸レベルで解明した。各章のまとめ(第 3.7 章、第 4.7 章、第 5.6 章)にて、研究成果の詳細は示している。

### 1) 細胞内での PNKP の局在制御機構の解析 (第 3 章)

PNKP のリンカー領域内のアミノ酸領域 138-141 が PNKP の核移行シグナル (NLS)であることを明らかにした。また、PNKP の核内への局在能力は DNA 損傷が発生した時に、迅速に DNA 修復に関わるために必要であることを明らかにした。さらに、PNKP が他タンパク質との結合を介して細胞核内構造体である核小体内に強く局在することを明らかにした。つまり、第 3 章では、特に細胞内での恒常的な PNKP の制御機構を明らかにした[108]。

### 2) DNA 損傷部位への PNKP 集積動態解析 (第 4 章)

Laser micro-irradiation 法により DNA 損傷部位での PNKP の集積動態を秒単位で可視化した。さらに、FHA ドメイン内の Arg35 と Arg48 が PNKP と他のリン酸化タンパク質間での結合に必要であり、このタンパク質間相互作用が細胞の DNA 修復能力、ゲノム安定性維持能力、そして DNA 損傷に対する生存率に関わることを明らかにした。つまり、第 4 章では PNKP が DNA 損傷を認識し、損傷部位へ集積するための秒単位でのメカニズムを明らかにした[55]。

### 3) 新規リン酸化部位の同定と DNA 修復・複製における役割 (第 5 章)

CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いた PNKP<sup>-/-</sup>細胞の樹立と、遺伝子工学技術により作製した PNKP 変異体を用いて、リンカー領域内のリン酸化が DNA 損傷部位への集積に関与すること、DNA 一本鎖切断と DNA 二本鎖切断の修復に関

わることを明らかにした。さらに、PNKP が DNA 複製に関与することを突き止めた。

以上のことから、本研究ではタンパク質間相互作用や翻訳後修飾、各アミノ酸の特性などによって制御される生細胞内での PNKP の動態を解析し、DNA 損傷応答に対する PNKP の制御機構の一端を分子・アミノ酸レベルで解明することに成功した。今後も、DNA 損傷応答因子の制御機構に着目し、遺伝病やがんの発生における重要性を研究していきたいと考えている。

## 6.2 本研究の将来展望

本研究成果は、分子生物学、放射線影響学、医学、原子核工学など、幅広い分野に波及する可能性を秘めたものである。その中でも、特に以下の3つが大きな目標として挙げられる。将来的には、これらの研究を通してDNA損傷修復の分子メカニズムの一端を解明し、既存の抗がん剤や放射線増感剤の効率化や新規標的としてのPNKPの有用性を評価する。さらに、PNKPを原因とした遺伝性神経疾患の発症メカニズムの解明、そして遺伝病の新規治療法開発などに繋がることが期待される。

### 1) 様々なタンパク質のバイオイメージング

本研究で行ったPNKPタンパク質の生細胞内での可視化を応用することで、他のタンパク質の可視化も可能となる。例えば、他のDNA損傷応答因子を細胞内でGFPタグ付きで発現させ、同様にLaser micro-irradiation法を行うことで他のタンパク質のDNA損傷応答時の制御動態をライブで観察することが可能となる。さらに、これらを網羅的に行うことで、非相同末端結合や相同組換えなどの様々なDNA修復経路がどのタイミングで動き出すのか、秒単位でのDNA修復経路選択機構を可視化することが期待できる。また、修士時代に行ったがん抑制遺伝子p53の可視化や、p53の下流遺伝子で細胞周期停止に関わるp21タンパク質、アポトーシスに関わるBaxタンパク質を同時に可視化することで、細胞の運命決定をライブタイムで可視化出来るようになる。このように、生細胞内で特定のタンパク質を追いかけることのできるバイオイメージングは、外的要因に対する細胞の応答をダイレクトに感知できるため、極めてリアリティの高い手法である。

### 2) PNKPを標的とした新たながん治療薬・放射線増感剤の開発

第1章において説明したように、近年特異的な分子を標的にした分子標的薬が効果的な抗がん剤治療薬として使用されている。そして、第4章や第5章での結果から、野生型U2OSのD10(生存率が10%となる線量)が約4.8Gyであったのに対し、今回作製したPNKP欠損細胞のD10は約2.2Gyと半分以下となり、PNKP欠損細胞は放射線に対して極めて高い感受性を示すことがわかる。さらに、それぞれの細胞の生存率曲線を標的説からD0(平均致死線量)を導出したところ、野生型U2OSが約2.1Gyであったのに対して、PNKP欠損細胞は約0.9Gyであった。このことから、D0の逆数を取り1Gy当たりには受ける致死性のDNA二本鎖切断の量を計算すると、野生型U2OSでは約0.5個、PNKP欠損細胞では約1.1個であり、野生型U2OSと比較してPNKP欠損細胞では致死性のDNA二本鎖切断残存量が約2倍となることがわかった。理論上、ヒト細胞では1Gyの放射線照射により約40個のDNA二本鎖

切断が生じていることから、大半の DNA 二本鎖切断はどちらの細胞においても修復されていることがわかるが、D10 や D0 から分かる通り細胞の生存率には大きな差が出てくることがわかる。このことから、阻害剤などによる PNKP 阻害が効果的な放射線治療の増感剤として有望であることが示唆される。既往の研究においても PNKP の脱リン酸化能を阻害するような薬剤が開発されており、放射線増感剤の標的として注目されている[109]。これは、PNKP が単独で塩基除去修復、DNA 一本鎖切断修復、DNA 二本鎖切断修復など様々な DNA 修復経路に関わることが要因だと考えられる。また、PNKP 欠損細胞が CPT や H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> などの薬剤に対して高い感受性を示したことから、DNA 鎖切断を誘導するような薬剤と PNKP 阻害の併用によって高いがん細胞殺傷効果を得られることが期待される。BRCA1/2 欠損家族性乳がんに対する PARP1 阻害剤のように、DNA 鎖切断につながるような変異をもつがん細胞に対して PNKP 阻害剤が極めて高い効果を発揮し、合成致死となる可能性がある。合成致死により細胞死を誘導する抗がん剤はがん細胞の変異特異的に細胞殺傷効果を発揮するため、抗がん剤の大きな問題点の一つである副作用の問題を解決する可能性を秘めたがん治療標的である。既往の研究において PNKP に関しても、約 50%のがんにおいて変異が報告されているがん抑制遺伝子 PTEN や悪性リンパ腫において高頻度な変異が報告されているがん抑制遺伝子 SHP1 と合成致死のパートナーとして報告されていることから[110、111]、これらの変異を持ったがん細胞に対して効果的ながん治療標的として期待できる。

### 3) iPS 細胞を用いた DNA 損傷応答と遺伝病発症メカニズムの詳細解析

ヒト多能性幹細胞である iPSC (Induced Pluripotent Stem Cells)は、全てのタイプの細胞へ分化可能(多能性)であり、半永久的に増殖する(自己複製能)細胞である。これまでに本研究室でも独自の iPSC 細胞を樹立しており、iPS 細胞における放射線影響の研究を行ってきた[112、113]。そして、本研究で用いた CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いることで、iPS 細胞に遺伝病由来の突然変異を人為的に導入し、その iPSC 細胞を目的の細胞に分化誘導させること(PNKP は遺伝性神経疾患を発症するため、神経細胞に分化誘導など)で、同一バックグラウンド状態での遺伝病原因突然変異がもたらす DNA 損傷応答異常の詳細を明らかにすることができる。例えば、PNKP の場合は、MCSZ や AOA4 などの遺伝性神経疾患に関わることがわかっているものの、その発生の機序はほとんど証明されていない。そこで、PNKP を欠損させた iPSC 細胞と通常の細胞で神経細胞に細胞分化誘導を行い、経時的な DNA 損傷量の解析や、最終的に分化が可能なのかなどを解析することで遺伝性神経疾患と PNKP の関係性の詳細を明らかにすることができる。さらに、他の遺伝病原因遺伝子でも同様の実験が可能であるため、汎用性が極めて高く、幅広く応用可能である。そして、遺伝病の



発症メカニズムを理解することは、その治療法開発にもつながる可能性があるため、社会的にも重要な意義を持った応用研究である。

特に、その中でも現在**(3) iPS 細胞を用いた DNA 損傷応答と遺伝病発症メカニズムの詳細解析**に力を入れており、これまでに iPS 細胞から神経幹細胞(NSC: Nural Stem Cells)へと分化誘導するスキームを確立している。特に、MCSZ や AOA4 などの遺伝性神経疾患では神経細胞の分化(ニューロンなど)に関して何らかの問題が発生していると考えられている。そこで、NS 細胞からさらに分化をすすめアストロサイトやニューロンへの分化誘導実験を行っており、これらの細胞への分化誘導法の確立を目指している。分化実験と同時に siRNA を用いた iPS 細胞と分化させた NS 細胞での遺伝子抑制実験を行っており、これらの細胞において PNKP の抑制に成功している。そこで、iPS 細胞から NS 細胞、そしてニューロンまでの分化の過程で PNKP 発現の有無により、分化の過程で発生する DNA 損傷量がどう変化するか、また最終分化形であるニューロンまで分化可能なのかなどを解析し、PNKP 発現抑制による遺伝性神経疾患の発症メカニズムの理解を目指している。

また、近年「がん幹細胞」という考え方が提唱されており、iPS 細胞のように自己複製能と分化能をもったがん細胞ががんの原因となると考えられている[114-116]。つまり、がん幹細胞を死滅させることが腫瘍の根絶、また再発の防止に重要ということである。そして、これらのがん幹細胞は iPS 細胞と似た特徴を持つと考えられていることから、これらの実験系を用いた幹細胞やその分化細胞(神経細胞、皮膚細胞、血球細胞、心筋細胞など)の DNA 損傷応答機構や放射線に対する応答の分子メカニズムを理解することで、がん幹細胞の細胞応答メカニズムの理解につながり、がん幹細胞を効率的に殺傷可能な新規治療法や新規標的の探索に繋がることが期待される。

## 謝辞

本研究は 2018～2020 年度に東京工業大学 科学技術研究創成院 先導原子力研究所 松本義久研究室において博士課程論文研究として行われたものです。研究を進めるにあたり、多くの方にご指導・ご支援を賜りました。この場をお借りして心から御礼申し上げます。

松本義久准教授には指導教員として修士課程から 5 年間、研究のご指導を戴きました。ディスカッションを通じて研究を的確な方向に導いて下さり、また研究を楽しむ気持ちを持って行う姿勢など多くを参考にさせて戴きました。イギリスへの留学の際には、親身に相談に乗っていただき、私の将来のキャリアプランを踏まえた的確なアドバイス、そして心強いサポートをしていただきました。松本先生にご指導いただけただけで博士取得後に一人の研究者として活躍していくという自信を持てるようになりました。また、大学院生としての 5 年間、研究のみならず、日常生活においても多大なるご指導を頂けたことで、大変有意義な研究生生活を送ることができました。卒業後も、松本義久研究室の卒業生として世界を舞台に活躍できる研究者として成長していけるように精進していきたいと思っています。深く御礼申し上げます。

島田幹男助教には曜日や昼夜を問わず、実験のことから発表のことまで頻繁にディスカッションをして戴きました。タイムマネジメントの大切さ、より上を目指して研究を進める姿勢、そして自分が納得できる研究をすることなど、研究者としての様々な事柄・研究者としての心の持ち方について学ばせて戴きました。心から御礼申し上げます。

国立がん研究センター研究所 RI 実験施設の石合正道施設長には、Laser micro-irradiation 法を用いた実験で多大なるご協力をいただき、多くの実験データを出すことが出来ました。また、研究や今後のキャリアの積み方に関しても多くのご助言をいただき、石合先生とのディスカッションを通して研究者として大きく成長することが出来たと感じております。心から御礼申し上げます。

松本研究室のメンバーである三宅智子さん、土屋尚代さん、Anie Day DC. ASA さん、吉田和起さん、今村力也くん、齊川昂太郎くん、Milai Enhkbaatar さん、張云峰くん、黄逾民くん、張博くん、Chaity Modak さん、齋藤瑞樹くん、神元梨穂さん、徳宮巧実くん、水野悠来くん、Tsumbuukyuu Dulguun さん、そして小宮裕子さんには研究や日常生活、それ以外にもたくさんの事に関してお世話をして戴き

ました。心から感謝致します。

環境エネルギー協創教育院 (ACEEES) には、研究面や経済面、さらには英国留学において非常にたくさんのご支援を戴きました。心から御礼申し上げます。

研究室外の友人・知人の皆様からも、色々な交際を通じて様々な経験をさせて戴きました。特に、修士時代の同期であった加瀬直也くん、山崎あかねさん、曹太永くんとは研究室卒業後も定期的に交流し、たくさん経験を共にすることが出来ました。心から感謝致します。

また、2018年7月から2019年3月に研究を行った英国オックスフォード大学ジョンラドクリフ病院腫瘍部門の Andrew N. Blackford 博士と研究室メンバーには、最先端の実験手法や研究への考え方だけでなく、将来の研究者としてのビジョンを考える上で非常に多くの刺激を受けました。また、留学の際は公私共に温かく迎えてくださり、心から感謝致します。

そして、家族の皆様にはこの研究に関してだけでなく、英国への留学におけるサポートやこれまでの学生生活をずっと支えて戴きました。たくさんのご迷惑・ご心配をおかけしたにも関わらず、研究者への道を応援し続けて頂けること大変嬉しく思っています。素晴らしい家族に恵まれ、素晴らしい環境で学問に集中できたことを誇りに思うと共に、支えて頂いたことを心から御礼申し上げます。

最後に、私はたくさんの人に支えて戴き、この論文を執筆することができました。今一度、皆様に心から深く御礼申し上げます。

## 参考文献

- [1] Rontgen W.C., Uber eine neue Art von Strahlen, *annalen der physik.* (1898) ;300(1): 12-17.
- [2] Lafield W.A., Radiosensitivity of Tumors, *Yale J. Biol. Med.* (1929) ;2(1): 35-37.
- [3] Lawrence J.H., Tennant R., THE COMPARATIVE EFFECTS OF NEUTRONS AND X-RAYS ON THE WHOLE BODY, *J. Exp. Med.* (1937) ;66(6): 667-688.
- [4] BLOOM M.A., BLOOM W., The radiosensitivity of erythroblasts, *J. Lab. Clin. Med.* (1947) ;32(6): 654-659.
- [5] Khanna K.K., Jackson S.P., DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection, *Nat. Genet.* (2001) ;27(3): 247-254.
- [6] Asainthanbly A., Chen D.J., Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation, *Nucleic Acids Res.* (2009) ;37(12): 3912-3923.
- [7] Crick F.H., On protein synthesis, *Symp. Soc. Exp. Biol.* (1958) ;12: 138-63.
- [8] 松本義久編集 (2017) 『人体のメカニズムから学ぶ放射線生物学』株式会社メディカルビュー.
- [9] Caldecott K.W., DNA Single-Strand Break Repair and Spinocerebellar Ataxia, *Cell.* (2003); 1(10): 7-10
- [10] Nimonkar A.V., Censchel J., Kinoshita E., Polaczek P., Judith L.C., Wyman C., Modrich P., Kowalczykowski S.C., BLM–DNA2–RPA–MRN and EXO1–BLM–RPA–MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair, *Genes Dev.* (2011) ;25: 350-362
- [11] Nimonkar A.V., Ozsoy A.Z., Genschel J., Modrich P., Kowalczykowski S.C., Human exonuclease 1 and BLM helicase interact to resect DNA and initiate DNA repair. *Proc Natl Acad Sci* (2008); 105: 16906–16911
- [12] Shibata A., Conrad S., Birraux J., Geuting V., Barton O., Ismail A., Kararougkas A., Meek K., Taucher-Scholz G., Löbrich M., Jeggo P.A., Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* (2011); 30(6): 1079-92

- [13] Shibata A., Moiani D., Arvai A.S., Perry J., Harding S.M., Genois M.M., Maity R., van Rossum-Fikkert S., Kertokalio A., Romoli F., Ismail A., Ismalaj E., Petricci E., Neale M.J., Bristow R.G., Masson J.Y., Wyman C., Jeggo P.A., Tainer J.A., DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol Cell*. (2014); 53(1): 7-18
- [14] Noordermeer S.M., Adam S., Setiaputra D., Barazas M., Pettitt S.J., Ling A.K., Olivieri M., Álvarez-Quilón A., Moatti N., Zimmermann M., Annunziato S., Krastev D.B., Song F., Brandsma I., Frankum J., Brough R., Sherker A., Landry S., Szilard R.K., Munro M.M., McEwan A., Gouillet de Rugy T., Lin Z.Y., Hart T., Moffat J., Gingras A.C., Martin A., van Attikum H., Jonkers J., Lord C.J., Rottenberg S., Durocher D., The shieldin complex mediates 53BP1-dependent DNA repair. *Nature* (2018); 560(7716): 117-121
- [15] Gupta R., Somyajit K., Narita T., Maskey E., Stanlie A., Kremer M., Typas D., Lammers M., Mailand N., Nussenzweig A., Lukas J., Choudhary C., DNA Repair Network Analysis Reveals Shieldin as a Key Regulator of NHEJ and PARP Inhibitor Sensitivity. *Cell* (2018); 173(4): 972-988
- [16] Daley J.M., Sung P., 53BP1, BRCA1, and the choice between recombination and end joining at DNA double-strand breaks. *Mol. Cell. Biol.* (2014); 34(8): 1380-1388
- [17] Shen J., Gilmore E.C., Marshall C.A., Haddadin M., Reynolds J.J., Eyaid W., Bodell A., Barry B., Gleason D., Allen K., Ganesh V.S., Chang B.S., Grix A., Hill R.S., Topcu M., Caldecott K.W., Barkovich A.J., Walsh C.A., Mutations in PNKP cause microcephaly, seizures and defects in DNA repair. *Nat Genet.* (2010); 42(3): 245–9
- [18] Kalasova I., Hailstone R., Bublitz J., Bogantes J., Hofmann W., Leal A., Hanzlikova H., Caldecott K.W., Pathological mutations in PNKP trigger defects in DNA single-strand break repair but not DNA double-strand break repair. *Nucleic Acids Res.* (2020); 48(12): 6672-6684
- [19] Paucar M., Malmgren H., Taylor M., Reynolds J.J., Svenningsson P., Press R., Nordgren A., Expanding the ataxia with oculomotor apraxia type 4 phenotype. *Neurol Genet.* (2016); 2(1): e49
- [20] Bras J., Alonso I., Barbot C., Costa M.M., Darwent L., Orme T., Sequeiros J., Hardy J., Coutinho P., Guerreiro R., Mutations in PNKP cause recessive ataxia with oculomotor apraxia type 4. *Am J Hum Genet.* (2015); 96(3): 474-9

- [21] Leal A., Bogantes-Ledezma S., Ekici A.B., Uebe S., Thiel C.T., Sticht H., Berghoff M., Berghoff C., Morera B., Meisterernst M., Reis A., The polynucleotide kinase 3'-phosphatase gene (PNKP) is involved in Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2B2) previously related to MED25. *Neurogenetics*. (2018); 19(4): 215-225
- [22] Pedroso J.L., Rocha C.R., Macedo-Souza L.I., De Mario V., Marques W. Jr, Barsottini O.G., Bulle Oliveira A.S., Menck C.F., Kok F., Mutation in PNKP presenting initially as axonal Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurol Genet*. (2015); 1(4): e30
- [23] Moreira M.C., Barbot C., Tachi N., Kozuka N., Uchida E., Gibson T., Mendonça P., Costa M., Barros J., Yanagisawa T., Watanabe M., Ikeda Y., Aoki M., Nagata T., Coutinho P., Sequeiros J., Koenig M., The gene mutated in ataxia-ocular apraxia 1 encodes the new HIT/Zn-finger protein aprataxin. *Nat Genet*. (2001); 29(2): 189-93
- [24] Ahel I., Rass U., El-Khamisy S.F., Katyal S., Clements P.M., McKinnon P.J., Caldecott K.W., West S.C., The neurodegenerative disease protein aprataxin resolves abortive DNA ligation intermediates. *Nature*. (2006); 443(7112): 713-6
- [25] Takashima H., Boerkoel C.F., John J., Saifi G.M., Salih M.A., Armstrong D., Mao Y., Quijcho F.A., Roa B.B., Nakagawa M., Stockton D.W., Lupski J.R., Mutation of TDP1, encoding a topoisomerase I-dependent DNA damage repair enzyme, in spinocerebellar ataxia with axonal neuropathy. *Nat Genet*. (2002); 32(2): 267-72
- [26] Ellis N.A., Groden J., Ye T.Z., Straughen J., Lennon D.J., Ciocci S., Proytcheva M., German J., The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* (1995); 83(4): 655-66
- [27] van Wietmarschen N., Merzouk S., Halsema N., Spierings D.C.J., Guryev V., Lansdorp P.M., BLM helicase suppresses recombination at G-quadruplex motifs in transcribed genes. *Nat Commun*. (2018); 9(1): 271
- [28] Gravel S., Chapman J.R., Magill C., Jackson S.P., DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev*. (2008); 22(20): 2767-72
- [29] Chan K.L., North P.S., Hickson I.D., BLM is required for faithful chromosome segregation and its localization defines a class of ultrafine anaphase bridges. *EMBO J*. (2007); 26(14): 3397-409

- [30] Davies S.L., North P.S., Hickson I.D., Role for BLM in replication-fork restart and suppression of origin firing after replicative stress. *Nat Struct Mol Biol.* (2007); 14(7): 677-9
- [31] Nowak R., Discovery of AT gene sparks biomedical research bonanza. *Science* (1995); 268(5218): 1700-1
- [32] Hsiang Y.H., Hertzberg R., Hecht S., Liu L.F., Camptothecin induces protein-linked DNA breaks via mammalian DNA topoisomerase I. *J Biol Chem.* (1985); 260(27): 14873-8
- [33] Elford H.L., Effect of hydroxyurea on ribonucleotide reductase. *Biochem Biophys Res Commun.* (1968); 33(1): 129-35
- [34] Hata T., Hoshi T., Kanamori K., Matsumae A., Sano Y., Sshima T., Sugawara R., Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. I. *J Antibiot (Tokyo).* (1956); 9(4): 141-6
- [35] Wakaki S., Marumo H., Tomioka K., Shimizu G., Kato E., Kamada H., Kudo S., Fujimoto Y., Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiot Chemother (Northfield).* (1958); 8(5): 228-40
- [36] Alderden R.A., Hall M.D., Hambley T.W., The Discovery and Development of Cisplatin, *J. Chem. Educ.* (2006); 83(5): 728
- [37] Evers B., Drost R., Schut E., de Bruin M., van der Burg E., Derksen P.W., Holstege H., Liu X., van Drunen E., Beverloo H.B., Smith G.C., Martin N.M., Lau A., O'Connor M.J., Jonkers J., Selective inhibition of BRCA2-deficient mammary tumor cell growth by AZD2281 and cisplatin, *Clin Cancer Res.* (2008); 14(12): 3916-25
- [38] Breslin C., Mani R.S., Fanta M., Hoch N., Weinfeld M., Caldecott K.W., The Rev1 interacting region (RIR) motif in the scaffold protein XRCC1 mediates a low-affinity interaction with polynucleotide kinase/phosphatase (PNKP) during DNA single-strand break repair. *J Biol Chem.* (2017); 292(39): 16024-16031
- [39] Chappell C., Hanakahi L.A., Karimi-Busheri F., Weinfeld M., West S.C., Involvement of human polynucleotide kinase in double-strand break repair by non-homologous end joining, *EMBO J.* (2002); 21(11): 2827-32
- [40] Mani R.S., Yu Y., Fang S., Lu M., Fanta M., Zolner A.E., Tahbaz N., Ramsden D.A., Litchfield D.W., Lees-Miller S.P., Weinfeld M., Dual modes of interaction between XRCC4 and polynucleotide kinase/phosphatase: implications for nonhomologous end joining, *J Biol Chem.* (2010); 285(48): 37619-29

- [41] Meijer M., Karimi-Busheri F., Huang T.Y., Weinfeld M., Young D., Pnk1, a DNA kinase/phosphatase required for normal response to DNA damage by gamma-radiation or camptothecin in *Schizosaccharomyces pombe*, *J Biol Chem.* (2002); 277(6): 4050-5
- [42] Freschauf G.K., Karimi-Busheri F., Ulaczyk-Lesanko A., Mereniuk T.R., Ahrens A., Koshy J.M., Rasouli-Nia A., Pasarj P., Holmes C.F., Rininsland F., Hall D.G., Weinfeld M., Identification of a small molecule inhibitor of the human DNA repair enzyme polynucleotide kinase/phosphatase, *Cancer Res.* (2009); 69(19): 7739-46
- [43] Freschauf G.K., Mani R.S., Mereniuk T.R., Fanta M., Virgen C.A., Dianov G.L., Grassot J.M., Hall D.G., Weinfeld M., Mechanism of action of an imidopiperidine inhibitor of human polynucleotide kinase/phosphatase, *J Biol Chem.* (2010); 285(4): 2351-60
- [44] Caldecott K.W., XRCC1 protein: Form and function, *DNA repair* (2019); 81: 102664
- [45] Koch CA, Agyei R, Galicia S, Metalnikov P, O'Donnell P, Starostine A, Weinfeld M, Durocher D. Xrcc4 physically links DNA end processing by polynucleotide kinase to DNA ligation by DNA ligase IV. *EMBO J.* 2004 Oct 1;23(19):3874-85
- [46] Durocher D., Henckel J., Fersht A.R., Jackson S.P., The FHA domain is a modular phosphopeptide recognition motif, *Mol Cell.* (1999); 4(3): 387-94
- [47] Huyton T., Bates P.A., Zhang X., Sternberg M.J., Freemont P.S., The BRCA1 C-terminal domain: structure and function, *Mutat Res.* (2000); 460(3-4): 319-32
- [48] Bernstein N.K., Williams R.S., Rakovszky M.L., Cui D., Green R., Karimi-Busheri F., Mani R.S., Galicia S., Koch C.A., Cass C.E., Durocher D., Weinfeld M., Glover J.N.M., The molecular architecture of the mammalian DNA repair enzyme, polynucleotide kinase, *Mol. Cell.* (2005); 17: 657-670
- [49] Garces F., Pearl L.H., Oliver A.W., The structural basis for substrate recognition by Mammalian polynucleotide kinase 3' phosphatase, *Mol. Cell.* (2011); 44: 385-396
- [50] Jilani A., Ramotar D., Slack C., Ong C., Yang X.M., Scherer S.W., Lasko D.D., Molecular cloning of the human gene, PNKP, encoding a polynucleotide kinase 3'-phosphatase and evidence for its role in repair of DNA strand breaks caused by oxidative damage, *J Biol Chem.* (1999); 274(34): 24176-86



- [51] Durocher D., Taylor I.A., Sarbassova D., Haire L.F., Westcott S.L., Jackson S.P., Smerdon S.J., Yaffe M.B., The molecular basis of FHA domain: phosphopeptide binding specificity and implications for phospho-dependent signaling mechanisms, *Mol Cell*. (2000); 6(5): 1169-82
- [52] Luo H., Chan D.W., Yang T., Rodriguez M., Chen B.P., Leng M., Mu J.J., Chen D., Songyang Z., Wang Y., Qin J., A new XRCC1-containing complex and its role in cellular survival of methyl methanesulfonate treatment, *Mol Cell Biol*. (2004); 24(19): 8356-65
- [53] Segal-Raz H., Mass G., Baranes-Bachar K., Lerenthal Y., Wang S.Y., Chung Y.M., Ziv-Lehrman S., Ström C.E., Helleday T., Hu M.C., Chen D.J., Shiloh Y., ATM-mediated phosphorylation of polynucleotide kinase/phosphatase is required for effective DNA double-strand break repair, *EMBO Rep*. (2011); 12(7): 713-9
- [54] Zolner A.E., Abdou I., Ye R., Mani R.S., Fanta M., Yu Y., Douglas P., Tahbaz N., Fang S., Dobbs T., Wang C., Morrice N., Hendzel M.J., Weinfeld M., Lees-Miller S.P., Phosphorylation of polynucleotide kinase/ phosphatase by DNA-dependent protein kinase and ataxia-telangiectasia mutated regulates its association with sites of DNA damage, *Nucleic Acids Res*. (2011); 39(21): 9224-37
- [55] Tsukada K., Shimada M., Imamura R., Saikawa K., Ishiai M., Matsumoto Y., The FHA domain of PNKP is essential for its recruitment to DNA damage sites and maintenance of genome stability, *Mutat Res*. (2020); 822: 111727
- [56] 秋山徹, 河府和義編集 (2008) 『細胞・培地活用ハンドブック : 特徴、培養条件、入手法などの重要データがわかる』 株式会社羊土社.
- [57] Brattain M.G., Fine W.D., Khaled F.M., Thompson J., Brattain D.E., Heterogeneity of malignant cells from a human colonic carcinoma, *Cancer Res*. (1981) ;41(5): 1751-1756.
- [58] Ponten J., Saksela E., Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours, *Int. J. Cancer* (1967) ;2(5): 434-447.
- [59] Heldin C.H., Johnsson A., Wennergren S., Wernstedt C., Betsholtz C., Westermark B., A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains, *Nature* (1986) ;319(6053): 511-514.

- [60] Landers J.E., Cassel S.L., George D.L., Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein, *Cancer Res.* (1997) ;57(16): 3562-3568.
- [61] Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R., Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J Gen Virol.* (1977); 36(1): 59-74
- [62] Janssen A., Medema R.H., Genetic instability: tipping the balance. *Oncogene.* (2013); 32(38): 4459-70
- [63] 今村建志, 疋田温彦, 大嶋佑介, 飯村忠浩編集(2014) 『INNERVISION 【Molecular Imaging 2014 分子イメージングはどこまで進んだか】7月号』インナービジョン出版.
- [64] 宮脇敦史編集 (2000) 『実験医学別冊 GFP とバイオイメージング』 株式会社羊土社.
- [65] Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y., Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*, *J. Cell. Comp. Physiol.* (1962) ;59: 223-239.
- [66] Prasher D.C., Eckenrode V.K., Ward W.W., Prendergast F.G., Cormier M.J., Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gene* (1992) ;111 (2): 229-233.
- [67] Ghildiyal M., Zamore P.D., Small silencing RNAs: an expanding universe, *Nat Rev Genet.* (2009); 10(2): 94-108
- [68] Kim V.N., Han J., Siomi M.C., Biogenesis of small RNAs in animals, *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2009); 10(2): 126-39
- [69] Siomi H., Siomi M.C., On the road to reading the RNA-interference code, *Nature.* (2009); 457(7228): 396-404
- [70] 松宮雅典 東京工業大学大学院 創造エネルギー専攻 修士学位論文 (2017)
- [71] Doudna J.A., Charpentier E., The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, *Science* (2014) ;346(6213): 1258096.
- [72] Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., Beausejour C.M., Rock J.M., Augustus S., Jamieson A.C., Porteus M.H., Gregory P.D., Holmes M.C., Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases, *Nature* (2005) ;425(7042): 646-651.
- [73] Moscou M.J., Bogdanove A.J., A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors, *Science* (2009) ;326(5959): 1501.

- [74] Grissa I., Vergnaud G., Pourcel C., The CRISPRdb database and tools to display CRISPRs and to generate dictionaries of spacers and repeats, *BMC Bioinformatics*. (2007) ;8: 172.
- [75] Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R., Aryee M.J., Joung J.K., Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities, *Nature* (2015) ;523(7561): 481-485.
- [76] Kleinstiver B.P., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.R., Aryee M.J., Joung J.K., Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities, *Nature* (2015); 523(7561): 481-485.
- [77] Jiménez A., Carrasco L., Vázquez D., Enzymic and nonenzymic translocation by yeast polysomes. Site of action of a number of inhibitors, *Biochemistry* (1977); 16(21): 4727-30
- [78] Hanzlikova H., Kalasova I., Demin A.A., Pennicott L.E., Cihlarova Z., Caldecott K.W., The Importance of Poly(ADP-Ribose) Polymerase as a Sensor of Unligated Okazaki Fragments during DNA Replication, *Mol Cell*. (2018); 71(2): 319-331.e3
- [79] 岡田雅人・三木裕明・宮崎香編集 (2015) 『タンパク質実験ノート下：タンパク質をしらべよう (機能解析編)』 株式会社羊土社.
- [80] Inano S., Sato K., Katsuki Y., Kobayashi W., Tanaka H., Nakajima K., Nakada S., Miyoshi H., Knies K., Takaori-Kondo A., Schindler D., Ishiai M., Kurumizaka H., Takata M., RFWD3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination, *Mol Cell*. (2017); 66(5): 622-634.e8
- [81] Mochizuki A.L., Katanaya A., Hayashi E., Hosokawa M., Moribe E., Motegi A., Ishiai M., Takata M., Kondoh G., Watanabe H., Nakatsuji N., Chuma S., PARI Regulates Stalled Replication Fork Processing To Maintain Genome Stability upon Replication Stress in Mice, *Mol Cell Biol*. (2017); 37(23): e00117-17
- [82] Watanabe R., Ui A., Kanno S., Ogiwara H., Nagase T., Kohno T., Yasui A., SWI/SNF factors required for cellular resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability, *Cancer Res*. (2014); 74(9): 2465-75

- [83] Stixová L, Hrušková T, Sehnalová P, Legartová S, Svidenská S, Kozubek S, Bártová E. Advanced microscopy techniques used for comparison of UVA- and  $\gamma$ -irradiation-induced DNA damage in the cell nucleus and nucleolus. *Folia Biol (Praha)*. (2014); 60 Suppl 1: 76-84.
- [84] Ferrando-May E, Tomas M, Blumhardt P, Stöckl M, Fuchs M, Leitenstorfer A. Highlighting the DNA damage response with ultrashort laser pulses in the near infrared and kinetic modeling. *Front Genet*. (2013); 4: 135.
- [85] Franken N.A., Rodermond H.M., Stap J., Haveman J., van Bree C., Clonogenic assay of cells in vitro, *Nat Protoc*. (2006); 1(5): 2315-9
- [86] Mon E.E., Wei F.Y., Ahmad R.N.R., Yamamoto T., Moroishi T., Tomizawa K., Regulation of mitochondrial iron homeostasis by sideroflexin 2, *J Physiol Sci*. (2019); 69(2): 359-373
- [87] Palumbo-Zerr K., Zerr P., Distler A., Fliehr J., Mancuso R., Huang J., Mielenz D., Tomcik M., Fürnrohr B.G., Scholtysek C., Dees C., Beyer C., Krönke G., Metzger D., Distler O., Schett G., Distler J.H., Orphan nuclear receptor NR4A1 regulates transforming growth factor- $\beta$  signaling and fibrosis, *Nat Med*. (2015); 21(2): 150-8.
- [88] Barber R.D., Harmer D.W., Coleman R.A., Clark B.J., GAPDH as a house-keeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues, *Physiol Genomics*. (2005);20(3): 389-395.
- [89] Imamoto N., Shimamoto T., Takao T., Tachibana T., Kose S., Matsubae M., Sekimoto T., Shimonishi Y., Yoneda Y., In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore-targeting complex in nuclear protein import, *EMBO J*. (1995); 14(15): 3617-26
- [90] Hsu S.C., Hung M.C., Characterization of a novel tripartite nuclear localization sequence in the EGFR family, *J Biol Chem*. (2007); 282(14): 10432-40
- [91] Liu Q., Yu J., Zhuo X., Jiang Q., Zhang C., Pericentrin contains five NESs and an NLS essential for its nucleocytoplasmic trafficking during the cell cycle, *Cell Res*. (2010); 20(8): 948-62
- [92] Rogakou E.P., Pilch D.R., Orr A.H., Ivanova V.S., Bonner W.M., DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*. (1998); 273(10): 5858-68

- [93] Hanzlikova H., Gittens W., Krejcikova K., Zeng Z., Caldecott K.W., Overlapping roles for PARP1 and PARP2 in the recruitment of endogenous XRCC1 and PNKP into oxidized chromatin. *Nucleic Acids Res.* (2017); 45(5): 2546-2557
- [94] Sasaki M., Kawahara K, Nishio M., Mimori K., Kogo R., Hamada K., Itoh B., Wangjia J., Komatsu Y., Yang R.Y., Hikasa H., Horie Y., Yamashita T., Kamijo T., Zhang Y., Prives C., Nakano T., Mak W.T., Sasaki T., Maehama T., Mori M. Suzuki A., Regulation of the MDM2-p53 Pathway and Tumor Growth by PICT1/GLTSCR2 via Nucleolar RPL11, *Nature Med.* (2011); 17(8): 944-51
- [95] Kozakai Y., Kamada R., Furuta J., Kiyota Y., Chuman Y., Sakaguchi K., PPM1D controls nucleolar formation by up-regulating phosphorylation of nucleophosmin, *Sci Rep.* (2016); 6: 33272
- [96] Redon C.E., Dickey J.S., Bonner W.M., Sedelnikova O.A.,  $\gamma$ -H2AX as a biomarker of DNA damage induced by ionizing radiation in human peripheral blood lymphocytes and artificial skin, *Adv Space Res.* (2009); 43(8): 1171-1178
- [97] Tauchi H., Positional cloning and functional analysis of the gene responsible for Nijmegen breakage syndrome, NBS1, *J Radiat Res.* (2000); 41(1): 9-17
- [98] Shang Y.L., Boder A.J., Chen P.L., NFBD1, a novel nuclear protein with signature motifs of FHA and BRCT, and an internal 41-amino acid repeat sequence, is an early participant in DNA damage response, *J Biol Chem.* (2003); 278(8): 6323-9
- [99] Zhou Y., Lee J.H., Jiang W., Crowe J.L., Zha S., Paull T.T., Regulation of the DNA Damage Response by DNA-PKcs Inhibitory Phosphorylation of ATM. *Mol Cell.* (2017); 65(1): 91-104
- [100] An J., Huang Y.C., Xu Q.Z., Zhou L.J., Shang Z.F., Huang B., Wang Y., Liu X.D., Wu D.C., Zhou P.K., DNA-PKcs plays a dominant role in the regulation of H2AX phosphorylation in response to DNA damage and cell cycle progression, *BMC Mol Biol.* (2010); 11: 18
- [101] Panier S., Boulton S.J., Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus, *Nat Rev Mol Cell Biol.* (2014); 15(1): 7-18
- [102] Traven A., Heierhorst J., SQ/TQ cluster domains: concentrated ATM/ATR kinase phosphorylation site regions in DNA-damage-response proteins, *Bioessays.* (2005); 27(4): 397-407
- [103] Katyal S., McKinnon P.J., DNA repair deficiency and neurodegeneration, *Cell Cycle.* (2007); 6(19): 2360-5

- [104] Temple S., The development of neural stem cells, *Nature*. (2001); 414(6859): 112-7
- [105] Wold M.S., Kelly T., Purification and characterization of replication protein A, a cellular protein required for in vitro replication of simian virus 40 DNA, *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1988); 85(8): 2523-7
- [106] Liu V.F., Weaver D.T., The ionizing radiation-induced replication protein A phosphorylation response differs between ataxia telangiectasia and normal human cells, *Mol Cell Biol*. (1993); 13(12): 7222-31
- [107] Budd M.E., Campbell J.L., A yeast replicative helicase, Dna2 helicase, interacts with yeast FEN-1 nuclease in carrying out its essential function, *Mol Cell Biol*. (1997); 17(4): 2136-42
- [108] Tsukada K., Matsumoto Y., Shimada M., Linker region is required for efficient nuclear localization of polynucleotide kinase phosphatase, *PLoS One*. (2020); 15(9): e0239404
- [109] Shire Z., Vakili M.R., Morgan T.D.R., Hall D.G., Lavasanifar A., Weinfeld M., Nanoencapsulation of Novel Inhibitors of PNKP for Selective Sensitization to Ionizing Radiation and Irinotecan and Induction of Synthetic Lethality, *Mol Pharm*. (2018); 15(6): 2316-2326
- [110] Mereniuk T.R., El Gendy M.A., Mendes-Pereira A.M., Lord C.J., Ghosh S., Foley E., Ashworth A., Weinfeld M., Synthetic lethal targeting of PTEN-deficient cancer cells using selective disruption of polynucleotide kinase/phosphatase, *Mol Cancer Ther*. (2013); 12(10): 2135-44
- [111] Mereniuk T.R., Maranchuk R.A., Schindler A., Penner-Chea J., Freschauf G.K., Hegazy S., Lai R., Foley E., Weinfeld M., Genetic screening for synthetic lethal partners of polynucleotide kinase/phosphatase: potential for targeting SHP-1-depleted cancers, *Cancer Res*. (2012); 72(22): 5934-44
- [112] Shimada M., Tsukada K., Kagawa N., Matsumoto Y., Reprogramming and differentiation-dependent transcriptional alteration of DNA damage response and apoptosis genes in human induced pluripotent stem cells, *J Radiat Res*. (2019); 60(6): 719-728
- [113] Miyake T., Shimada M., Matsumoto Y., Okino A., DNA Damage Response After Ionizing Radiation Exposure in Skin Keratinocytes Derived from Human-Induced Pluripotent Stem Cells, *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. (2019); 105(1): 193-205

- [114] Al-Hajj M., Wicha M.S., Benito-Hernandez A., Morrison S.J., Clarke M.F., Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003); 100(7): 3983-8
- [115] Singh S.K., Hawkins C., Clarke I.D., Squire J.A., Bayani J., Hide T., Henkelman R.M., Cusimano M.D., Dirks P.B., Identification of human brain tumour initiating cells, *Nature.* (2004); 432(7015): 396-401
- [116] Yuan X., Curtin J., Xiong Y., Liu G., Waschmann-Hogiu S., Farkas D.L., Black K.L., Yu J.S., Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme, *Oncogene.* (2004); 23(58): 9392-400