

DNA 二重鎖切断に対する 53BP1 (がん抑制タンパク質 p53 結合タンパク質 1) の役割

金沢医科大学 大学生化学第一講座

岩淵 邦芳

1 G1 チェックポイントにおける p53 活性化機構

哺乳類の細胞は発生の過程で、あるいは成体になった後もいくつかの組織で絶えず分裂を繰り返している。細胞分裂で最も重要なことは遺伝情報を正確に分裂後の細胞に伝えること、すなわち DNA を正確に複製し、複製された DNA を正確に2つの細胞に分配することである。しかし、DNA は紫外線などの外的要因あるいは細胞の代謝の過程で生ずる反応性の高い中間産物(例えば活性酸素)などの内的要因により絶えず損傷を受けていると考えられる。細胞はこれらの損傷を修復する機構を備えているが、修復にあたっては2つのステップをとる。すなわち、①損傷を認識し、一時的に細胞分裂の周期を停止するステップ、②細胞周期停止の間に実際に損傷を修復するステップ、である。①②いずれのステップにも複数のタンパク質が協調して働いている。特にステップ①の損傷認識から細胞周期停止へのシグナル伝達機構は「チェックポイント」と呼ばれている。チェックポイントあるいは修復に関わるタンパク質に異常が生じると、損傷を持った DNA が分裂後の細胞に伝達される可能性があり、それが繰り返されると細胞のがん化につながると考えられている。実際、毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia telangiectasia, 以下 AT) という遺伝性疾患では、ATM と呼ばれるチェックポイントに関与するリン酸化酵素に異常があるため、チェックポイント異常をきたし若年で高頻度に悪性腫瘍を発生する。いくつかあるチェックポイントの中で、DNA に二重鎖切断が生じたときに細胞周期を G1 期に停止させるチェックポイント (G1 チェックポイント) は研究が進んでいる。その中で中心的な役割を果たしているのががん抑制蛋白 p53 である。DNA 二重鎖切断が生じると、先に述べた ATM を含めたいくつかのリン酸化酵素が活性化され p53 をリン酸化する。リン酸化された p53 は速やかに蛋白量が増加し、転写因子として活性型となり G1 期停止や

DNA 損傷修復、アポトーシスに関わる遺伝子の転写を促進する。しかし、現在のところ DNA 二重鎖切断を認識する、いわゆるセンサータンパク質は何なのか、またセンサータンパク質がどのようにして ATM を活性化するかについては不明な点が多い。

2 53BP1 の構造

私は数年前に p53 に結合するタンパク質 53BP1 を見出した。53BP1 は 1972 残基からなる大きなタンパク質である。C 末約 270 残基は乳がん抑制タンパク質 BRCA1 あるいは酵母の RAD9 の C 末と相同性があり、この部分は BRCT ドメインと呼ばれている。BRCT ドメインは BRCA1, RAD9 のみならずチェックポイントや DNA 損傷修復に関わるタンパク質に広く見出されている。そこで 53BP1 もチェックポイントまたは DNA 損傷修復に関与しているのではと考え、以下の実験を試みた。

3 X線照射 (DNA 障害) による 53BP1 の核内局在変化 (図 1)

53BP1 に対する単クローン抗体を用いて 53BP1 の細胞内局在を調べたところ、53BP1 は核内に広く分布する核タンパク質であることが分かった (図 1.A)。ところが細胞に X 線照射を施し DNA 二重鎖切断という DNA 損傷を与えると、53BP1 は遅くとも 15 分以内に核内に点状に集合した (図 1.B)。DNA に異なったタイプの損傷を与える紫外線 (UV) (図 1.C) や DNA 複製を止めるヒドロキシウレア (HU) (図 1.D) 処理ではこのような局在の変化が見られないことから、この現象は DNA 二重鎖切断の発生に特異的な 53BP1 の反応であることがわかった。

4 X線照射 (DNA 障害) による 53BP1 と DNA の結合 (図 2)

細胞を界面活性剤 (0.5 % NP40) で溶解すると

53BP1は主に可溶性分画(図2のLysate)に検出される(図2上, レーン1と6)。ところが細胞へのX線照射により可溶性分画の53BP1は激減し, かわりに不溶性分画(図2のPellet)の53BP1が増加することがわかった(図2上, レーン2と7)。DNA二重鎖切断により53BP1が点状に局在を変えることを考えると, 不溶性分画内で53BP1がDNAに結合している可能性が示唆された。そこでX線照射後の細胞を溶解する際にDNA分解酵素を加えておくと, 予想通り53BP1は不溶性分画から可溶性分画へ移行した(図2上, レーン3と8)。このことから53BP1はDNA二重鎖切断が生じるとDNAに結合することがわかった。この様な可溶性分画から不溶性分画への著明なシフトは, 同じようにDNA損傷に反応して核内で点状に位置を変えるBRCA1には見られなかった(図2下)。

5 53BP1のDNA二重鎖切断に対する作用

上記に示した53BP1の変化はDNA二重鎖切断に特異的であることから, 53BP1はATMを介したチェックポイント, またはDNA二重鎖切断の修復, あるいはその両方に関与している可能性が考えられる。さらに①点状の核内局在の変化が非常に速やかに, しかもATMに変異のあるATの患者さんの細胞でも認められること(データ示さず), ②80%を超える53BP1が, DNA二重鎖切断発生後DNAに結合することなどから, 53BP1が直接DNA二重鎖切断の断片に結合しセンサー蛋白として, あるいは修復蛋白として機能している可能性が十分あると考えている。53BP1の機能解析はDNA二重鎖切断の認識及び修復機構の解明に役立つものと考えられる。

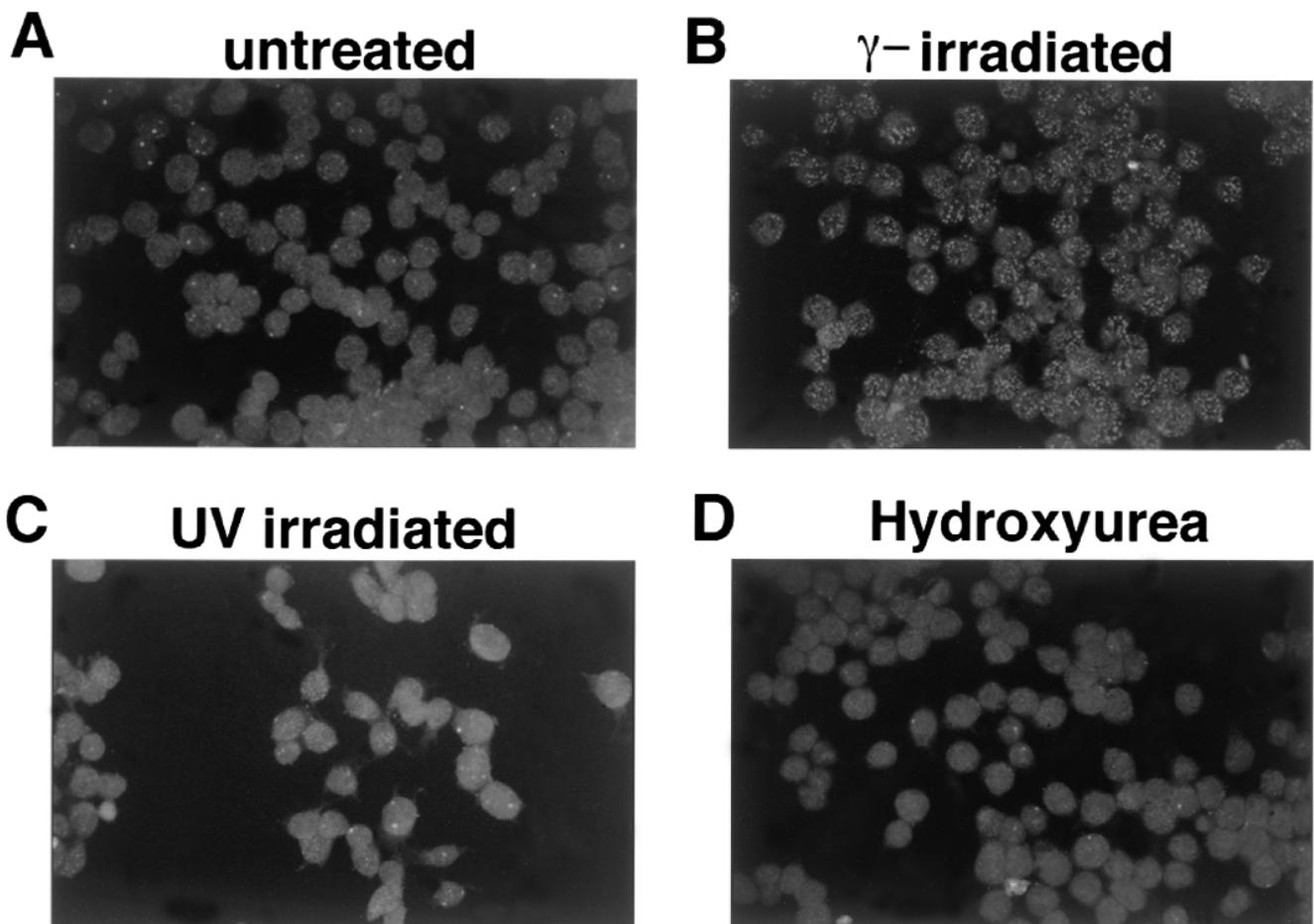


図1

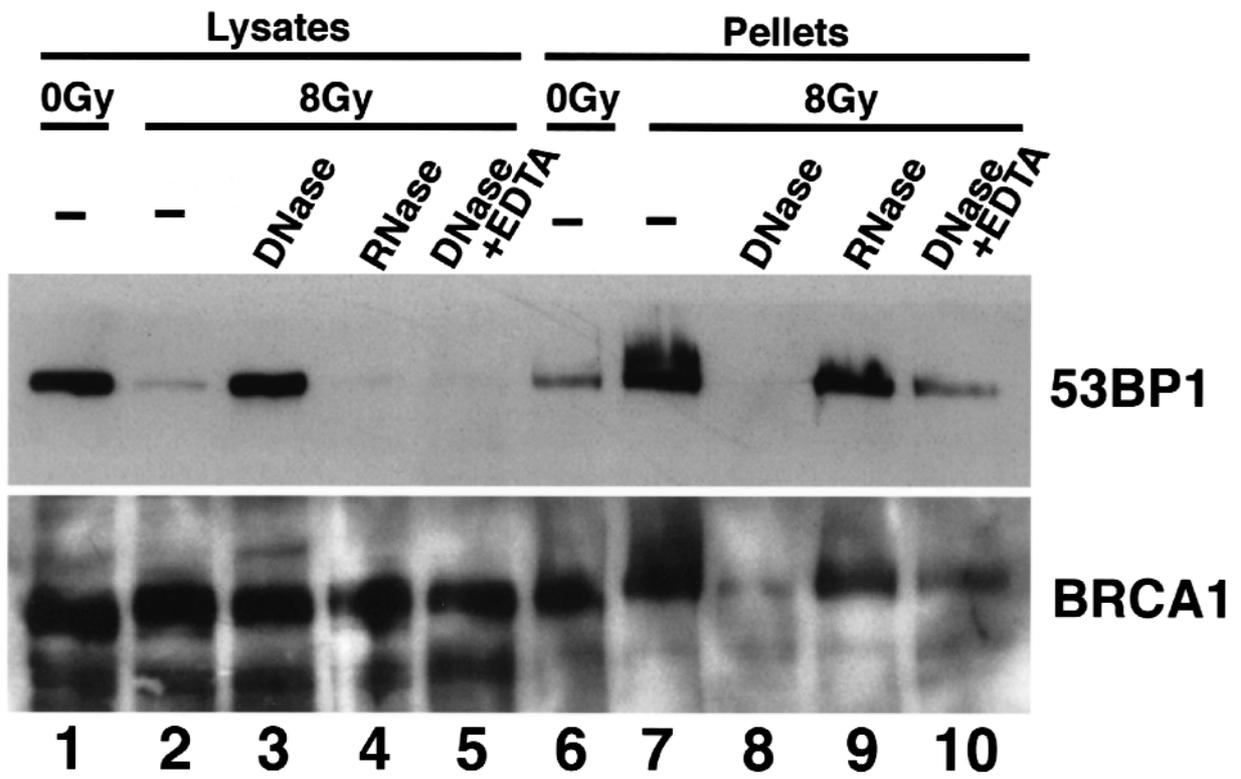


図2