



展 TENBO 望

ヒト細胞における DNA 二本鎖切断の修復

黒沢 綾

Kurosawa Aya

(横浜市立大学大学院 生命ナノシステム科学研究科)

足立 典隆

Adachi Noritaka

1 はじめに

細胞のゲノム DNA は様々な内的・外的要因によって絶えず損傷を受けている。中でも DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break : DSB) は、細胞にとって最も脅威となる DNA 損傷である。DSB は電離放射線やがん化学療法剤などによって誘発されるが、これらが修復されずに蓄積すると遺伝情報の消失や染色体転座、細胞死を招く。本稿では、DSB の検出方法やヒト細胞における DSB の修復機構、DSB 修復因子の異常と疾患について、最近の知見を交えて紹介する。

2 細胞内 DNA 二本鎖切断の検出法

細胞に電離放射線を照射すると DSB が誘発される。その誘発数は、1 Gy の γ 線につき 20~40 個/細胞核 (細胞の核に含まれるゲノム DNA) といわれている¹⁾。本章ではまず、細胞内で生じた DSB を実験上どのように可視化できるかについて述べることにする。DSB の検出は、アガロースゲル電気泳動によって DNA 断片を検出する方法と、蛍光顕微鏡を用いて細胞核中の個々の DSB を観察する方法の 2 つに

大別される。前者の代表的な実験法として、パルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed field gel electrophoresis : PFGE) やコメットアッセイが挙げられる。一般に、アガロースゲルに DNA を充填し通電すると、DNA はアガロースゲル中の網目構造をくぐり抜けながらマイナス極からプラス極へと移動する。その移動距離は DNA 断片の長さにほぼ反比例するため、断片が短いほど移動度が大きい。PFGE では、まず調べたい細胞をアガロースゲルのブロックに包埋し、酵素処理によりタンパク質を分解する。次に、このブロック (裸のゲノム DNA が含まれている) をアガロースゲルに埋め込み、通電をする。もし、ブロック中のゲノム DNA が無傷であれば、一塊の DNA の集合体となって検出されるが、DSB の生じたゲノム DNA は、移動度の異なる短い DNA 断片としてスメア状に検出される (図 1A)。PFGE では個々の細胞中の DSB を検出することはできないが、コメットアッセイでは細胞を直接アガロースゲルに包埋して電気泳動を行うため、個々の細胞に生じた DSB を直接的に観察することができる (図 1B)。しかし、これらの方法は後述する蛍光顕微鏡による方法に比べると実験手法が煩雑である。また、断片化された DNA が DNA 全

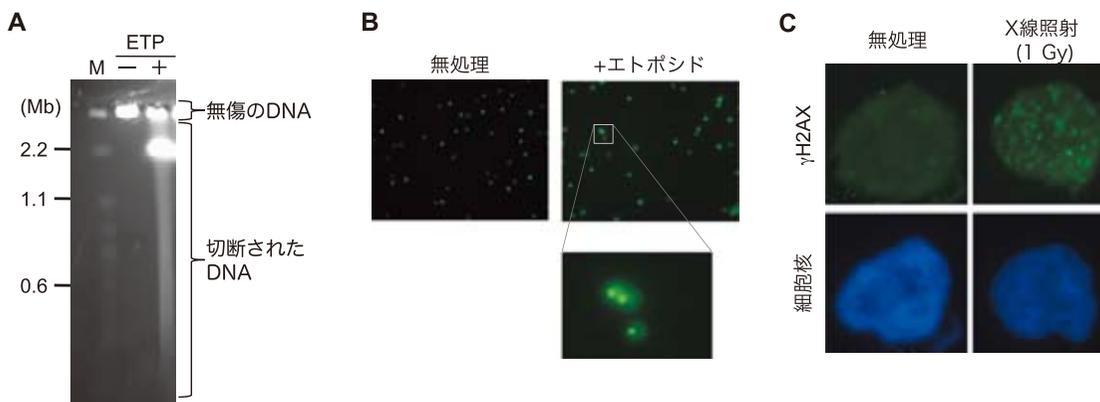


図1 DSBの可視化

(A) パルスフィールドゲル電気泳動

ヒト Nalm-6 細胞を 100 μM のエトポシド (トポイソメラーゼ II 阻害剤) で 1 時間処理した後、ゲノム DNA を抽出してパルスフィールドゲル電気泳動を行った実験結果を示す。エトポシド処理した細胞のゲノム DNA (+) からは、無処理細胞 (-) では検出されないスメア状の DNA 断片が観察される。M はサイズマーカーを示す

(B) コメットアッセイ

105 個のヒト Nalm-6 細胞を 100 μM のエトポシドで 1 時間処理した後、アガロースに包埋してアルカリ溶液中で電気泳動を行った結果を示す。エトポシド処理によって生じた DSB が彗星 (コメット) の尾のように検出される

(C) γH2AX のフォーカス形成

Nalm-6 細胞に 1 Gy の X 線を照射し、1 時間培養したのち、抗 γH2AX 抗体を用いて、免疫染色を行った結果を示す。X 線を照射した細胞でのみ、γH2AX のフォーカスが観察される。核の染色には DNA 結合性物質である 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) を用いた (細胞核)

体に占める割合をもとに DSB 量を算出するため、具体的な DSB の量を知ることはできない。

一方、蛍光顕微鏡を用いた観察は、DSB 部位に集積するタンパク質を検出するという間接的な方法である。DSB が生じると、γH2AX (Phosphorylated histone H2AX, ヒストンバリエーションの 1 つである H2AX の 139 番目のセリン残基がリン酸化修飾を受けたもの) や 53BP1 (p53 binding protein 1) などのタンパク質が速やかに DSB 部位に集積し、フォーカスを形成する²⁾。これらのタンパク質を免疫蛍光染色し、蛍光顕微鏡で観察すると、核中の DSB の位置や数を知ることができる (図 1 C)。この方法では、たった 1 つの DSB でも検出可能であるが、観察の対象とするタンパク質によっては必ずしもフォーカスが DSB を反映しないこともある³⁾。最近では、蛍光タンパク質を融合させた 53BP1 を発現する細胞を用いて、ライブイメージングにより細胞内における DSB の位置や修復の過

程を観察する実験系も構築されている^{1,4)}。

以上の方法による DSB の検出には、5 Gy 以上の放射線を照射する系が少なくなかった。その理由は、DSB に応答して生じるタンパク質のリン酸化修飾やタンパク質-タンパク質相互作用の変化を高感度に検出するためには、多量の DSB を誘発する必要があるためである。しかし最近では、低い線量の放射線が人体へ及ぼす影響の詳細な解析を行うため、従来よりも低い線量の放射線による細胞への影響に関する研究が進められている。

3 相同組換えと非相同末端連結

では、DSB は細胞内でどのような機構で修復されているのだろうか。ヒト細胞には 2 つの主要な DSB 修復経路が存在する⁵⁾。1 つは相同組換えと呼ばれ、姉妹染色分体 (DNA 複製によって生じた同じ配列を持つ染色体) の DNA

配列を利用して正確な修復を行う。もう1つは非相同末端連結（non-homologous end joining：NHEJ）と呼ばれ、DNAの相同性とは無関係に切断された末端同士を直接連結する。NHEJによる修復は、再連結に伴ってヌクレオチド数の増減を伴うことがあるため、修復の正確性は低い。

相同組換えでは、DSBが生じるとヌクレアーゼ等の働きにより3'突出末端が作り出される（図2A-i）。これをリセクションと呼ぶ。生じた3'突出末端に多数のRad51が巻き付くように結合する（フィラメント形成する）と、Rad54などとともに姉妹染色分体中に存在する相同な配列を探索する。相同な配列が見つかり、姉妹染色分体と対合し（図2A-ii）、相同な配列を鋳型としてDNA合成を開始する（図2A-iii）。その後、元の鎖と再連結し、修復が完了する（図2A-iv）。一方、NHEJでは、DSBが生じるとまずKuと呼ばれるDNA結合性タンパク質（Ku70とKu80からなるヘテロ二量体）がDSB末端に結合し、末端を保護する（図2B-i）。そのままDNAリガーゼIV/XRCC4複合体により末端が再連結され、反応が終了することもあるが、多くの場合DNA依存性プロテインキナーゼ触媒サブユニット（DNA-dependent protein kinase catalytic subunit：DNA-PKcs）やArtemisヌクレアーゼなどによる“末端加工”を経て（図2B-ii）、末端が再連結される（図2B-iii）。

末端加工とは、DNAリガーゼによる再連結が可能な末端を作り出すことであり、プロセシングやエンドプロセシングとも呼ばれる。この過程では、ヌクレアーゼやDNAポリマー

ゼが中心となって働く。末端加工を必要とする理由の1つは、切断に伴って切断部位近傍のヌクレオチドが失われることである。複数のヌクレオチドの消失によりDSB末端同士の相補性が失われると、そのままでは再連結することができない。そのため、ヌクレアーゼやDNAポリマーゼによりDSB末端のヌクレオチドを増減させ、互いに相補的な末端を作り出す。末端加工を必要とするもう1つの理由は、DSB末端のヌクレオチドの化学構造の変化である。DNAリガーゼによるDNAの連結は、酵素学的にはヌクレオチドの5'リン酸基と3'水酸基のリン酸ジエステル結合を触媒することを指す（図3⁶）。しかし、電離放射線によって生じるDSBの末端は、3'ホスホグリコール酸基など、DNAリガーゼの基質とならない構造をとっているため⁷、修復に先立ってこれらを除去する必要がある。

相同組換えとNHEJは酵母からヒトに至るまでよく保存された機構であるが、関与する遺伝子の数や重要度は種によって大きく異なる。ま

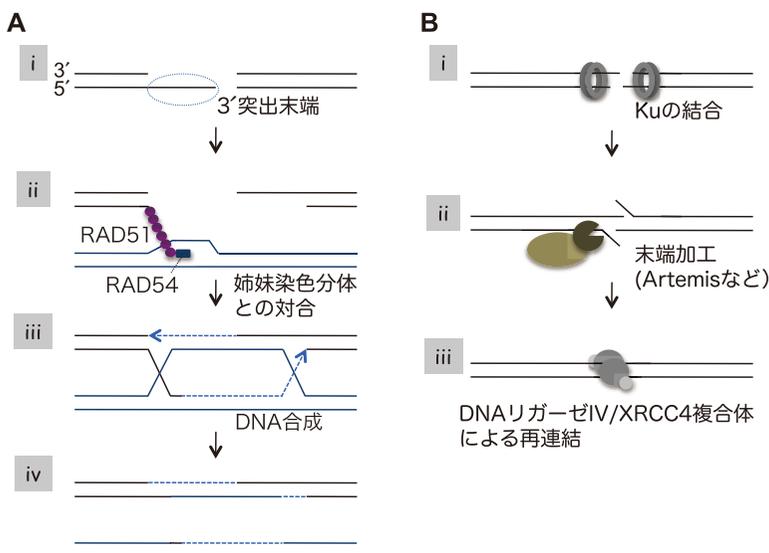


図2 DNA二本鎖切断修復経路
 (A) 相同組換え機構の概略
 (B) 非相同末端連結機構の概略
 (詳細は本文参照)

た、高等な動物ほど NHEJ への依存度が高いといわれている⁸⁾。これには、各経路と細胞周期との関係性や修復に掛かる時間、反復配列の修復への影響が関係している可能性がある。細胞周期とは、1つの細胞が2つの細胞に分裂するまでの過程を4つのステージ (G₁ 期, S 期, G₂ 期, M 期) に分けたものである。DNA 合成は S 期 (synthesis の頭文字) に行われ、細胞分裂は M 期 (体細胞分裂を意味する mitosis の頭文字) に行われる。G₁ 期と G₂ 期 (G はいずれも gap の頭文字) は、DNA 合成や細胞分裂のための準備とチェックを行う期間である。NHEJ による修復は細胞周期を通して可能であるのに対し、相同組換えは姉妹染色分体の存在する S 期から G₂ 期にしか起こらない。対数増

殖期 (細胞密度や栄養供給が適切に保たれ、一定時間ごとに安定して倍加できる時期) にあるヒト細胞では細胞周期全体の約 50% を G₁ 期が占めており、G₁ 期の短い酵母やマウス ES 細胞と比べると相同組換えが可能な時期は短い。修復に掛かる時間も大きく異なっており、ヒト細胞では NHEJ による修復は 30 分程度で終了するが、相同組換えによる修復は 7 時間を要するという報告がある。修復が行われている間は細胞周期が停止するため、DNA 合成という重要なイベントの長時間にわたる停止は、細胞にとってリスクが高い。さらに、ヒトゲノムの約 50% は反復配列で構成されており、反復配列間での相同組換え修復は染色体の欠失や転座を引き起こす可能性がある。したがって、遺伝情報

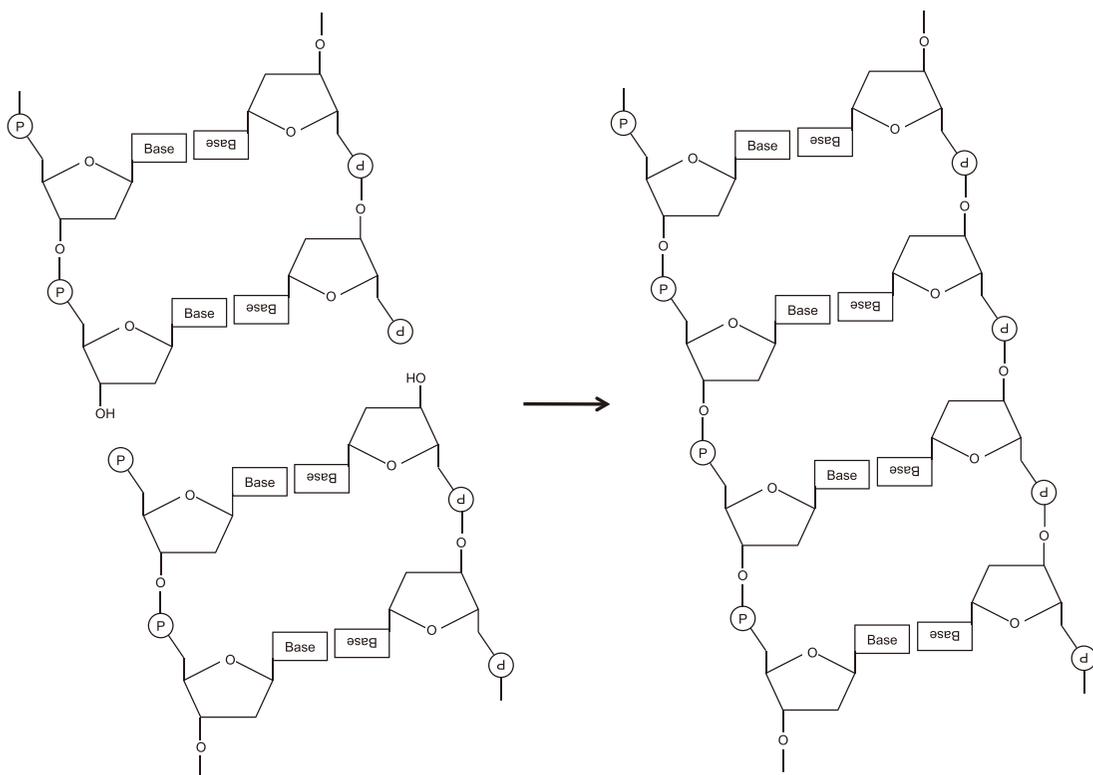


図3 DNA リガーゼによる DSB 末端の連結

DNA は、デオキシリボースの 1 位の炭素に塩基 (base) が結合し、5 位の炭素にリン酸基 (P) が結合したヌクレオチドの重合体である。DNA リガーゼは、ヌクレオチドの 3' 水酸基と 5' リン酸基を基質として、リン酸ジエステル結合を触媒する酵素である。哺乳類細胞の核内では、DNA リガーゼ I、III α 、IV という 3 種類の DNA リガーゼが発現している。それぞれの DNA リガーゼには明確な役割分担があり、DNA リガーゼ IV は NHEJ に必要不可欠である

の消失を伴うものの、NHEJによる修復の方がヒト細胞の生存にとってリスクが少ないのかもしれない⁹⁾。

4 ヒト細胞におけるDNA二本鎖切断修復

DSB修復には、相同組換えとNHEJと呼ばれる2つの主要な修復経路が存在することを述べた。では、電離放射線によってDSBが生じたとき、ヒト細胞はこれらの経路をどのように使い分けているのだろうか。これを調べるため、我々はヒトNalm-6細胞を用いた遺伝子ターゲティング法により、DSB修復に関わる主要なタンパク質をコードする遺伝子（タンパク質を構成するアミノ酸配列が記されたDNA領域）を破壊したヒト細胞株を作製した¹⁰⁾。作製した細胞株は、RAD54をコードする遺伝子の破壊により相同組換え能を欠損させたRAD54破壊株と、DNAリガーゼIVをコードする遺伝子の破壊によりNHEJ能を欠損させたLIG4破壊株、及び相同組換え能とNHEJ能の両方を欠損させたLIG4/RAD54二重破壊株である。これらの遺伝子破壊株と親株（野生株）を用いて、コロニー形成法によりX線感受性を調べたところ、いずれの遺伝子破壊株も野生株よりも高い感受性を示すことが分かった（図4）。また、LIG4/RAD54二重破壊株が、各単独破壊株よりも高感受性であったことから、相同組換えとNHEJの両方が電離放射線によって生じたDSBの修復に重要であることが分かった。興味深いことに、3 Gy以下の線量では、LIG4破壊株がRAD54破壊株よりも高感受性を示したのに対し、3 Gyを境にRAD54破壊株の方がLIG4破壊株よりも高感受性を示した。したがって、低線量のX線によって生じたDSBの修復にはNHEJがより重要であると考えられる。ところで、LIG4/RAD54二重破壊株は相同組換え能とNHEJ能の両方を欠損しているにも関わらず、X線を照射しても生残する細胞が出現する。このことは、相同組換えとNHEJ以外にも

DSBを修復できる経路が存在することを意味する。この第三の経路は、代替的末端連結（alternative end-joining）若しくはバックアップ末端連結（backup end-joining）などと呼ばれ、近年注目を浴びている修復経路である¹¹⁾。この代替経路には、一本鎖切断修復因子（DNA ligase IIIなど）や相同組換えにおけるリセクション因子が関与するといわれているが詳細は不明である。この経路によってDSBが修復されると、連結部位におけるヌクレオチドの大幅な消失がみられる。そのため、代替的末端連結による修復はNHEJよりも更に正確性が低いと考えられている。

電離放射線が細胞周期とは無関係に直接的にDNAを切断し、その修復には相同組換えとNHEJの両方が重要であることを述べた。しかし、DNA複製に伴って誘発されるDSBの修復について調べてみると、意外な結果が得られた。先述のヒトNalm-6細胞野生株と遺伝子破壊株を、トポイソメラーゼI阻害剤であるカンプトテシンやポリADP-リボース合成酵素（poly（ADP-ribose）polymerase：PARP）阻害剤であるNU1025で処理したところ、RAD54破壊株は野生株よりも高感受性を示したが、LIG4破壊株は野生株よりも耐性を示した¹⁰⁾。カンプトテシンやNU1025は、DNA一本鎖切断を誘発する。こうした損傷は、通常一本鎖切断修復機構によって修復されるが、未修復の部位のDNAを複製する際、DSBへと変換される。このように生じたDSBは、電離放射線などによって生じるDSBとは異なり、DSBが1つしか生み出されないため（元通りに修復可能なパートナーが存在しないため）、NHEJによって修復されると染色体異常や細胞死を招く。このため、DNA複製に伴って一本鎖切断から生じるDSBの修復には相同組換えが必須となる。もし、生じたDSBがDNA複製に伴って一本鎖切断から生じたDSBであることを細胞が認識し、相同組換えを選択しているのであれば、これらの薬剤に対するLIG4破壊株の感受性は野

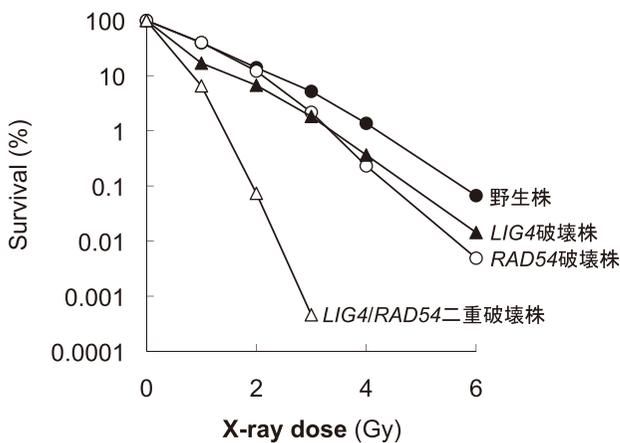


図4 X線によって誘発されるDSBの修復における相同組換えとNHEJの重要性
ヒトNalm-6細胞及び γ RAD54破壊株、LIG4破壊株、LIG4/RAD54二重破壊株に、0、1、2、3、4、6 GyのX線を照射し、コロニー形成法により細胞の生残率を算出した

生株と変わらないはずである。このことから、細胞はDSBの修復経路としてNHEJを最初に選択しているのではないかと考えられる。この考えは、NHEJにおいて最初にDSB末端に結合するKuタンパク質が核内に豊富に発現していることや、高等動物細胞がDSBの修復をNHEJに強く依存していることとも一致する。したがって、LIG4破壊株でみられたカンプトテシンやNU1025に対する感受性の低下（生残率の上昇）は、相同組換えによって正しく修復されたための結果であると考えられる。LIG4破壊株ではNHEJ反応が途中までは正常に進行するが、連結反応が行われなため修復は完了しない。このとき、NHEJから相同組換えへと修復経路を切り替える機構が存在していると考えられる。我々は以前、NHEJで末端加工因子として働くArtemisヌクレアーゼをコードする遺伝子を破壊した細胞株（ARTEMIS破壊株）を用いて、X線感受性を調べたことがある。そして、この破壊株がLIG4破壊株と同様に低線量のX線には野生株よりも高感受性となるにもかかわらず、6 Gyでは野生株と同程度の感受性しか示さないことを見だしてい

た¹²⁾。このことは、高線量のX線を照射された細胞の生残率は、Artemis欠損の影響を受けないことを意味している。このArtemisの重要度の変化は、相同組換えとNHEJの重要度の変化と関連があるかもしれないと考え、LIG4/ARTEMIS二重破壊株を作製し、X線感受性試験を行った。その結果、2 Gy以下のX線を照射したときのLIG4/ARTEMIS二重破壊株の生残率はわずかながらLIG4破壊株よりも高いことが分かった。LIG4/ARTEMIS二重破壊株が示したX線への抵抗性がDSB修復と関連しているかどうかを調べるため、抗 γ H2AX抗体を用いてX線照射24時間後の残存DSB量を調べたところ、LIG4/ARTEMIS二重破壊株では残存DSB量がLIG4破壊株よりも減少していることが分かった。したがって、LIG4破壊株ではArtemisを欠損すると修復効率が高くなると考えられる。こうしたLIG4/ARTEMIS二重破壊株がLIG4破壊株よりも高い生残率を示す現象は、トポイソメラーゼII阻害剤エトポシドにおいてさらに顕著であった。また、LIG4/ARTEMIS二重破壊株は一本鎖切断誘発剤（カンプトテシンやNU1025）にLIG4破壊株よりも耐性を示すことや、遺伝子ターゲティング（相同組換えを介して行われる）の効率がARTEMIS破壊株やLIG4/ARTEMIS二重破壊株において野生株よりも上昇していることも分かっている。これらの結果から、Artemisを欠損すると相同組換えによる修復への切り替わりが起りやすくなっている可能性が示唆される。

5 DSB修復因子の異常と疾患

最後に、DSB修復因子の異常がもたらす疾患について紹介する。相同組換えに関わる遺伝子の異常は、家族性乳がんや子宮がんをはじめとするがんの原因となるほか¹³⁾、ファンコニ貧

血やブルーム症候群といった先天性遺伝疾患の原因ともなる。これら相同組換えに関わる遺伝子の異常を原因とする先天性遺伝疾患は、発がん率が高いことも分かっている¹⁴⁻¹⁷⁾。

相同組換え因子の異常が発がんを招く一方、NHEJ 因子の異常は免疫細胞である T 細胞や B 細胞の欠損を主因とする重症複合型免疫不全 (severe combined immunodeficiency : SCID) を招く¹⁸⁾。また、NHEJ に関わる遺伝子の異常は、免疫不全だけでなく小頭症などの神経疾患を引き起こすが^{19,20)}、現在のところ、神経発生における NHEJ の役割はわかっていない。今後、様々なヒト細胞を用いた研究により、DSB 修復や発生過程における NHEJ の役割が明らかになっていくものと思われる。

6 おわりに

本稿では、DSB の検出方法や、DSB 修復経路とその選択機構、DSB 修復の異常と疾患との関連について紹介した。ヒト細胞における DSB 修復機構の全容は解明されておらず、個々の修復因子の役割や重要性についても不明な点が多い。DNA-PKcs の発現量の違いに代表されるように、種差を考慮する必要もある。もしかするとヒト細胞に特有な NHEJ 制御機構が存在するかもしれない。今後、ライブイメージングによる DSB 修復過程の観察やヒト遺伝子破壊株を用いた解析等により、個々の因子の詳細な機能、特に修復因子間の相互作用や機能的オーバーラップが明らかになれば、DSB 修復機構への理解が更に深まっていくものと期待される。

参考文献

- 1) Asaithanbly, A. and Chen, D.J., *Nucleic Acids Res.*, **37**, 3912-3923 (2009)
- 2) Marková, E., Torudd, J., and Belyaev, I., *Int. J. Radiat. Biol.*, **87**, 736-745 (2011)
- 3) Ichijima, Y., Sakasai, R., Okita, N., Asahina, K., Mizutani, S., and Teraoka, H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **336**, 807-812 (2005)
- 4) Jakob, B., Splinter, J., Durante, M., and Taucher-Scholz, G., *Proc. Natl. Acad. U S A.*, **106**, 3172-3177 (2009)
- 5) Goodarzi, A.A. and Jeggo, P.A., *Adv. Genet.*, **82**, 1-45 (2013)
- 6) Timson, D.J., Singleton, M.R., and Wigley, D.B., *Mutat. Res.*, **460**, 301-318 (2000)
- 7) Povirk, L.F., Zhou, T., Zhou, R., Cowan, M.J., and Yannone, S.M., *J. Biol. Chem.*, **282**, 3547-3558 (2007)
- 8) Liu, L., Majumdar, A., Liu, J., Thompson, L.H., and Seidman, M.M., *J. Biol. Chem.*, **285**, 23198-23207 (2010)
- 9) Adachi, N., Yano, K., and Kurosawa, A., *Tanpakushitsu Kakusan Koso*, **54**, 472-478 (2009)
- 10) Kurosawa, A., Saito, S., So, S., Hashimoto, M., Iwabuchi, K., Watabe, H., and Adachi, N., *PLoS One*, **8**, e72253 (2013)
- 11) Schipler, A. and Iliakis, G., *Nucleic Acids Res.*, **41**, 7589-7605 (2013)
- 12) Kurosawa, A., Koyama, H., Takayama, S., Miki, K., Ayusawa, D., Fujii, M., Iizumi, S., and Adachi, N., *DNA Cell Biol.*, **27**, 55-61 (2008)
- 13) Milne, R.L. and Antoniou, A.C., *Ann. Oncol.*, **22**, i11-i17 (2011)
- 14) 平明日香, 高田穰, *臨床血液*, **54**, 1625-1632 (2013)
- 15) Wu, L., *DNA Repair*, **6**, 936-944 (2007)
- 16) Nimonkar, A.V., Genshel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C., *Genes Dev.*, **25**, 350-362 (2011)
- 17) Bernstein, K.A., Gangloff, S., and Rothstein, R., *Annu. Rev. Genet.*, **44**, 393-417 (2010)
- 18) Kurosawa, A. and Adachi, N., *J. Radiat. Res.*, **51**, 503-509 (2010)
- 19) Woodbine, L., Neal, J.A., Saki, N.K., Shimada, M., Deem, K., Coleman, H., Dobyns, W.B., Ogi, T., Meek, K., Davies, E.G., and Jeggo, P.A., *J. Clin. Invest.*, **123**, 2969-2980 (2013)
- 20) Chistiakov, D.A., *Adv. Exp. Med. Biol.*, **685**, 175-185 (2010)