

ライブセルイメージングから見た DNA 二重鎖切断認識の分子機構

熊本大学 バイオエレクトリクス研究センター 諸富桂子・矢野憲一

Non-homologous end-joining (NHEJ) is the major repair pathway for DNA double-strand breaks (DSBs) that are the most severe form of DNA damages. Recently, live cell imaging techniques coupled with laser micro-irradiation were used to analyze the spatio-temporal behavior of the NHEJ core factors upon DSB induction in living cells. Based on the live cell imaging studies, we proposed a novel two-phase model for DSB sensing and protein assembly in the NHEJ pathway. This new model provides a novel view of the dynamic protein behavior on DSBs and broad implications for the molecular mechanism of NHEJ.

Key words: DNA double-strand breaks, Live cell imaging, Laser micro-irradiation, Non-homologous end-joining

1. はじめに

DNA二重鎖切断 (DNA double-strand break, DSB) は細胞にとって最も重篤な障害の一つであり、そのすみやかな認識と修復はゲノム安定性の維持にきわめて重要とされている¹⁾。また、修復しきれないDSBを持つ細胞はアポトーシスによって生体から除去されるが、これは放射線による癌治療の基本的な原理でもある。よって細胞内でのDSBの認識・修復の分子機構は多くの研究者の強い興味を引き続けているテーマであり、これまでに様々な研究が積み上げられてきた。

近年、生きた細胞内でのタンパク質分子の挙動を観察する手法であるライブセルイメージングがDSB修復研究に用いられるようになり、それによって新たな

知見が得られ、新たな概念が生まれつつある。本稿では、まずライブセルイメージングがDNA修復研究においてどのように用いられているかについて紹介する。次にDSB修復の主要経路の一つである非相同末端連結 (Non-homologous end-joining, NHEJ) の基本因子がDSBの発生に伴い細胞内でどのように挙動するかを述べる。従来想像されてきたDSB認識モデルでは、特定の機能を担う様々な修復因子が一定の順序で集まっていき、安定な複合体を段階的に形成していくことでDSB修復反応が順次進行していくと想像されてきた。しかし生体内の分子挙動を実際に測定することが可能になると、DSBの認識と修復因子の集合は、従来想像されていたものよりはるかに動的な過程であることが明らかになってきた。

2. DNA損傷応答のライブセルイメージング解析

DNA修復に関与するタンパク質の細胞内挙動を観察する方法として長らく用いられてきたのは、放射線照射した細胞の免疫染色である。この方法は現在でも重要ではあるがいくつかの問題点をかかえている。まず、DSB発生直後に起こる応答反応はDSB認識と修復に最も重要なステップと想像されていたが、免疫染色法では細胞の固定などの前処理が必要であることからDSB応答の最初期段階を解析することは不可能であった。また免疫染色法は二次抗体を使用することや、抗体によって結合性が異なることなどから、定量的解析が実質的に不可能であった。

近年、生きた細胞内のタンパク質分子を観察する手法が大きく発展してきており、DNA修復研究にも積極的に取り入れられるようになってきている。こういった手法はライブセルイメージングやリアルタイムイメージングなどと呼ばれており、解析したい因子をGFPやYFPといった蛍光タンパク質と融合させて細胞内で発現させ、細胞内における蛍光局在部位とその強度を経時的に計測することが基本的な操作である²⁾。さらに生きた細胞の顕微鏡観察を行っている状態でDNA損傷を加えることができれば、DNA損傷に対する速い応答を解析することが可能となる。そこで用いられるようになったのがレーザーマイクロビームである。

Live Cell Imaging Reveals a Novel View of DNA Double-Strand Break Recognition
Keiko MOROTOMI-YANO and Ken-ichi YANO (*Bioelectrics Research Center, Kumamoto University*)
〒860-8555 熊本市黒髪2-39-1
熊本大学バイオエレクトリクス研究センター
TEL: 096-342-3965
E-mail: yanoken@kumamoto-u.ac.jp

2-1. レーザーマイクロビームによる部位特異的な DSBの生成

レーザーは光と同じ性質を持つため、これを蛍光顕微鏡の光路を通し、対物レンズによって蛍光観察と同じ焦点にレーザーを集中させることができる。このことを利用して顕微鏡観察下の単一細胞核中の特定部位にDNA損傷を作り出すことができる。熱の発生を抑えるため、通常はナノ秒レベルのパルス化したレーザーを使用する。生じるDNA損傷の種類と量はレーザーの波長と強度に依存している^{3)~5)}。またBrdUを染色体DNAに取り込ませたり^{6), 7)}、Hoechst33342などの増感剤を生細胞に短時間作用させた上でレーザー照射を行うことでDSB生成の効率を上げることも行われている⁵⁾。

生きた細胞内の微小領域にレーザーを照射した際にいかなる化学反応が生じてDNA損傷が生じているのかについては確固とした答えは得られていない。しかしながら、どのようなレーザー照射条件でどういったDNA損傷がどの程度生じるかについては多くの研究者によって詳細な条件検討がなされており^{3)~5), 8)}、DNA損傷を効率的に誘発させるための手段として、レーザーマイクロビーム照射はこの数年間で広く受け入れられるようになっていく。

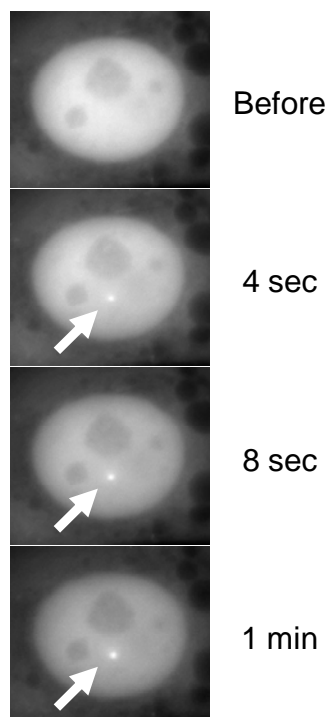


図1 レーザーマイクロビーム照射によるDNA損傷の部位特異的誘発。YFP-XLFを発現している細胞の核内にレーザーマイクロビームを照射し、損傷部位（白い矢印）へのYFP-XLFの集積を経時的に観察した。

レーザー照射によるDNA損傷のメカニズムに未知な点が残るにもかかわらず、DNA修復の研究分野で広く重用されるようになったのは、従来の手法ではカバーできなかった領域を解析できるためである。レーザーマイクロビーム照射の大きな利点は、まず第一に、リアルタイム解析と併用することで観察している任意の部位にDSBをつくれることである。これによって、DSB発生直後の最初期段階の反応が観察可能となっている（図1）。レーザー使用のさらなる利点は、単一の細胞核内で損傷部位と非損傷部位を明確にわけることができ、より精度の高い比較が可能となったことである。さらに、タンパク質の相対量の比較は免疫染色法ではきわめて困難であるが、ライブセルイメージングではGFPの蛍光強度を定量することで容易に行うことが可能であり、次に述べるFRAP法を可能としている。

2-2. FRAP法

従来の免疫染色法などでは、細胞を固定し染色することで、細胞内の特定の部位にタンパク質が局在していることを観察することができる。しかし実際の生きた細胞中では、タンパク質が安定して存在するかのようには観察される部位であっても分子は常に激しく入れ替わっており、特定部位上の分子と、その周囲に存在して自由に運動している分子の間で平衡状態が成立している。この生体内における分子の平衡状態に関する情報を得ることができる手法がFRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)法である^{2), 9)}。この方法は強い光を照射するとGFP融合タンパク質は退色（光退色, photobleaching）するが、タンパク質の顕著な構造変化や機能への影響が生じないことに基づいている。細胞内のごく限定された領域内のGFPを光退色させると、その蛍光を失ったタンパク質分子は、周囲を自由に運動している蛍光タンパク質と徐々に入れ替わるため、光退色領域の蛍光は時間とともに回復していく。この回復スピードや回復の度合いを定量的に計測することで、細胞内の特定部位におけるタンパク質のturnover（以下、ターンオーバー）を解析することができる。これを先のレーザーマイクロビーム照射によって誘発したDNA損傷部位に限定して行くと、DNA損傷部位でのタンパク質分子の挙動に関する情報が得られることになる（図2）。

2-3. DNA修復能欠損細胞株

生体内の多くの反応は複数の因子が協調的に作用することで精緻に制御されている。ある遺伝子を欠損する細胞において、他の関連因子の挙動がどのように変化するかを検討することは、反応全体における特定遺伝子の役割を明確化するのにきわめて有効な手段である。DSB修復研究の分野ではCHO細胞由来の様々な欠損株が単離されてきている。従来から広く用いられているこれらの細胞株をライブセルイメージングに用いることで重要な知見が得られている。同様の解析は

RNA干渉法によっても行えるが、RNA干渉法の場合、効果が必ずしも100%でなく、特に細胞ごとのRNA干渉効果にばらつきが存在するため、解析結果の解釈には特に注意が必要である。

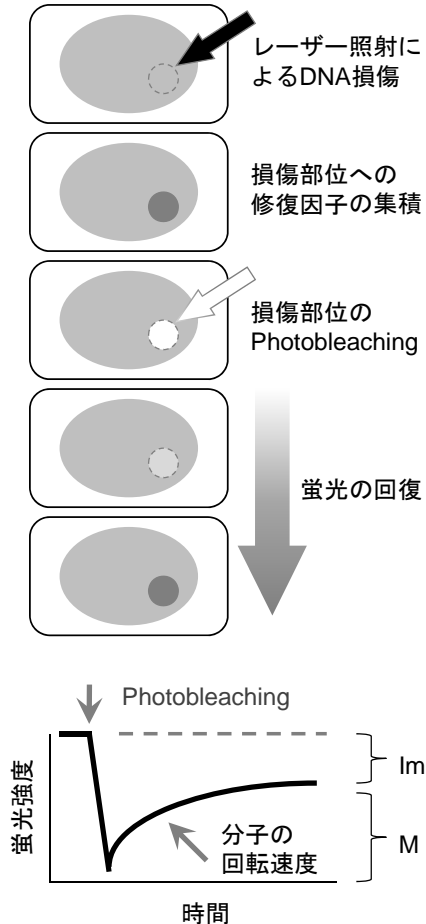


図2 FRAP法の原理。GFPを付加したDNA修復タンパク質を発現している細胞にDNA損傷を誘発する。次に、損傷部位に集積するGFPタンパク質を光退色 (photobleaching) させた後、蛍光の回復を定量的に測定する。蛍光の回復スピードから分子のターンオーバー速度に関する情報が得られる。光退色前に比べて回復した割合 (M) と回復しなかった割合 (Im) は、その部位でターンオーバーしている分子の割合と、結合して離れることができない分子の割合をそれぞれ表している。

3. 非同末端連結経路におけるDNA二重鎖切断認識の分子機構

真核生物にはNHEJと相同組換えの二つの主要なDSB修復経路が存在する¹⁾。ヒトをはじめとする哺乳類では、相同組換えは細胞周期S期の後半からG2期にのみ機能するよう制限されているため、細胞周期依存

性のないNHEJがヒトにおける主要なDSB修復経路といえる。

3-1. NHEJ反応の基本因子

生化学的にはNHEJは二つのDNA末端のライゲーション反応といえ、他の生体反応に比べると比較的単純な反応といえる¹⁰⁾。(実際の細胞内では損傷DNAの形状に応じて各種ヌクレアーゼやヘリカーゼによるプロセッシングも起こる。)この反応に必須の因子(基本因子)は全て同定されており、個々の基本因子は特定の機能を担っていることが判明している(図3)。Kuはリング状構造をとる分子で、DNA末端に対するきわめて高い親和性を持っており、DSBを感知するセンサーとして機能している¹¹⁾。DNA-PKcs (catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase) は4000を超えるアミノ酸から構成される巨大なプロテインキナーゼであり、KuとDNA端の存在下で酵素活性が著しく上昇する¹²⁾。XRCC4/DNA Ligase IV複合体はNHEJ経路におけるDNAリガーゼである¹³⁾。XLF (Cernunnosとも呼ばれる)はXRCC4/DNA Ligase IV複合体の酵素活性を促進する働きがある¹⁴⁾。生化学的手法による解析を行うと、これらの全ての因子は互いに相互作用できることが観察される(図3)。

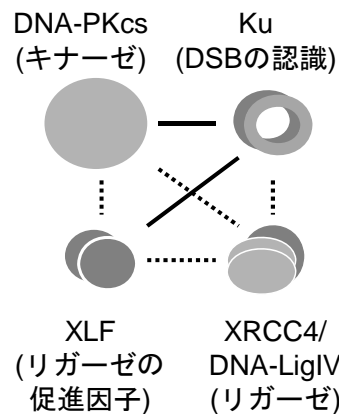


図3 NHEJ基本因子の機能と相互作用。通常タンパク質間相互作用を点線で、DNA依存性のタンパク質間相互作用を実線で示した。

3-2. 従来のDSB認識モデル

それではこれらの基本因子が実際の細胞内でどのようにDSBを認識し修復反応を開始するのであろうか。各基本因子の分子構造や生化学的知見から想像されたモデルが図4である¹⁾、¹⁵⁾。このモデルでは、DSB上に各因子が一つずつ順番に積み重なっていきとされている。各因子は特定の機能を持つため、一つの因子がDSB上に呼び込まれることは一つの生化学的反応が開始されることでもあったと考えられていた。生きた細胞内でこのようなことが実際に起こっているかを免疫染色法で検証することは困難であったが、試験管内で

生化学的に検出できる様々な現象と矛盾しないことから、長らく多くの研究者に信じられてきた。

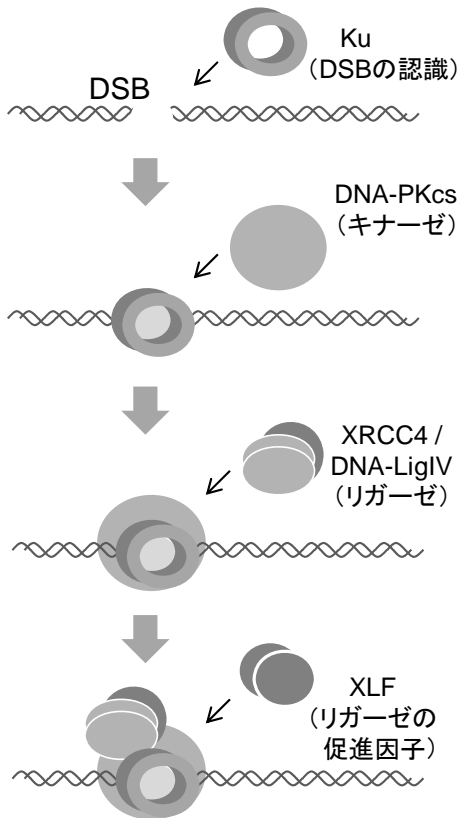


図4 従来のNHEJ基本因子の分子集合モデル

3-3. ライブセルイメージングによるDSB認識機構の解析

4つのNHEJ基本因子のうち、XLFは最も新たに同定された因子で、2006年にその存在が明らかになった¹⁶⁾。XLFはXRCC4に結合してDNA ligase IVの酵素活性を促進する機能を持つが、当初、このXLFはXRCC4に伴われてDSBにリクルートされると想像されていた¹⁵⁾。私たちはXLFのDSB部位への集積がXRCC4に本当に依存しているかについて解析を行った¹⁷⁾。YFPタグをつけたXLFをXRCC4欠損細胞株と相補細胞株で発現させ、レーザーマイクロビーム照射とライブセルイメージング法によってDSBへ集積するかを検討した。するとXLFはXRCC4が存在しなくてもDSB部位に素早く集積することが観察された。次にFRAP法によるDSB上でのXLF分子の挙動を解析したところ、XLFはXRCC4が存在しなくてもDSB上に集まることができるが、DSB上に安定してとどまるためにはXRCC4が必要であるということが明らかになった。この観察はNHEJにおけるDSB認識と分子集合を考える上で、DSBを認識してそこに分子が集まるまでと、DSB上に分子が集まった後の2つの相にわけて考えるべきであることを示している。またこの観察は、従来信じられてきたような基本因子が一つずつDSB上に

順序よく集合していくというモデルに疑問を投げかけるものでもあった。さらに私たちはDNA-PKcsとXRCC4の細胞内での分子挙動を様々なNHEJ欠損細胞中で検討を行った^{8), 18)}。Kuの細胞内での分子挙動は欧州の研究グループが同様の手法で解析を行った¹⁹⁾。こういった研究により、まずDNA損傷がない場合、NHEJ基本因子はいずれも細胞核内で非常に速いスピードで自由に運動していることがFRAP法によって明らかとなった。そしてDSBに安定して結合しているように見えていた基本因子も実際には周囲を自由に運動している分子と常に入れ替わっていて動的な定常状態にあることが明らかとなった。実験データの詳細はそれぞれの発表論文を参照されたい。

3-4. 新しいDSB認識モデル

ライブセルイメージングの結果から、従来信じられていたようなDSB上に基本因子が順序よく組み上がっていくのではないことが明らかになり、新しいモデルが提案された^{20), 21)} (図5)。この新しいモデルでは、まずKuがDSBを認識し、次に基本因子がDSB上に集合するまでの初期段階を経て、その後の動的定常状態に達するとしている。

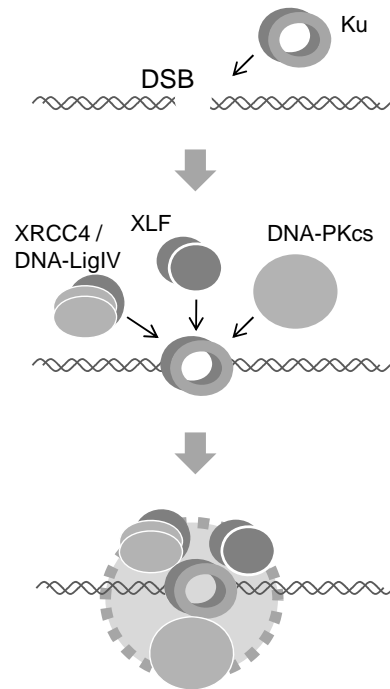


図5 新しいNHEJ基本因子の分子集合モデル

細胞内にDSBが生じると、まずKuが結合する。それ以外の三つの基本因子も数秒以内に損傷部位へ集積を開始する。従来モデルではDSB上のKuに一定の順番で基本因子が結合していくとされていたが、実際の細胞内ではKu以外の三つの基本因子は各々が独立にDSB上のKuに結合する。また、全ての基本因子は生化学的に相互作用できることが報告されているが、生

きた細胞内ではDSB上に集まるにはKuとの相互作用のみが必須で、それ以外の相互作用は必要ない(図5)。

基本因子のDSB上への集積は、DSB誘導後数秒以内に視覚化できるきわめて速い生体応答であり、数分以内に定常状態に達する。この定常状態ではDSB上に集積した全ての基本因子が相互作用し、互いにDSB上での安定性を高めている。一つの因子が欠けていると、他の因子のDSB上での安定性が低下する。例えばDNA-PKcsはXRCC4がDSB上に集まるのには必要ではないが、XRCC4がDSB上に安定にとどまるのに必要である。前述のようにXLFがDSB上に集まるにはKuのみが必須でXRCC4の有無は関係ないが、DSB上に安定にとどまるためにXRCC4が必要となっている。

3-5. 新しいDSB認識モデルが提起する課題

従来モデルと新しいモデルの違いは、単に分子の集まり方や順番が異なるというだけでなく、NHEJ全体の反応について考える上で重要な問題を提起している。従来モデルでは、特定の基本因子がDSBに結合するということは、その基本因子が担う生化学的機能が発揮される、ということでもあった。各因子が順序よく集合していくことで複数の生化学反応が順番に開始され、NHEJ全体の反応が進行していくという考えといえる。しかしながらライブセルイメージングが明らかにしたことは、DSB上に全ての因子がほぼ同時に(数秒以内に)集合を開始し、すばやく定常状態に達する。このことはNHEJ反応は全ての基本因子がDSB上に存在した状態で進行していくことを強く示している。こういった状態で個々の因子が担っている機能がタイミング良く発揮されNHEJ全体の反応が効率よく進行するメカニズムの解明が次の重要な研究課題といえる²⁰⁾。

4. 細胞内における分子集合の基本的なメカニズム

細胞の顕微鏡観察を行うと多様な微細な構造を容易に観察することができるが、こういった構造は様々なタンパク質が特定の部位に集合することで形成される。こういった微細な構造体がどのようにして形成されるかについては二つの様式が存在する。一つは、構造体を形成するタンパク質分子が安定かつ静的な複合体をつくるというもので、その典型的な例が、分子生物学で汎用されるバクテリオファージの*in vitro* packagingで見られる。ファージのタンパク質を適当な量比と濃度でDNAと混和することで、ファージを再構成することが可能である。形成されたファージは一定のサイズを持つ安定な構造を保ち、さらに大腸菌への感染という機能も持つようになる。

もう一つの分子集合の様式は、"self-organization"と呼ばれる動的な過程で、複数のタンパク質間相互作用が一定の平衡状態に達した場合に集合体や構造物として視覚化されるというものであり、複数のタンパク質間相互作用による確率論的現象とされている^{22)~25)}。

この場合、免疫染色などでは特定の部位に分子が集まって安定した構造体を形成しているかのように見えるが、実際の生きた細胞中では、その特定部位上の分子と、周囲を自由に運動している分子が激しく入れ替わるといふ動的平衡状態にある。FRAP解析によって生きた細胞中のタンパク質分子の挙動が観察可能になると、細胞内の微細構造中のタンパク質が、周囲の自由運動しているタンパク質分子と激しく入れ替わっている例が多数報告されてきた。例えば核小体はその内部と周囲の間で核小体タンパク質が定常的かつきわめて速いスピードで分子が入れ替わることで維持されている集合体であるし、微小管はその両端においてチューブリンの重合・脱重合が定常的に起こっていることが構造と機能の双方に重要とされる。さらに、テロメア構造、DNA複製、転写反応、クロマチン構造に関係するタンパク質は、免疫染色では核内の特定部位に観察されるが、それらもFRAP観察を行ってみると特定の部位に安定かつ静的に結合しているのではなく、構成分子が定常的かつダイナミックに入れ替わっており、ある平衡状態に達した時に構造体として視覚化されることが明らかになってきている^{22)~25)}。

ライブセルイメージングから明らかになったNHEJにおけるDSB認識も、この"self-organization"とよく合致しており、細胞内の他の分子集合と同様の基本原理によって生じていると推察される。試験管内でNHEJ基本因子は相互作用可能であるが(図3)、ここで重要なのはKu-XLFの相互作用とKu-DNA-PKcsの相互作用はDNA末端の存在下でしかおこらないということである^{12), 17)}。生きた細胞内では、DSBと結合してコンフォメーションが変化したKuのみが他のNHEJ基本因子と強く相互作用することができ、このことがDSB上での"self-organization"を開始させるきっかけとなっていると考えられる。

前述のように、従来は特定の機能を持った特定の因子が順序よく集合していくことがDSB修復反応全体の進行に重要と考えられてきたが、ライブセルイメージング解析の結果は全てのNHEJ因子がほぼ同時にDSB上に集まり、しかも周囲の自由に運動する分子と激しく入れ替わりながらある種の定常状態を維持していることを強く示している。こういった状態でDNA修復に必要な複数の生化学的反応がいかにして効率的に生じるかが次の重要な研究課題であり、これが解明された際にはDNA修復の分子機構の理解が今まで以上に深まるものと期待される。

謝辞 本稿を執筆するにあたり貴重なご助言をくださいました横谷明德博士に深く感謝いたします。本研究は文部科学省科学研究費ならびに持田記念医学薬学振興財団の援助を受けて実施されました。

参考文献

- 1) T. Helleday, *et al.*, *DNA Repair*, **6**, 923 (2007).
- 2) J. Lippincott-Schwartz, E. Snapp, and A. Kenworthy, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 444 (2001).
- 3) L. Lan, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 13738 (2004).
- 4) C. Lukas, J. Bartek, and J. Lukas, *Chromosoma*, **114**, 146 (2005).
- 5) C. Dinant, *et al.*, *J. Cell Sci.*, **120**, 2731 (2007).
- 6) E. P. Rogakou, *et al.*, *J. Cell Biol.*, **146**, 905 (1999).
- 7) S. Bekker-Jensen, *et al.*, *J. Cell Biol.*, **170**, 201 (2005).
- 8) N. Uematsu, *et al.*, *J Cell Biol*, **177**, 219 (2007).
- 9) B. L. Sprague and J. G. McNally, *Trends Cell Biol.*, **15**, 84 (2005).
- 10) S. Burma, B. P. Chen, and D. J. Chen, *DNA Repair*, **5**, 1042 (2006).
- 11) J. R. Walker, R. A. Corpina, and J. Goldberg, *Nature*, **412**, 607 (2001).
- 12) T. M. Gottlieb and S. P. Jackson, *Cell*, **72**, 131 (1993).
- 13) U. Grawunder, *et al.*, *Nature*, **388**, 492 (1997).
- 14) C. J. Tsai, S. A. Kim, and G. Chu, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **104**, 7851 (2007).
- 15) J. M. Sekiguchi and D. O. Ferguson, *Cell*, **124**, 260 (2006).
- 16) P. Ahnesorg, P. Smith, and S. P. Jackson, *Cell*, **124**, 301 (2006).
- 17) K. Yano, *et al.*, *EMBO Rep.*, **9**, 91 (2008).
- 18) K. Yano and D. J. Chen, *Cell Cycle*, **7**, 1321 (2008).
- 19) P. O. Mari, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103**, 18597 (2006).
- 20) K. Yano, *et al.*, *J. Radiat. Res.*, **50**, 97 (2009).
- 21) K. Yano, K. Morotomi-Yano, and H. Akiyama, *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**, 1237 (2009).
- 22) T. Misteli, *J. Cell Biol.*, **155**, 181 (2001).
- 23) T. Misteli, *Nature*, **456**, 333 (2008).
- 24) T. Misteli, *Cell*, **128**, 787 (2007).
- 25) E. Karsenti, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **9**, 255 (2008).