

平成19年3月

# 富松 望 学位論文審査要旨

主 査 箸 本 英 吉  
副主査 佐 藤 建 三  
同 汐 田 剛 史

## 主論文

Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks

(DNA二本鎖切断応答時にKu70/80がATMとATRのシグナル伝達経路を制御する)

(著者：富松望、Candice G. T. Tahimic、大槻明広、Sandeep Burma、福原暁子、  
佐藤建三、汐田剛史、押村光雄、David J. Chen、栗政明弘)

平成19年5月 Journal of Biological Chemistry 282巻 掲載予定

# 学 位 論 文 要 旨

## **Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks**

### **(DNA二本鎖切断応答時にKu70/80がATMとATRのシグナル伝達経路を制御する)**

最も危険で細胞の生死に重大な影響を与えるDNA損傷として、DNA二本鎖切断がある。細胞内ではDNAの断端が認識され、損傷のシグナルが伝達され、細胞周期がチェックポイントにおいて停止し、断端の修復が行われる。この損傷応答反応においてATM (Ataxia-telangiectasia mutated) はDNA断端付近で活性化され、直接的にあるいはATR (ATM- and Rad3-related) を介して、その基質であるp53などをリン酸化することで損傷応答時におこるシグナル伝達を制御している。一方、DSB損傷断端にはKu70/80二量体 (Ku) が結合し、これがDNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase) を誘導し、非相同末端結合修復を導く。

これまで、このATMとATRを主とするシグナル伝達とKu結合を介した非相同末端結合経路との関わりは明らかにされていない。今回、Ku欠損型細胞株を用いて、KuがATMの活性にどのような影響を与えるかを検討した。

### **方 法**

野生型細胞とKu欠損型細胞株に放射線を照射して、一定時間後のp53ser18のリン酸化を検討した。次に、そのp53リン酸化がどのキナーゼに起因するかを、ATMとATRのsiRNAを用いて、そのタンパク質発現量とp53のリン酸化の変化を検討した。さらにATMやATRのキナーゼ阻害剤を用いて、その際に起こるp53のリン酸化の変化を検討した。

また、ATM非依存性ATRの活性化が起こっているかどうかを検討するために、Cre-LoxPシステムを利用したATM欠損/Ku70コンディショナル(flox)型マウスを作製した。このマウスから細胞を樹立し、Cre組換え酵素を発現するアデノウイルスを感染させ、ATM/Ku70二重欠損型細胞株を樹立した。これらの細胞においてp53のリン酸化を同様に、siRNAとキナーゼ阻害剤を用いて検討した。

### **結 果**

野生型細胞では、p53のリン酸化は放射線照射後2時間をピークに終息したが、Ku欠損型細胞株では終息することなく放射線照射後16時間まで続いた。すなわち、Kuが欠失するとp53のリン酸化が遅延化することが明らかになった。このリン酸化を行うキナーゼを特定するため、siRNAによるノックダウン実験を行った結果、野生型細胞において放射線照射後2時間では、ATMとATR各々のタンパク質発現量の減少に伴いp53のリン酸化も減少した。Ku

欠損型細胞株において、放射線後2時間ではATMの発現を抑制したときのみp53リン酸化が減少した。放射線照射後12時間では、ATM、ATR各々の発現を減少させるとp53リン酸化が減少した。また、それぞれの細胞株にキナーゼ阻害剤を処理してATMやATRのキナーゼ活性を抑制したところ、siRNA実験の結果と同様の結果が得られた。すなわち、野生型細胞株と異なりKu欠損型細胞株ではキナーゼの活性化機構に違いがあることが示唆された。

新たに樹立した細胞を用いてp53のリン酸化を検討した結果、ATM単独欠損型細胞株ではp53のリン酸化がみられなかったが、ATM/Ku70二重欠損型細胞株ではp53のリン酸化が再びみられるようになった。このリン酸化はATM非依存的に起こったものと考えられた。さらにATRのsiRNAにより、ATRの発現量を減少させたところ、ATRの消失に伴いp53のリン酸化も減少した。ATRキナーゼ阻害剤を用いた検討でも同様の結果が得られた。すなわちKuが欠損することによりATM非依存性ATRが活性化していることが明らかになった。

## 考 察

一般的に、野生型細胞株において放射線照射後は主にATMが働き、ATRは紫外線照射によって引き起こされる損傷により活性化されると考えられている。また近年、放射線照射後にはATM依存性ATR活性化が存在することも明らかとなってきた。今回の研究では、野生型細胞株の放射線照射後2時間において、ATM依存性ATRが活性化していること、またこのATM依存性ATR活性がKu欠損型細胞株の放射線照射後2時間では起こっていないことから、ATM依存性ATRが活性化するためにはKuが必要であることを明らかにした。KuがDNA損傷断端に結合することでATMからATRへとシグナルが伝達されている可能性が考えられた。

Ku欠損型細胞株の放射線照射12時間後の遅延したp53のリン酸化にはATM、ATR共に働いていることがわかった。ATM/Ku70二重欠損型細胞株で認められるp53のリン酸化はATM非依存性ATRによって引き起こされていることが示唆された。以上より、Ku欠損型細胞株での遅延したp53のリン酸化には、(1)ATMとATM依存性ATRとATM非依存性ATRが活性化している、あるいは(2)ATMとATM非依存性ATRが活性化している、この2つのモデルが考えられた。

## 結 論

今回、KuがDNA二本鎖切断応答の早期段階におけるATM依存性ATRの活性化に関与していることを見出した。Ku欠損型細胞株では、ATM非依存性ATR活性が存在することも明らかにした。これらはKuとATM、ATRが密接に関与していることを示唆している。