

称号及び氏名	博士（獣医学）	東條 瑞希
学位授与の日付	平成28年2月29日	
論文名	マウス細胞における塩基除去修復関連タンパク質の発現動態およびメチル化損傷が <b>N-methylpurine DNA glycosylase</b> のタンパク質間相互作用に及ぼす影響	
論文審査委員	主査	久保 喜平
	副査	竹内 正吉
	副査	小森 雅之

## 論文要旨

### 諸言

哺乳類細胞内の **DNA** は、内的小および外的要因により、恒常的に傷害を受けている。中でも塩基損傷はヒトの **1** 個の細胞あたり **1** 日約 **10,000** 個形成されており、これらが修復されないと複製フォークの停止や突然変異を引き起こす。塩基除去修復 (**BER**) は、これら塩基損傷を修復する経路であり、ゲノムの完全性の維持に貢献している。

**Methyl methanesulfonate (MMS)** は **BER** を研究する上で最もよく用いられてきた **DNA** 損傷剤の一つであり、形成される大半の塩基損傷が **N-methylpurine DNA glycosylase (MPG)** によって除去される。**MPG** は塩基損傷を除去し、脱塩基部位 (**AP site**) を形成する。**AP site** は **AP endonuclease 1 (APEX1)** により **5'**側が切断され、**5'-deoxyribosephosphate (dRP)** が形成される。**BER** の主要経路である **single nucleotide BER (SN-BER)** では **5'-dRP** を **DNA polymerase  $\beta$  (POL  $\beta$ )** が除去して **1** ヌクレオチドを挿入し、**X-ray repair complementing defective repair in Chinese hamster cells 1 (XRCC1) -DNA ligase III $\alpha$** 複合体がニックを結合して修復が完了する。

近年、これら **BER** に直接関与しているタンパク質以外で、**MPG** と物理的に相互作用するものが注目され始め、それらを含めた修復複合体の機能を解明することが

**BER** の全貌を理解する上で重要であると考えられている。また、細胞内環境によってこの複合体の構成が変化する可能性がある。本研究では増殖期の細胞集団に加えて、**BER** に関する報告がほとんどなされていない非増殖期の細胞集団における修復動態および **DNA** 損傷下における細胞内タンパク因子との相互作用による **MPG** の制御機構の一端を明らかにすることを目的とした。

## 第一章 増殖期および非増殖期におけるマウス胎児線維芽細胞の **MMS** 感受性

正常組織や腫瘍組織には増殖期 (**Log**) および非増殖期 (**G<sub>0</sub>**) 細胞が混在するが、これまでの **BER** に関する研究は増殖期細胞を用いたものが主であり、非増殖期細胞を用いた報告はほとんどない。本研究ではマウス胎児線維芽細胞 (**MEF**) を用いて、細胞の増殖性の違いが **BER** 効率に与える影響を検討した。血清飢餓法により、**wild type** 細胞 (**WT**) および **POL β knockout** 細胞 (**Pol b-KO**) で増殖が停止し、それぞれ **80%**、**70%**以上の **G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>** 細胞を含む集団が得られた。**MMS** 感受性試験では、**POL β**の有無に関わらず、**G<sub>0</sub>**細胞は **Log**細胞に比べて **MMS** 抵抗性を示した。また、**Log**、**G<sub>0</sub>**共に **Pol b-KO**は **MMS** 高感受性を示した。そこで、いずれの細胞においても **70%**以上の生存が認められた **1 mM**の **MMS** 処理によって形成される **AP site** 数およびメチル化塩基数を定量した。**Pol b-KO**では、**5'-dRP**の除去を担う **POL β**が欠損しているため **AP site**の蓄積が予測されたが、**Log**および **G<sub>0</sub>**細胞のいずれにおいても蓄積は見られず、逆に **Log Pol b-KO**では **Log WT**の **60%**に減少していた。また、**Log**細胞に比べて **G<sub>0</sub>**細胞では、**WT**、**Pol b-KO**共に **AP site**数が有意に減少していた。**24**時間後の細胞内の残存メチル化塩基数を定量したところ、**Log WT**に比べて **Log Pol b-KO**の残存メチル化塩基数が有意に多いことから、**Log Pol b-KO**では **MPG**による損傷除去活性が低下していることが明らかになり、生存率の低下との一致が見られた。しかし、**MMS**抵抗性であった **G<sub>0</sub>**細胞では、**WT**、**Pol b-KO**いずれの細胞でも **Log**細胞に比べて残存メチル化塩基数が有意に多く、メチル化塩基の修復効率と生存率との不一致が明らかになった。これらの結果から、**Pol b-KO**では **AP site**や **dRP**などの有害な修復中間体が残存するため **WT**に比べて生存率が低く、一方 **G<sub>0</sub>**細胞では中間体の形成数が少ないため **Log**細胞に比べて生存率が高いと考えられる。

## 第二章 増殖期および非増殖期における **N-methylpurine DNA glycosylase** およびその関連タンパク質の定量

第一章において、**MPG**の損傷除去活性は、**POL β**の有無および細胞が増殖期にあるか否かに影響されることが明らかになった。本章では、**WT**および **Pol b-KO**における **MPG**とその関連タンパク質量と、**MMS**処理時のメチル化塩基除去効率との関係を検討した。まず、**SN-BER**の主要なタンパク質である **MPG**、**APEX1**、**POL β**、および **XRCC1**の **mRNA**発現量をリアルタイム **PCR**にて定量した。その結果、**Log Pol b-KO**の **APEX1**の **mRNA**発現量が **Log WT**の **43%**に減少していることが明らかになった。また、**G<sub>0</sub> WT**における **APEX1**および **POL β**の **mRNA**発現量は、それ

ぞれ **Log WT** の **66%** および **52%** であった。これらの結果がタンパク質量に反映されているかを明らかにするために、**western blotting** 分析にて各タンパク質量を定量した。**APEX1** のタンパク質量は mRNA 発現量と一致して、**Log Pol b-KO** では **WT** の **48%** に減少しており、**WT**、**Pol b-KO** 共に **G<sub>0</sub>** では **Log** に比べて減少していた。**MPG** のタンパク質量は、mRNA 発現量に差が見られなかったにも関わらず、**Log Pol b-KO** では **WT** の **52%** に減少しており、また **G<sub>0</sub>** では **WT**、**Pol b-KO** でそれぞれ **Log** の **55%** および **56%** であった。これらの結果から、**MPG** および **APEX1** は主に増殖期にある細胞で重要な役割を果たすことが示唆され、**Pol b-KO** では減少していることが明らかになった。**Pol b-KO** では **SN-BER** で重要な **POL β** が欠損しているため、**BER** の一経路である **long patch BER (LP-BER)** が優位であると考えられる。そこで、**LP-BER** において重要なタンパク質である **proliferating cell nuclear antigen (PCNA)** のタンパク質量を定量した。しかし、予想に反して **Log Pol b-KO** における **PCNA** のタンパク質量は **Log WT** の **29%** であり、また、**G<sub>0</sub> WT** では **Log WT** の **50%** であることが明らかになった。以上の結果から、**G<sub>0</sub>** 細胞および **Pol b-KO** では、**SN-BER** だけでなく **LP-BER** の効率も低下していることが示唆された。第一章で見られた **AP site** 数の減少は、**MPG** 自体の減少に加え、**MPG** の活性を増強する **APEX1**、**POL β** および **PCNA** の減少によるものであると考えられる。

### 第三章 メチル化損傷が **N-methylpurine DNA glycosylase** のタンパク質間相互作用に及ぼす影響

これまでに行われた **in vitro** の研究により、**MPG** の活性については多くの部分が明らかにされたが、細胞内における **MPG** の制御についてはいまだ明らかではない部分が残されている。**In vitro** において、ヒト **MPG** は複製や転写、細胞周期制御などに関わる様々なタンパク質と物理的相互作用することが明らかにされており、**MPG** が高度に制御されていることが示唆されているが、メチル化損傷に反応して **MPG** の活性を制御する初期のセンサータンパク質として働くものの存在はいまだ知られていない。そこで、マウス **MPG** と物理的相互作用するタンパク質をカタログ化し、それらが **MMS** 損傷によって受ける影響を調べることで、**DNA** 損傷時における **MPG** の制御機構の一端を明らかにすることを目的とした。既知の **PCNA** および **p53** に加え、新たに **LCMS/MS** により **heat shock protein 70 cognate (HSC70)** および **replication protein A 32 kDa subunit (RPA2)** を同定し、これらを中心に **MMS** が **MPG** のタンパク質間相互作用に及ぼす影響を検討した。免疫共沈および **western blotting** 分析の結果、**MMS** 未処理時にこれらの全てが **3xFLAG-MPG** と結合することが確認された。**4** 時間の **0.25-0.75 mM MMS** 処理により **PCNA**、**RPA2** との結合は減少し、**p53** との結合は増加した。さらに **15** 分間の **10 mM MMS** 処理を行ったところ、**RPA2** および **p53** との結合の増減は見られたが、**PCNA** との結合は変化しなかった。また、**RPA2** および **p53** は **DNA** 二本鎖切断 (**DSB**) の修復で機能するため、**DSB** の指標である **γ-H2AX** の量を調べたところ、これらと **3xFLAG-MPG** との結合

量の変化は $\gamma$ -H2AX の量と相関することが明らかになった。一方、**3xFLAG-MPG** と **HSC70** との結合はいずれの処理によっても変化しなかった。**Pol b-KO** を用いて同様の実験を行ったところ、**MMS** 未処理時において **3xFLAG-MPG** と検討した全てのタンパク質との結合も見られた。しかし、**WT** と同等の生存率を示す **MMS** 処理下における結合の変化は、**WT** のそれと比較して小さかった。このことから、**3xFLAG-MPG** とこれらとの結合自体には **POL  $\beta$**  は関与しないことが明らかになった。

## 総括

1. **G<sub>0</sub>** 細胞および **Pol b-KO** では **MPG**、**APEX1** および **PCNA** のタンパク質量の減少により、**MPG** の損傷除去活性が低下していることが示唆された。
2. **G<sub>0</sub>** 細胞ではメチル化損傷の修復効率が低いことが明らかとなり、**SN-BER** および **LP-BER** が低下していることが示唆された。その一方、修復中間体の形成数が少ないため細胞生存率が **Log** 細胞に比べて高い可能性が示された。
3. マウス **MPG** と結合するタンパク質として、新たに **HSC70** および **RPA2** が同定された。
4. **MMS** 処理により、**MPG** と **PCNA** および **RPA2** との結合が減少することが明らかになった。
5. **MPG** と **RPA2** の結合解消は、**DSB** の形成に起因することが示唆された。
6. **MPG** と **HSC70**、**RPA2**、**PCNA** および **p53** との結合に、**POL  $\beta$**  は関与しないことが明らかになった。

## 審査結果の要旨

哺乳類細胞の **DNA** 塩基損傷は細胞あたり 1 日に約 **10,000** 個形成されており、これらが修復されずに残ると細胞死や突然変異を引き起こす。その修復を担う塩基除去修復 (**BER**) 機構は、精製酵素を用いて明らかにされてきた。多様なプリン塩基損傷を除去する **N-methylpurine DNA glycosylase (MPG)** が開始する **BER** は、**MPG** の産物である脱塩基部位 (**AP site**) の 5'側の **DNA** 鎖を **AP endonuclease (APEX1)** が切断し、形成された **5'-deoxyribosephosphate** を **POL  $\beta$**  が除去しつつ **1** ヌクレオチドを挿入し、**XRCC1-DNA ligase III $\alpha$**  複合体が **DNA** 鎖を連結して完了する。最近、**MPG** が、**p53** や、**DNA** 二本鎖切断 (**DSB**) 修復に関与する **ATM** など種々のタンパク質と相互作用すること、また、**DNA** 複製時にはアルキル化剤 **MMS** の損傷の修復中間体により、**DNA** 二本鎖切断 (**DSB**) が形成されることが報告されている。本研究は、増殖期と非増殖期の細胞を用いて、**DNA** 複製の有無による **BER** 効率の違いを

明らかにし、さらに MPG とこれと共沈するタンパク質間の相互作用に対する DNA 損傷の影響を調べて、BER 開始を担う MPG の制御に関する知見を得る目的で行われた。

第 1 章では、増殖期 (Log) および血清飢餓法による非増殖期 (G<sub>0</sub>) のマウス胎児線維芽細胞 (MEF) における BER 効率およびそれらに対する POL β の寄与について検討した。MMS 感受性試験では、POL β の有無に関わらず、G<sub>0</sub> 細胞は Log 細胞に比べて MMS 抵抗性を示した。また、Log、G<sub>0</sub> 共に POL β knockout 細胞 (*Pol b*-KO) は wild type 細胞 (WT) に比べて MMS 高感受性を示した。一方、細胞死をほとんど引き起こさない 1mM の MMS 処理 24 時間後の各細胞内の残存メチル化塩基数を比較した結果、Log に比べて G<sub>0</sub> の、また WT に比べて *Pol b*-KO の残存数は有意に多く、G<sub>0</sub> では損傷除去効率と MMS 感受性は必ずしも一致しないことが明らかとなった。

第 2 章では、short-patch BER に必須な MPG、APEX1、POL β および XRCC1 発現量とメチル化塩基の除去効率との関係について検討した。その結果、Log *Pol b*-KO の APEX1 mRNA 発現量が WT の 43% に、また、G<sub>0</sub> WT における APEX1 および POL β の mRNA 発現量も Log に比べて有意に低下していた。APEX1 タンパク質量は mRNA 発現量と一致して、G<sub>0</sub> 細胞や *Pol b*-KO では WT に比べて有意に低下していた。一方、mRNA 発現量に差のなかった MPG は、Log *Pol b*-KO では WT の 52% に低下しており、G<sub>0</sub> では両細胞とも Log の約半分であった。*Pol b*-KO では SN-BER が機能しないことから、もうひとつの long-patch BER 系に必須の PCNA タンパク質を定量した結果、G<sub>0</sub> 細胞や Log *Pol b*-KO では大きく低下していたことから、これらの細胞では LP-BER の効率も低下している可能性がある。以上の結果から、損傷塩基除去効率の低下は、MPG のタンパク質量減少に加え、MPG の活性を増強する APEX1、POL β および PCNA の減少が、大きな要因の一つと考えられる。

第 3 章では、まず、FLAG-MPG 発現 MEF を作成し、LC-MSMS により MPG と相互作用をする 13 のタンパク質を新たに同定した。この中には、シャペロンやプロテオーム関連タンパク質に加えて、DNA 複製や DSB 修復に関与する RPA2 が含まれていた。そこで、MMS 処理細胞内の MPG 結合タンパク質量の増減を未処理時と比較検討した結果、7 種の結合が増加、RPA2 との結合は減少、HSC70 など 5 種は変化しなかった。さらに、これらの中から、HSC70 および RPA2 について、既知の PCNA および p53 と共に、MPG との相互作用に及ぼす MMS の影響を検討した。4 時間の 0.25-0.75 mM MMS 処理により MPG と PCNA、RPA2 との結合は減少し、p53 との結合は増加した。また、DSB 修復で機能する RPA2 および p53 と MPG との結合の変化に伴って DSB の指標である γ-H2AX の量が増加していることが明らかになった。生理的条件下において RPA2 と p53 は結合しており、DSB 形成に伴って、それぞれ PI3K 関連キナーゼである DNA-PKcs により RPA2 が、ATM と ATR により p53 がリン酸化され、両者が解離してそれぞれの損傷応答系で働くことが知られている。

**MPG** もまた **ATM** にリン酸化されることが知られており、これによって **RPA2** との結合の解離が起こった可能性がある。*Pol b-KO* では、**WT** と同程度の $\gamma$ -**H2AX** 形成を示す **MMS** 濃度で、**PCNA** 結合量のみ有意な低下を示し、**POL  $\beta$** の有無はメチル化損傷時の **MPG** のタンパク質間の相互作用に影響することが示唆された。以上の結果は、特に複製時において、**MPG** は **PCNA** や **RPA** と共局在し、**DNA** 損傷、特に **DSB** の発生に伴って、**PI3K** 関連キナーゼの制御下にこれらより解離することを示唆している。

本研究は、増殖時および非増殖時の正常組織において日常的に行われている **DNA** の塩基除去修復の機序の理解をさらに深めたのみならず、抗がん剤として重要な役割を果たしているアルキル化剤の作用に対する細胞応答に関して有用な情報を提供するものと考えられる。したがって、この研究成果は、獣医学および医学における腫瘍研究の新たな研究展開に資するものであり、最終試験の結果と併せて、博士（獣医学）の学位を授与することを適当と認める。