

## DNAリン酸化脱リン酸化酵素PNKPと 神経発生におけるゲノム安定性維持機構

島田 幹男

### 1. はじめに

染色体ゲノムDNAは放射線や紫外線による外部刺激の他、細胞内代謝により発生した酸化ストレスによっても絶えず損傷を受けている。ゲノムDNAは生命構造の設計図であるため、その損傷は細胞死や突然変異の蓄積につながる。そこで生物はゲノムの恒常性の維持のためにDNA修復機構という高度な防御機構を進化発達させてきた。これらDNA修復の重要性は2015年にTomas Lindahl博士（塩基除去修復）、Paul Modrich博士（ミスマッチ修復）、Aziz Sancar博士（ヌクレオチド除去修復）の3氏がノーベル化学賞を受賞してあらためて証明された。

生物の発生過程においてミトコンドリアから生じる活性酸素などの代謝産物は反応性に富んでおり、DNA鎖や塩基と化学反応を起こし損傷の原因となる。たとえば塩基損傷は1日に細胞あたり数万個程度発生すると試算されており、これらの損傷がそのまま放置されると細胞死や突然変異の原因となる。DNA損傷は塩基損傷の他、DNA架橋、DNA一本鎖切断、DNA二本鎖切断と多岐にわたり、その損傷の種類によって異なる修復機構が存在する。またDNA修復機構は大腸菌からヒトまで高度に保存されており、これらの修復遺伝子を欠損した遺伝病患者は発生異常や、高発がん性といった重篤な症状を示すことが多く、いかにゲノムの安定性が生物の恒常性に必須であるかを物語っている。

### 2. DNA修復機構と神経発生疾患

DNA修復欠損遺伝病患者はDNA修復の分子メカニズムとの関係性から高発がん性、発育遅滞、免疫不全などを呈

するが、特筆すべき点は神経発生異常を示す症例が多いことである（表1参照）。DNA修復能欠損の結果生じたDNA損傷が原因で細胞死に至り、十分な量の神経細胞が確保できなくなるため発生異常を呈することは予想できる。しかし、なぜ神経系に特異的なのかという疑問はいまだ不明な点が多い。ここではDNA修復の種類とそれが原因で生じる脳神経発生異常について紹介する。

#### 1) DNA一本鎖切断修復、塩基除去修復

DNA一本鎖切断修復、塩基除去修復ではPNKP, XRCC1, Ligase III, APE1, TDP1, APTXが重要な働きをする。図1のようにこの修復経路は塩基損傷や一本鎖切断などの小さい規模のDNA損傷が生じた際にその部位を除去する経路である。XRCC1は足場タンパク質として機能し、他のタンパク質の損傷部位へのリクルートに必要である。脳神経系でXRCC1を欠損したコンディショナルノックアウトマウスは脳のサイズが小さくなることに加え、インターニューロンの数も減少する<sup>1)</sup>。また、Ligase IIIは脳発生においてミトコンドリアのDNA修復にも必要であることが報告されている<sup>2)</sup>。APE1は塩基除去の際に生じるAPサイトの除去に必要であり、脳で欠損すると小脳が萎縮する（未発表データ）。TDP1の機能は修復の際にDNAのねじれを解消するトポイソメラーゼを修復後に除去することであり、脊髄脳失調症（SCAN1）の原因となる<sup>3)</sup>。また、APTXはDNA一本鎖切断修復の際にDNA末端のプロセッシングに必要であり、眼球運動失行症（AOA1）の原因となる。PNKPに関しては後述する。

#### 2) ヌクレオチド除去修復

ヌクレオチド除去修復は紫外線照射により生じるピリミジン二量体（塩基どうしの結合）を除去する修復経路であり、XP遺伝子群とCS遺伝子群が重要な役割を果たす。XP遺伝子群は色素性乾皮症（xeroderma pigmentosum：XP）の原因遺伝子で臨床症状として小頭症、神経変性疾患を呈する。また、CS遺伝子群はコケイン症候群（Cockayne syndrome：CS）の原因遺伝子で臨床症状として小頭症および髄鞘形成不全を呈する。XP, CS遺伝子群は紫外線によるDNA損傷の修復に関与するためこれらの遺伝子に欠損を持つ患者は紫外線に対して高感受性である。CSは特に

東京工業大学科学技術創成研究院先端原子力研究所（〒152-8550 東京都目黒区大岡山2-12-1 N1-30）

The role of PNKP in maintenance of genome stability and neural development

Mikio Shimada (Laboratory for Advanced Nuclear Energy (LANE), Institute of Innovative Research, Tokyo Institute of Technology, 2-12-1 N1-30, Ookayama, Meguro-ku, Tokyo)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2016.880484

© 2016 公益社団法人日本生化学会

表1 DNA修復欠損遺伝病と原因遺伝子および臨床症状

関連修復機構	疾患名	原因遺伝子	神経疾患症状	その他の臨床症状
DNA一本鎖切断修復	小頭症, およびてんかん (MCSZ)	<i>PNKP</i>	小頭症	てんかん
	脊髄脳失調症 (SCAN1)	<i>TDP1</i>	運動失調症, 神経変性疾患	高コレステロール血症, 低アルブミン血症
	眼球運動失行症 (AOA1)	<i>APTX</i>	運動失調症, 神経変性疾患	高コレステロール血症, 低アルブミン血症
ヌクレオチド除去修復	色素性乾皮症 (XP) コケイン症候群 (CS)	<i>XP</i> 遺伝子群 <i>CS</i> 遺伝子群	小頭症及, 神経変性疾患 小頭症及, 髄鞘形成不全	皮膚がん 早老症
DNA二本鎖切断修復	毛細血管拡張性運動失調症 (AT)	<i>ATM</i>	運動失調症, 神経変性疾患	免疫不全, 発がん性, 不妊
	AT様疾患 (ATLD)	<i>MRE11</i>	運動失調症, 神経変性疾患	軽微の免疫不全
	ナイミーヘン症候群 (NBS)	<i>NBS1</i>	小頭症	免疫不全, 発がん性
	セッケル症候群	<i>ATR</i>	小頭症	発育遅滞
	Ligase IV 症候群	<i>Ligase IV</i>	小頭症	免疫不全, 発育遅滞
DNA架橋修復	ファンconi貧血 (FA)	<i>FA</i> 遺伝子群	小頭症	再生不良性貧血

転写と共役したヌクレオチド除去修復に関与する。

### 3) DNA二本鎖切断修復

放射線のような高いエネルギーを浴びるとDNAは二本鎖切断を生じる。これを修復する経路は相同組換え修復と非相同末端結合修復に大別される。DNA二本鎖切断修復ではATM, ATR, DNA-PKcsという三つのリン酸化酵素が主要な役割を担う。これらは相同組換え修復, 複製阻害ストレス, 非相同末端結合修復経路にそれぞれ関与する。*ATM*は毛細血管拡張性運動失調症の原因遺伝子で小脳の発生に異常がみられる疾患である。*ATR*はセッケル症候群の原因遺伝子で小頭症, 鳥様顔貌を呈する<sup>4)</sup>。さらにDNA-PKcsの変異は小頭症の原因になることが最近の報告により明らかになった<sup>5)</sup>。また, ナイミーヘン症候群の原因遺伝子産物NBS1とAT様疾患の原因遺伝子産物MRE11は複合体を形成しており, 同じ修復経路に関与するが患者の臨床症状はそれぞれ小頭症と神経変性疾患であり, 表現型が異なる点も興味深い。これに関してはアポトーシスの作用機序の差が関与していることが報告されている<sup>6)</sup>。乳がんの原因遺伝子である*BRCA1*および*BRCA2*を脳神経で欠損させたコンディショナルノックアウトマウスも小頭症を呈することが報告されている<sup>7,8)</sup>。これらの遺伝子産物も相同組換え修復経路に関与する。さらにDNA架橋の修復経路に関わるファンconi貧血 (FA) 遺伝子群を欠損すると小頭症を呈する報告もある。

### 4) その他

またこれまでの研究からDNA修復遺伝子は細胞内小器

官である中心体の複製にも関与していることが明らかになっており, 中心体の機能異常が神経発生期の細胞移動などに影響を及ぼしている可能性も考えられる<sup>9)</sup>。また, アルツハイマー病患者では神経細胞にDNA損傷が蓄積することが知られていることから, 発生期以外にもDNA損傷と神経疾患との関わりは深い。

## 3. リン酸化脱リン酸化酵素PNKPと神経発生との関わり

### 1) PNKPとは

PNKPはDNAを基質とするリン酸化および脱リン酸化酵素である (図2)。これまでの報告からDNA切断が生じた際にDNAの5'末端をリン酸化, 3'末端を脱リン酸化することにより, その後のDNAポリメラーゼによるDNA合成とDNAリガーゼによる結合を促進する役割を担う<sup>10)</sup>。PNKPはその活性の特異性からDNA一本鎖切断と, DNA二本鎖切断 (非相同末端結合修復) の両方の修復に必要である。また, ATMやDNA-PKcsによるPNKPのリン酸化がDNA修復の活性に必要であることも報告されている<sup>11,12)</sup>。さらに, *PNKP*は小頭症およびてんかん発作を呈する遺伝病 (microcephaly and seizure) MCSZの原因遺伝子であることが近年報告された<sup>13)</sup>。

### 2) PNKP欠損コンディショナルノックアウトマウスの作製

MCSZの患者由来細胞はコメットアッセイ法 (1細胞ごとの核内のDNA損傷を電気泳動で検出する方法) を用い

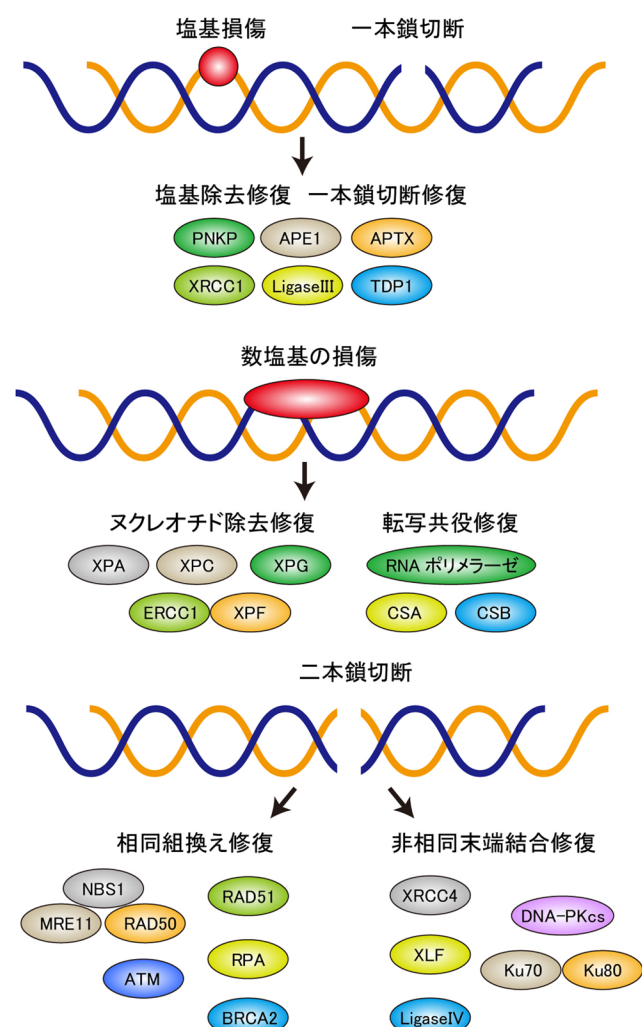


図1 塩基除去修復，一本鎖切断修復，ヌクレオチド除去修復，相同組換え修復，非同末端結合修復のそれぞれの経路に関与するタンパク質群

たDNA修復能の解析により，放射線や化学薬剤のようなDNA損傷誘発処理に対して高い感受性を示すことが報告されていたが，MCSZ患者特有の小頭症の発生機序は不明であった．我々は神経発生時におけるPNKPの役割を解析するためにトランスジェニックマウスを作製した．まずMCSZの患者と同じ部位に変異を入れたMCSZ変異マウスの作製を試みたところ，胎生致死であった．ヒトのMCSZ患者は重篤な症状ではあるが産まれてくるためにマウスでの胎生致死は意外ではあるが，この結果はPNKPがいかに重要な因子であることを示唆している．次に，Cre/LoxPシステムを用いてPNKPのコンディショナルノックアウトマウスを作製した．このマウスにNestinプロモーター（Nestinは脳神経系で特異的に発現する）を持つCreリコンビナーゼ発現マウスを掛け合わせるにより脳神経系特異的にPNKPを欠損した*Pnkp*<sup>Nes-Cre</sup>マウスを得ることができた<sup>14)</sup>．

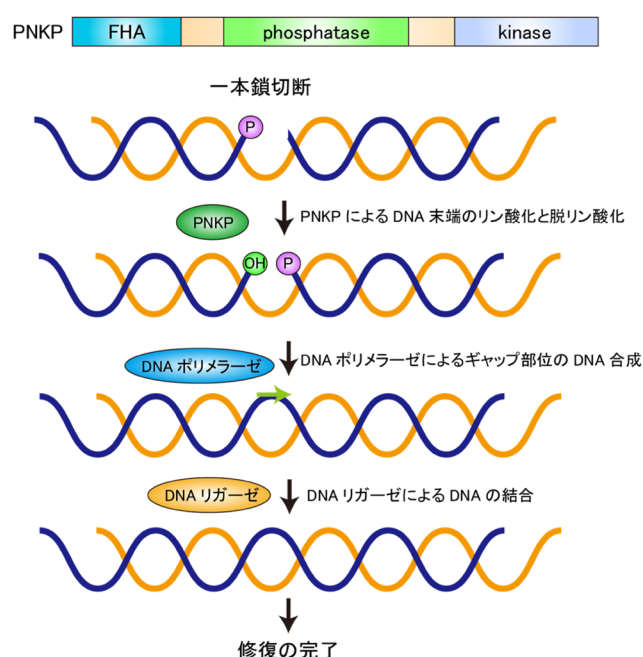


図2 PNKPの構造と一本鎖切断修復におけるPNKPの役割  
PNKPはDNAの5'末端をリン酸化し，3'末端を脱リン酸化する．

### 3) PNKPと神経発生

*Pnkp*<sup>Nes-Cre</sup>マウスは産まれてはくるものの，すべてのマウスが5日程度で死亡し大脳皮質より出血がみられるのが特徴的であった．*Pnkp*<sup>Nes-Cre</sup>マウスの胎生14齢の大脳皮質を免疫染色により観察したところ増殖が盛んな細胞特異的に大量のDNA損傷（リン酸化H2AX抗体をマーカーとして使用）が観察され，またアポトーシス（TUNELアッセイ）陽性細胞が多くみられた．生後2日の小脳でPax2をマーカーとしてインターニューロンを観察した結果，野生型マウスと比較して90%近くのインターニューロンが減少していた．以上の結果はPNKPが胎児期の脳神経細胞のゲノムの安定性に必須であることを示唆している．

次に生後の大脳皮質の成長にPNKPが関与するかを調べるためにタモキシフェン添加でアクチンプロモーター依存的にCreリコンビナーゼを誘導できるシステムを用いた．その結果，海馬や皮質部位でPNKPを欠損するとリン酸化H2AXのフォーカスやアポトーシスの陽性シグナルが観察された．また，オリゴデンドロサイトのマーカーであるMBPやOlig2のシグナルが減少していた．これらからPNKPは生後も神経系の恒常性維持に必須であることが明らかになった．

### 4) PNKPとDNA修復機構

PNKPのDNA修復における機能を解析するために*Pnkp*<sup>Nes-Cre</sup>マウス脳からアストロサイトを樹立してコメットアッセイ法およびリン酸化H2AX，Rad51抗体を用いた免



疫染色法によってDNA修復能を解析した。ニュートラル（中性）コメットアッセイはDNA二本鎖切断のみを検出し、アルカリコメットアッセイはDNA一本鎖切断と二本鎖切断の両方を検出する実験法である。コメットアッセイを用いた実験では放射線およびプレオマイシン処理し30分、60分と経時的にサンプルを回収後、野生型ではDNA損傷が修復されていたのに対し、PNKP欠損細胞ではDNA損傷が残存したままであった。

免疫染色法を用いた実験でRad51は二本鎖切断修復のうち相同組換え修復の重要な因子であり、DNA二本鎖切断が生じたあと、相同組換え修復が促進しないとRad51のフォーカスが残存したままになる。しかし、PNKPの欠損細胞ではRad51のフォーカスが残存しなかったことから相同組換え修復に異常はなく、非相同末端結合修復に主に関与することが示唆された。

#### 4. おわりに

ゲノム安定性維持機構は多くの遺伝性疾患の原因となりうるが直接的に発生時期におけるDNA修復系の関与を示す報告は少ない。培養細胞の系を用いたDNA修復の分子メカニズムは多くの報告がなされているが、神経系など臓器特異的な関与との報告となると極端に少なくなるのはその解析の難しさにあると思われる。しかし、iPS細胞研究や光遺伝学（オプトジェネティクス）など新しい技術の開発がめざましい昨今、それらの技術を用いた遺伝病疾患の原因解明に大きな躍進が期待される。

#### 謝辞

本研究成果は米国セントジュード小児研究病院遺伝学部門Peter McKinnon研究室で行われたものです。Peter McKinnon博士をはじめ研究室のメンバーにはいつも励まされ助けられました。ここに深く感謝いたします。また、本研究は上原記念生命科学財団の留学リサーチフェローシップ

の支援を受け行われました。ここに感謝いたします。

#### 文 献

- 1) Lee, Y., Katyal, S., Li, Y., El-Khamisy, S.F., Russell, H.R., Caldecott, K.W., & McKinnon, P.J. (2009) *Nat. Neurosci.*, **12**, 973–980.
- 2) Gao, Y., Katyal, S., Lee, Y., Zhao, J., Rehg, J.E., Russell, H.R., & McKinnon, P.J. (2011) *Nature*, **471**, 240–244.
- 3) Katyal, S., Lee, Y., Nitiss, K.C., Downing, S.M., Li, Y., Shimada, M., Zhao, J., Russell, H.R., Petrini, J.H., Nitiss, J.L., & McKinnon, P.J. (2014) *Nat. Neurosci.*, **17**, 813–821.
- 4) O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V.L., Woods, C.G., Jeggo, P.A., & Goodship, J.A. (2003) *Nat. Genet.*, **33**, 497–501.
- 5) Woodbine, L., Neal, J.A., Sasi, N.K., Shimada, M., Deem, K., Coleman, H., Dobyns, W.B., Ogi, T., Meek, K., Davies, E.G., & Jeggo, P.A. (2013) *J. Clin. Invest.*, **123**, 2969–2980.
- 6) Shull, E.R., Lee, Y., Nakane, H., Stracker, T.H., Zhao, J., Russell, H.R., Petrini, J.H., & McKinnon, P.J. (2009) *Genes Dev.*, **23**, 171–180.
- 7) Pulvers, J.N. & Huttner, W.B. (2009) *Development*, **136**, 1859–1868.
- 8) Frappart, P.O., Lee, Y., Lamont, J., & McKinnon, P.J. (2007) *EMBO J.*, **26**, 2732–2742.
- 9) Shimada, M. & Komatsu, K. (2009) *J. Radiat. Res. (Tokyo)*, **50**, 295–301.
- 10) Chappell, C., Hanakahi, L.A., Karimi-Busheri, F., Weinfeld, M., & West, S.C. (2002) *EMBO J.*, **21**, 2827–2832.
- 11) Segal-Raz, H., Mass, G., Baranes-Bachar, K., Lerenthal, Y., Wang, S.Y., Chung, Y.M., Ziv-Lehrman, S., Ström, C.E., Helleday, T., Hu, M.C., Chen, D.J., & Shiloh, Y. (2011) *EMBO Rep.*, **12**, 713–719.
- 12) Zolner, A.E., Abdou, I., Ye, R., Mani, R.S., Fanta, M., Yu, Y., Douglas, P., Tahbaz, N., Fang, S., Dobbs, T., Wang, C., Morrice, N., Hendzel, M.J., Weinfeld, M., & Lees-Miller, S.P. (2011) *Nucleic Acids Res.*, **39**, 9224–9237.
- 13) Shen, J., Gilmore, E.C., Marshall, C.A., Haddadin, M., Reynolds, J.J., Eyaid, W., Bodell, A., Barry, B., Gleason, D., Allen, K., Ganesh, V.S., Chang, B.S., Grix, A., Hill, R.S., Topcu, M., Caldecott, K.W., Barkovich, A.J., & Walsh, C.A. (2010) *Nat. Genet.*, **42**, 245–249.
- 14) Shimada, M., Dumitrache, L.C., Russell, H.R., & McKinnon, P.J. (2015) *EMBO J.*, **34**, 2465–2480.

#### 著者寸描

##### ●島田 幹男（しまだ みきお）



東京工業大学科学技術創成研究院先端分子力研究所助教。

■略歴 徳島県生まれ。2004年帯広畜産大学畜産学部卒。09年京都大学大学院人間・環境学研究科修了、博士（人間・環境学）。同年京都大学放射線生物研究センター研究員。11年米国セントジュード小児研究病院研究員を経て15年から現職。

■研究テーマと抱負 放射線高感受性遺伝病と神経発生異常疾患。ゲノム安定性維持機構が生物の発生に与える影響を解明し

ていきたい。

■ウェブサイト <http://www.nr.titech.ac.jp/jp/member/data/mshimada.html>

■趣味 トレイルランニング、映画鑑賞。