

156. NBS1 による損傷乗り越え合成の開始機構

柳原 啓見

Key words : 紫外線損傷応答, 損傷乗り越え DNA 合成

*京都大学 放射線生物研究センター
ゲノム動態研究部門

緒 言

損傷乗り越え DNA 合成は, DNA 複製阻害を回避する機構で紫外線により生じた DNA 損傷からの生体防御に必須の機構である. 紫外線高感受性遺伝病の色素性乾皮症における日本人患者の半数は損傷乗り越え DNA 合成に異常があると報告されている¹⁾. 近年では, 制がん剤のシスプラチン処理やアルコール摂取などにより生じる DNA 鎖架橋修復や, 免疫多様性獲得のためのクラススイッチ機構などの広範な生命維持に損傷乗り越え DNA 合成が機能していることが報告されている²⁾. また, 損傷乗り越え DNA 合成機構の異常により誘発突然変異頻度が上昇し, 発がんが促進される事も報告されている³⁾.

損傷乗り越え DNA 合成は, DNA 損傷部位で DNA 複製が停止すると E3 ユビキチンリガーゼ RAD18 が細胞増殖因子 PCNA をモノユビキチン化することにより活性化され, 複製型の DNA 合成酵素から損傷乗り越え型酵素 (Pol eta) にポリメラーゼスイッチすることにより進行する⁴⁾. 我々は, この活性化機構に放射線損傷修復因子 NBS1 が関与していることを発見した⁵⁾. しかし DNA 結合領域を有しない NBS1 が紫外線損傷 DNA をどのように認識するか不明であった. そこで本研究では, NBS1 の紫外線損傷認識とそれによる損傷乗り越え DNA 合成の開始機構を明らかにするため, NBS1 の上流機能因子を同定することを目的とした.

方 法

1. 免疫染色法を用いた紫外線照射後の核内局在解析

GFP タグを付加した NBS1-N, NBS1-C を過剰発現させた細胞株を作製し 2 種類の細胞で比較検討を行った. 各細胞に, 放射線 3 Gy 照射し 10 分後に固定, 紫外線 10 J/m² 照射し 3 時間後に固定し, 0.5%-Triton X/PBS (-) で処理後, GFP 抗体を用いて免疫染色を行った. GFP の核内局在を蛍光顕微鏡 (Leica) で観察した.

2. siRNA ライブラリーを用いたスクリーニング解析

GFP タグを付加した NBS1-C を過剰発現させた細胞株に, Lipofectamine RNAiMax (Life technologies) を用いて siRNA ライブラリー (Ambion) を導入した. siRNA (final: 1 pmol) 導入 72 時間後に紫外線 10 J/m² 照射し, 3 時間後に固定し, GFP の核内局在をハイコンテンツ細胞イメージアナライザー IN Cell Analyzer 2000 (GE ヘルスケア) で観察した.

結 果

1. 紫外線損傷応答に関与する NBS1 機能領域の解析

紫外線損傷応答に関与する機能領域を同定するため, NBS1-N, NBS1-C を過剰発現させた細胞株を用いて, 放射線及び紫外線照射後の核内局在解析を行った.

*現所属 : 広島大学 原爆放射線医科学研究所 放射線ゲノム疾患研究分野

放射線照射後、NBS1-Nを過剰発現させた場合、放射線損傷部位への局在が認められた。NBS1-Cを過剰発現させた場合、放射線損傷部位への局在は認められなかった。紫外線照射後では、NBS1-Nを過剰発現させた場合、紫外線損傷部位への局在は認められなかった。一方、NBS1-Cを過剰発現させた場合、紫外線損傷部位への局在が認められた。これらの結果から、放射線損傷応答にはNBS1のN末端側が、紫外線損傷応答にはNBS1のC末端側が機能領域であることが明らかとなった(図1)。

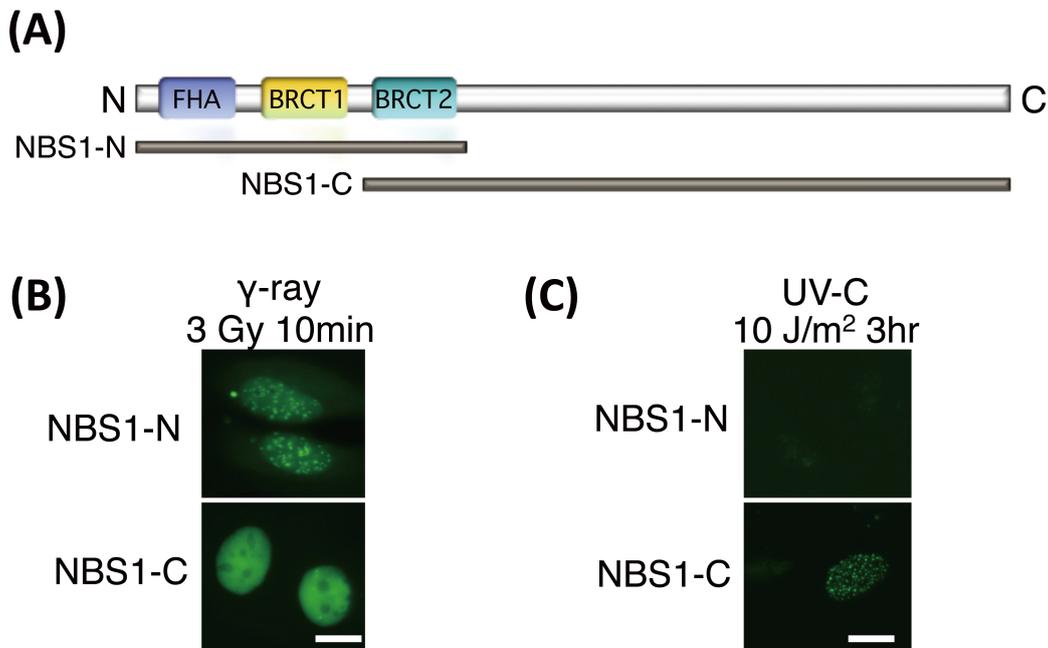


図1. NBS1の機能ドメイン。

(A) NBS1タンパク質の構造。N末端部分はDNA修復タンパク質によくみられるFHA (forkhead-associated)ドメイン及びBRCT (BRCA1 C-terminus)ドメインを有している。GFPタグを付加させたNBS1-N及びNBS1-Cを過剰発現させたU2OS細胞に、(B)放射線3 Gy照射10分後に固定、(C)紫外線10 J/m²照射3時間後に固定し、GFPの核内局在を蛍光顕微鏡(Leica)で観察した。Scale bar: 15 μm。

2. 紫外線損傷応答におけるNBS1上流機能因子の同定

siRNAライブラリーを用い、紫外線損傷応答におけるNBS1の核内局在を制御する上流因子の探索を試みた。

siRNAによりノックダウンしたGFP-NBS1-C強制発現細胞に紫外線を照射し、損傷部位へのGFP局在の有無を指標に検討を行った。

先行研究で、NBS1との相互作用因子が数多く同定されている。siRNAライブラリーのうち、まずは機能既知の因子(MDC1, ATM, ATR)に着目した。その結果、放射線損傷経路でNBS1の上流で機能することが知られている因子(MDC1, ATM)をノックダウンした細胞では、紫外線照射後のGFP-NBS1核内局在には影響を受けなかった。また、紫外線損傷シグナル伝達因子ATRをノックダウンした細胞においても、紫外線照射後のGFP-NBS1核内局在には影響はなかった。

一方、相互作用未知の因子群の中から、紫外線照射後のGFP-NBS1局在変化を抑制する遺伝子が二つ発見された(図2)。

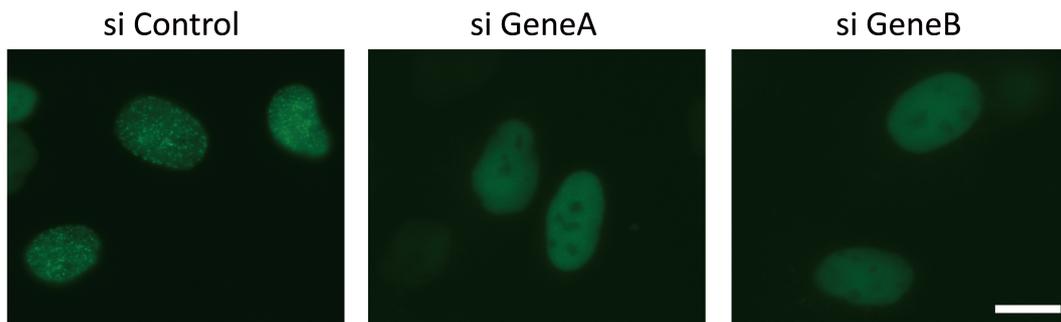


図2. GeneA 及び GeneB ノックダウンにより DNA 損傷部位への NBS1 の集積が抑制された。

GFP タグを付加させた NBS1-C を発現させた U2OS 細胞に, GeneA 及び GeneB 特異的 siRNA (si GeneA/ si GeneB), 標的遺伝子なしのコントロール siRNA (si Control) を導入し, 紫外線 10 J/m² 照射 3 時間後に固定し, GFP の核内局在をハイコンテンツ細胞イメージアナライザー IN Cell Analyzer 2000 (GE ヘルスケア) で観察した. Scale bar: 15 μm.

考 察

NBS1 は電離放射線による DNA 二重鎖切断再結合の修復タンパク質として知られている。一方, 損傷乗り越え DNA 合成は DNA 二重鎖切断とは異なる種類の DNA 損傷に対する細胞応答であるため, NBS1 がこれら両機構においてどのように応答しているのかが謎であったが, 本研究の結果から, 放射線と紫外線により生じる損傷への応答に必要な機能領域が異なることが明らかとなった。この結果は NBS1 が紫外線損傷応答においてこれまで明らかにされてこなかった新たな分子機能を発揮していることを示唆しており, NBS1 の機能が DNA 二重鎖切断の再結合にとどまらないことが改めて示された。紫外線損傷応答に必要であることがわかった NBS1 の C 末端は, 生存に必須であることが知られている領域であるので, この領域の機能解析をさらに進めることでなぜ NBS1 が生存に必須なのかという未解決問題が解明されることが期待される。

siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングから同定された GeneA, GeneB は, 紫外線照射後の NBS1 核内局在変化に重要な役割を持つことが強く示唆された。NBS1 と GeneA/GeneB の関係が損傷乗り越え DNA 合成機構へ関与されると考えられる (図 3)。今後はそれらの作用機序の解明により更なる分子機構の解析を行っていきたい。

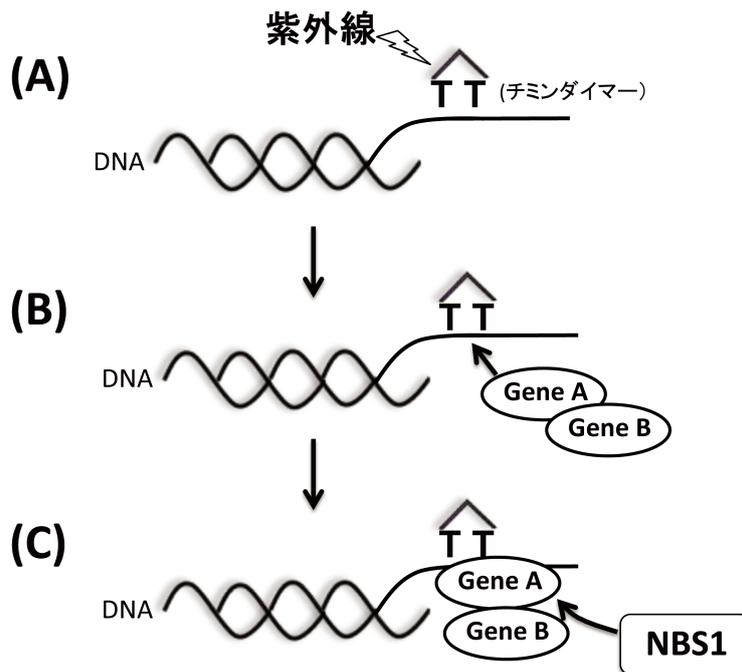


図3. 紫外線損傷部位へのNBS1の集積モデル.

(A) 紫外線照射によりDNA上にチミンダイマー (TT) などの紫外線損傷が生じる. (B) 紫外線損傷部位にGeneA/Bが集積する. (C) NBS1はGeneA/Bと結合し、紫外線損傷部位に集積する. これにより損傷乗り越えDNA合成機構が開始されると考えられる.

共同研究者

本研究の共同研究者は、京都大学放射線生物研究センターゲノム動態研究部門の小松賢志教授ならびに加藤晃弘特任助教である。本稿を終えるにあたり、本研究をご支援いただきました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文献

- 1) Masutani, C., Kusumoto, R., Yamada, A., Dohmae, N., Yokoi, M., Yuasa, M., Araki, M., Iwai, S., Takio, K. & Hanaoka, F. : The XPV (xeroderma pigmentosum variant) gene encodes human DNA polymerase eta. *Nature*, **399** : 700-704, 1999.
- 2) Langevin, F., Crossan, G. P., Rosado, I. V., Arends, M. J. & Patel, K. J. : Fancd2 counteracts the toxic effects of naturally produced aldehydes in mice. *Nature*, **475** : 53-58, 2011.
- 3) Ohkumo, T., Kondo, Y., Yokoi, M., Tsukamoto, T., Yamada, A., Sugimoto, T., Kanao, R., Higashi, Y., Kondoh, H., Tatematsu, M., Masutani, C. & Hanaoka, F. : UV-B radiation induces epithelial tumors in mice lacking DNA polymerase eta and mesenchymal tumors in mice deficient for DNA polymerase iota. *Mol. Cell. Biol.*, **26** : 7696-7706, 2006.
- 4) Stelter, P. & Ulrich, H. D. : Control of spontaneous and damage-induced mutagenesis by SUMO and ubiquitin conjugation. *Nature*, **425** : 188-191, 2003.
- 5) Yanagihara, H., Kobayashi, J., Tateishi, S., Kato, A., Matsuura, S., Tauchi, H., Yamada, K., Takezawa, J., Sugawara, K., Masutani, C., Hanaoka, F., Weemaes, C. M., Mori, T., Zou, L. & Komatsu, K. : NBS1 recruits RAD18 *via* a RAD6-like domain and regulates Pol η -dependent translesion DNA synthesis. *Mol. Cell*, **43** : 788-797, 2011.