

【施設利用者の研究紹介】

DNA にトラップされたトポイソメラーゼ 2 の除去機構

統合生命科学研究科遺伝子化学研究室 津田 雅貴、井出 博

トポイソメラーゼ 2 (Top2) は、DNA の複製時に生じる DNA のもつれを解消する酵素である。反応中間体として、DNA の 5'切断端と Top2 活性部位のチロシン残基が共有結合した複合体 (Top2 covalent complex: Top2cc) を形成する。抗がん剤であるエトポシド (ETP) は Top2cc を安定化し、Top2 を DNA 切断末端にトラップすることにより細胞死を引き起こす。Top2cc は、プロテアソームで分解された後、Top2 と DNA の間のホスホジエステル結合が Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (Tdp2) によって加水分解され DNA から除去されると考えられている。実際、Tdp2 タンパク質は、DNA5'端に結合したチロシン残基を除去する (図 1)。しかし、細胞内において、Top2 とプロテアソームの機能的な関係性はわかっていない。

ヒトリンパ芽球細胞 (TK6) を ETP で処理後、ETP を除いた培地で培養し、細胞からゲノム DNA を精製した。DNA に結合したタンパク質は、ウェスタンブロットで検出した。Top2 は、本来の分子量より高分子側にスメアしたバンドとして見られた。このスメアバンドは、ポリユビキチン抗体でも検出された。この結果から、Top2cc はポリユビキチン化されることが分かった。次に、野生型および Tdp2 遺伝子破壊 TK6 細胞の Top2cc 除去動態をプロテアソーム 阻害剤の有無で比較した。その結果、Top2cc はプロテアソーム依存的または非依存的な経路で修復されることが分かった。さらに、両経路は Tdp2 依存的経路と非依存的経路に分かれていることが分かった。また、ETP 処理した細胞から抽出したゲノム DNA を用いて、Tdp2 がタンパク分解なしに Top2cc を除去することを生化学的に示した。本研究から、Top2cc 修復において、新規なプロテアソーム非依存的機構が存在することが明らかになった。

(参考論文)

・ Tsuda M, Kitamasu K, Hosokawa S, Nakano T, Ide H. Repair of trapped topoisomerase II covalent cleavage complexes: Novel proteasome-independent mechanisms. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids*. 139(1-3):170-184 (2020)

・ Tsuda M, Kitamasu K, Kumagai C, Sugiyama K, Nakano T, Ide H. Tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2 (TDP2) repairs topoisomerase 1 DNA-protein crosslinks and 3'-blocking lesions in the absence of tyrosyl-DNA phosphodiesterase 1 (TDP1). *DNA Repair*. in press (2020)

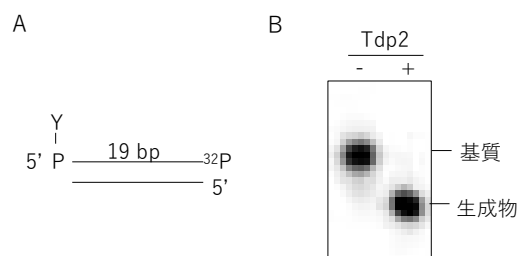


図 1: 放射性標識した DNA を用いた実験

(A) 5' にチロシン残基 (Y) を結合させたオリゴの 3' 端を ^{32}P で放射性標識し、相補鎖とハイブリダイズさせた二本鎖 DNA 基質を調整した。この DNA と Tdp2 タンパク質を 37°C でインキュベートし、生成物を変性アクリルアミドゲルで電気泳動した。FLA9500 で反応生成物を検出した。

(B) 反応生成物の電気泳動像