

ゲノム安定性維持における DNA-RNA helicase DHX9 のリン酸化の意義の解明

Function of DHX9 phosphorylation in maintaining genome homeostasis

松谷 咲采, 土屋 唯菜
指導教員 西 良太郎

東京工科大学大学院 バイオニクス専攻 分子生物学研究室

キーワード：DNA 二本鎖切断, 相同組換え修復, DHX9, リン酸化, がん細胞

1. 背景

遺伝情報を含むゲノム DNA は、安定に維持される必要がある。様々な要因によって生じる DNA 損傷は、ゲノムの不安定性を誘発し、染色体異常や細胞死を引き起こす要因となる。そのため、DNA 損傷の修復は、ゲノムの安定性維持に重要な役割を果たしている。DNA 損傷の中でも電離放射線や抗がん剤などによって生じる DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand breaks: DSBs) は、最も重篤な DNA 損傷の一つである。DSB の修復に異常が生じた結果、ゲノム DNA に欠損、変異、重複、転座が生じると家族性乳がんや子宮がんといった疾患、散発性の多様ながんが生じることが分かっている (図 1)。

未修復の DSB が示す高い細胞毒性は、DSB 修復経路ががん治療薬の創薬ターゲットとなり得ることを示唆するものである。特に、DSB 修復機構の分子生物学的な解明はがん放射線治療の改善につながると期待されている。

DSB は、主に非相同末端再結合、あるいは相同組換え修復 (Homologous Recombination: HR)によって修復されることが明らかにされている。これまでの研究から、これらの修復機構は多様なタンパク質翻訳後修飾によって厳密に制御されていることが分かっている。その中でも PIKK (phosphoinositide-3-kinase related protein kinase) ファミリーに属する ATM (ataxia telangiectasia mutated)、ATR (ataxia telangiectasia and Rad3 related)、及び DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit)は、DSB とその修復過程で生じる一本鎖 DNA (single-strand DNA: ssDNA)-RPA 構造によって活性化され、多くの標的タンパク質をリン酸化することで、DSB 修復や細胞周期チェックポイントの制御などの DSB 応答において重要な役割を果たしている (図 2)。

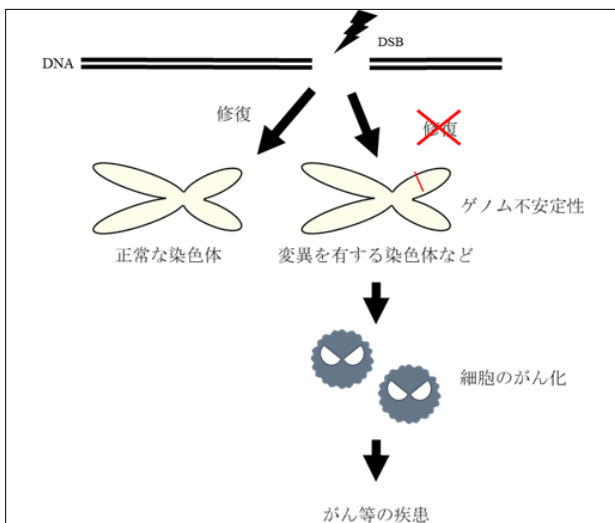
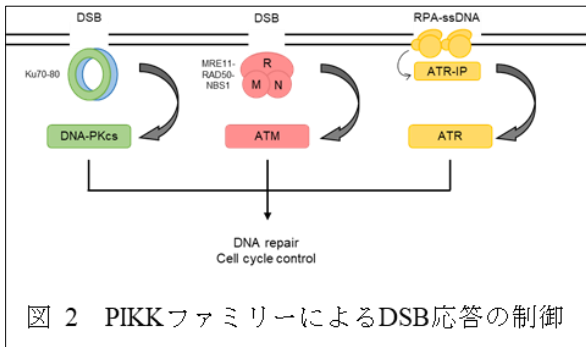


図 1 DSB修復の欠陥・異常による疾患発症過程



2. 目的

我々はこれまでに、DNA-RNA ヘリカーゼである DHX9 が HR に機能していることを報告した。しかしながら、DHX9 がどのようにして DSB 修復に機能するか、DHX9 の機能がどのように制御されているかの詳細な分子機構には不明な点が残っている。我々は、DSB 修復制御にリン酸化が関与していることに着目した。DHX9 が DSB の発生に伴ってリン酸化を受けるか、リン酸化されるならば、そのゲノム安定性維持における意義は何かについて明らかにすることを目的とした。

3. 実験手法

本研究では、ヒト骨肉腫由来である U2OS 細胞及び、これに GFP もしくは GFP タグを融合した DHX9 を安定に発現させた細胞株を使用した。タンパク質抽出液を抗 GFP 抗体で免疫沈降し、PIKK 関連キナーゼのコンセンサス配列である S/TQ のリン酸化を認識する抗体を用いてイムノブロッティングにより検出した。また、このとき、トポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシド (50 μ M、1 時間) あるいはトポイソメラーゼ I 阻害剤であるカンプトテシン (1 μ M、1 時間) 処理し、DSB を誘発させた。DHX9 のリン酸化酵素を特定するため、DSB 損傷誘発剤と併用して ATM と DNA-PKcs の阻害剤 [KU55933 (10 μ M、1 時間)、あるいは NU7441 (5 μ M、1 時間)] を使用し同様の方法を用いて DHX9 のリン酸化の検討を行った。DHX9 のリン酸化が細胞周期によって制御されているかを検討するために、細胞に 2 mM の thymidine を添加

し、16 時間培養した後に 10 時間のリリースを行い、再び 2 mM の thymidine で 16 時間培養を行い G1/S 期境界に同調した。Thymidine 除去後、4 時間培養し S 期に同調した。また、100 μ M の nocodazole 存在下で 16 時間培養した後、6 時間のリリースを行い G1 期同調とした。なお、DHX9 のリン酸化の検討には、前述と同様の方法を用いた。

4. 結果と考察

DHX9 はエトポシド処理に応じてリン酸化され、このリン酸化は DSB 修復の進行とともに減少した。次に、DHX9 を基質とするリン酸化酵素の同定を行った。ATM 阻害剤の存在下では、DSB に応じたリン酸化シグナルの増加が認められなかったが、DNA-PKcs 阻害剤は DHX9 のリン酸化に影響を及ぼさなかった。このことから、DHX9 のリン酸化は、ATM 依存的であることが示唆された。一方、カンプトテシン処理では DHX9 のリン酸化は認められなかった。そこで、DHX9 のリン酸化が細胞周期によって制御される可能性を検討するため、細胞周期を同調し、DHX9 のリン酸化を検討した。その結果、DSB に応じた DHX9 のリン酸化は、G1 期でのみ認められた。しかしながら、DHX9 は S 期ではクロマチン画分に存在する可能性があり、DHX9 のリン酸化が S 期でも起きている可能性は排除できない。DHX9 は HR を促進するが、今回認められた G1 期でのリン酸化は、HR 促進機能とは異なる機能に関与する可能性が考えられる。

