

【トピックス】

Sirt1によるAPエンドヌクレアーゼ1脱アセチル化はDNA塩基除去修復活性を調節する

山盛 徹<sup>1</sup>、Kaikobad Irani<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室

<sup>2</sup>Cardiovascular Institute, University of Pittsburgh Medical Center

1. はじめに

酵母や線虫において、Sirtuinファミリータンパク質が個体の寿命を調節することが明らかにされて以来、本ファミリータンパク質に対する注目が集まっている。Sirtuinファミリータンパク質は基本的にNAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素であり、タンパク質中のアセチル化リジン残基からアセチル基を外すことがその主たる酵素活性である[1, 2]。哺乳類においては、Sirt1~7と名付けられた7種類のSirtuinタンパク質が存在する。これら哺乳類Sirtuinは局在や基質となるタンパク質が異なることにより、それぞれ異なった生物学的機能を示す。現在のところ、酵母のSirtuinであるSir2にもっとも近縁な哺乳類オルソログであるSirt1について特に活発な研究が行われており、多くの知見が蓄積されてきている。その結果、Sirt1は細胞分化、エネルギー代謝、アポトーシス、ストレス抵抗性などのさまざまな局面で重要な役割を果たしていることが明らかとなり、DNA損傷修復もその一つであることが現在示唆されている[1-4]。

DNAは放射線、紫外線、化学物質、活性酸素等による侵襲に常に曝されている。これらの侵襲により生じたDNA損傷は、DNA修復機構により修復されることで遺伝子突然変異から免れている。突然変異の蓄積は細胞のがん化をもたらすため、DNA修復能の維持は生体にとって非常に重要であるが、加齢によりDNA修復能が低下することが報告されている[5]。また、現在までに知られている遺伝性早老症の原因遺伝子として、DNA損傷修復に関わるWRN、ATM、CSA/B等が同定されており、DNA損傷修復と老化・寿命調節との強い関連性が示唆されている。さまざまな種類のDNA損傷のうち、塩基の酸化やアルキル化により生じる塩基損傷は最も高頻度に生じるDNA損傷であり、塩基除去修復(base excision repair: BER)経路は、これらの塩基損傷を修復するために細胞に備わっているDNA修復機構である。

塩基除去修復と哺乳類Sirtuinとの関連については、その一つであるSirt6が塩基除去修復に関与していることが報告されている[6]ものの、Sirt1についてはこれま

で検討されていなかった。一方、塩基除去修復経路を構成するさまざまなタンパク質がアセチル化修飾を受けることがこれまでに報告されている[7-9]。我々は、その一つであるAPエンドヌクレアーゼ1 (APE1)のアセチル化制御に着目して研究を行い、Sirt1がAPE1の脱アセチル化を介して細胞内塩基除去修復活性を調節するという事を最近報告した[10]。本稿では、その知見について概説する。

2. Sirt1とAPE1は相互作用する

はじめに、Sirt1とAPE1の関係について調べるため、APE1とSirt1の相互作用の有無について検討を行った。HEK293細胞に両タンパク質を発現し、共免疫沈降法にて相互作用を検討したところ、Sirt1とAPE1の共沈が検出された(図1)。このSirt1とAPE1の共沈は内因性のタンパク質の間でも観察されたことから、Sirt1とAPE1は細胞内で相互作用していることが明らかとなった。また、免疫染色によりSirt1およびAPE1の分布を観察したところ、両タンパク質とも主に核に局在していることが見出された。

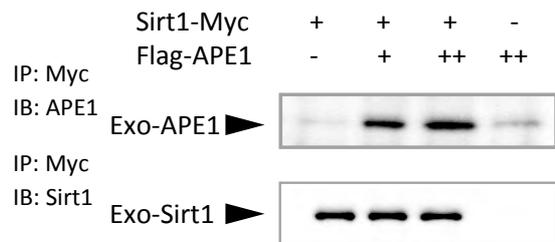


図1. Sirt1とAPE1の相互作用

HEK293細胞にSirt1ならびにAPE1を発現させ、共免疫沈降法により相互作用を検出した。

3. Sirt1はAPE1を脱アセチル化する

APE1がアセチル化酵素であるp300によりアセチル化を受けることが既に報告されていたことから[11]、APE1がSirt1の基質として脱アセチル化をうけるかどうかを次に検討した。in vitroでのSirt1による脱アセチル化の検討のため、組換えAPE1タンパク質をp300によりアセチル化した後Sirt1と反応させ、そのアセチル化レベルをイムノプロットにより評価した(図2)。その結果、p300の処理によりAPE1のアセチル化レベルは上昇し、Sirt1およびその補酵素であるNAD<sup>+</sup>との反応により減少した。さらに、この反応にSirt1阻害剤であるニコチン

連絡先：〒060-0818  
 北海道札幌市北区北18条西9丁目  
 北海道大学大学院獣医学研究科放射線学教室  
 Tel: 011-706-5236  
 Fax: 011-706-7373  
 E-mail: yamamorit@vetmed.hokudai.ac.jp

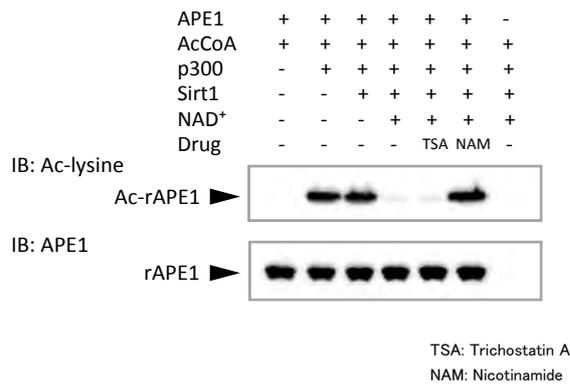


図2. Sirt1によるAPE1の脱アセチル化

p300ならびにSirt1と反応後における組換えAPE1タンパク質のアセチル化レベルをイムノブロットにより評価した。

アミドを加えると、Sirt1によるアセチル化レベルの減少が抑制された。一方、class I・IIのヒストン脱アセチル化酵素の阻害剤であるトリコスタチンAはこれを抑制しなかった。この結果から、APE1はSirt1によってアセチル化レベルの調節をうけることが明らかとなった。

また、HEK293細胞において、Sirt1阻害剤ならびにSirt1 siRNAの処理により細胞内APE1アセチル化レベルが上昇したことから、Sirt1によるAPE1の脱アセチル化は細胞内でも起こっていることが示唆された。

#### 4. Sirt1はgenotoxic stressによる細胞死から細胞を防護する

次に、genotoxic stress下におけるAPE1アセチル化の変化を調べるため、DNAアルキル化剤であるmethyl methanesulfonate (MMS)の影響を観察した。HeLa細胞を500 μM MMSで処理後、APE1アセチル化レベルの変化を経時的に観察したところ、APE1アセチル化はMMS処理後4時間でピークに達し、その後12時間まで減少した。このgenotoxic stress後のAPE1アセチル化に対するSirt1の寄与を調べるため、Sirt1をsiRNAによりノックダウンした際のAPE1アセチル化をコントロールsiRNAと比較した(図3)。その結果、コントロールと比較しSirt1 siRNAを処理した細胞では、MMSによるAPE1アセチル化が増強されていた。Sirt1阻害剤である

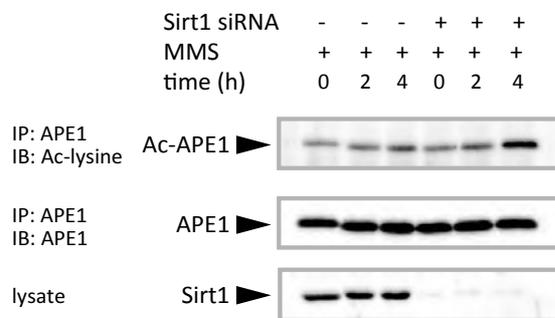


図3. HeLa細胞におけるMMS処理後のAPE1アセチル化の検出

APE1アセチル化におけるSirt1 siRNAの効果を検討した。HeLa細胞にコントロールないしSirt1 siRNAを処理後、500 μM methyl methanesulfonate (MMS)で一定時間刺激し、その際のAPE1アセチル化レベルを検出した。

ニコチンアミド処理もまた同様の効果をもたらすことが観察されたことから、Sirt1がgenotoxic stressによるAPE1アセチル化を抑制的に調節していることが示唆された。

さらに、genotoxic stress後の細胞死に対するAPE1およびSirt1の役割を調べるため、HeLa細胞においてそれぞれのタンパク質をsiRNAによりノックダウンし、MMSにより引き起こされるアポトーシスを評価したところ、APE1およびSirt1のノックダウンは共にMMSによるアポトーシスの亢進を引き起こした(図4A, B)。このことは、APE1のみならずSirt1もまたgenotoxic stressに対する防御機構に参与していることを示唆している。MMSによりアルキル化されたDNAはAPE1を介した塩基除去修復経路により修復される。そこで、塩基除去修復に対するSirt1の寄与を調べるため、APE1またはSirt1をノックダウンしたHeLa細胞の細胞内DNAにおける脱塩基部位(APサイト)形成をコントロールsiRNA処理細胞と比較した(図4C)。すべての条件においてMMSはAPサイト数を増加させたが、APE1および

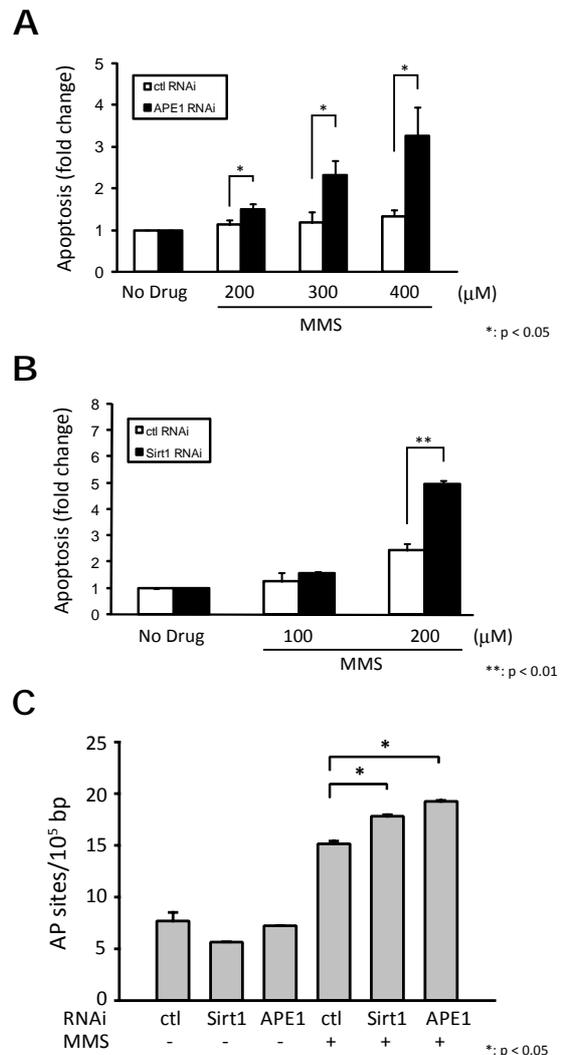


図4. MMS誘発アポトーシス(A, B)ならびに脱塩基部位形成(C)に対するAPE1またはSirt1 siRNAの効果

APE1アセチル化におけるSirt1 siRNAの効果を検討した。HeLa細胞に各種siRNAを処理後MMS刺激を行い、引き起こされるアポトーシスならびに脱塩基部位量を検出した。

Sirt1をノックダウンした細胞ではコントロールと比べて、その数が増大していた。APE1は塩基除去修復に直接関与するタンパク質であるため、当然であると言える一方、この結果はSirt1が塩基除去修復に関与していることを強く示唆するものである。

## 5. Sirt1はAPE1とXRCC1との相互作用を促進し、APエンドヌクレアーゼ活性を亢進する

次に、Sirt1による塩基除去修復活性の調節とAPE1脱アセチル化がどのように関連しているかを明らかにすることを試みた。X-ray repair cross-complementing 1 (XRCC1)は、APE1を含む様々な塩基除去修復関連タンパク質と相互作用し、それらのタンパク質相互作用の足場となることで塩基除去修復を促進する[12]。XRCC1はAPE1のN末端と相互作用し、塩基除去修復を促進することが報告されていることから[13]、筆者らはAPE1のアセチル化がAPE1とXRCC1との相互作用を調節するのではないかと考え、これについて検証を行った。

HeLa細胞においてXRCC1を免疫沈降した際にAPE1の共沈が認められ、XRCC1とAPE1が相互作用することが示唆された。この相互作用はSirt1阻害剤ニコチンアミドにより減弱し、Sirt1活性化剤レズベラトロールにより逆に増強されたことから、Sirt1活性がXRCC1とAPE1との相互作用を調節していることが示唆された(図5A)。このことは、レズベラトロールによるXRCC1-APE1相互作用の増強が、Sirt1 siRNAの処理により見られなくなったことから支持された。

次に、XRCC1免疫沈降物を用いてAPエンドヌクレアーゼ活性を測定したところ、コントロールと比較しニコチンアミド処理したサンプルではAPエンドヌクレアーゼ活性は減弱し、レズベラトロール処理したサンプルでは活性の上昇が観察された(図5B)。さらに、XRCC1免疫沈降物中のAPエンドヌクレアーゼ活性は

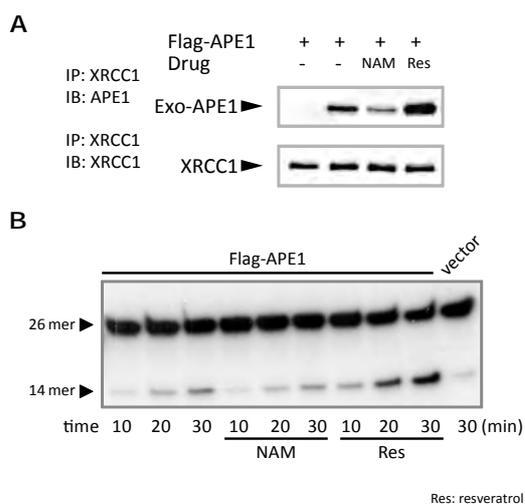


図5. XRCC1免疫複合体を用いた解析

(A) HeLa細胞におけるAPE1-XRCC1相互作用に対するニコチンアミドおよびレズベラトロールの効果

(B) HeLa細胞由来XRCC1免疫複合体におけるAPエンドヌクレアーゼ活性に対するニコチンアミドおよびレズベラトロールの効果

Sirt1 siRNAにより減弱したことから、Sirt1は細胞内においてAPE1とXRCC1との相互作用を調節することにより、細胞内APエンドヌクレアーゼ活性に影響を与えていることが示唆された。

## 6. おわりに

本研究において、①APE1がSirt1による脱アセチル化の標的であること、②genotoxic stressはAPE1のアセチル化を亢進し、Sirt1はこれを抑制すること、③genotoxic stress後の細胞死および塩基除去修復にSirt1が関与していること、④Sirt1はAPE1とXRCC1の相互作用を調節し、これによって細胞内APエンドヌクレアーゼ活性を調節していること、が示唆された。近年の研究によりSirt1がゲノム安定性の維持に関与していることを示すさまざまな知見が得られており[14, 15]、本研究で得られた結果もまたそれに一致するものであるといえる。本研究において、Sirt1とAPE1との相互作用やSirt1によるAPE1の脱アセチル化は細胞がストレス下でない状態でも観察され、さらにgenotoxic stress下ではSirt1の阻害によりアセチル化レベルがさらに増大したことから、Sirt1はAPE1に恒常的に結合し、APE1を脱アセチル化することでDNA修復活性の維持に寄与していることが考えられる。今回我々はSirt1によるAPE1の脱アセチル化に注目して研究を行ったが、塩基除去修復を構成する他のタンパク質の働きにSirt1が関与しているかどうかについては今後の検討課題である。

はじめに述べたように、Sirt1により制御される生理機能は非常に多岐にわたることが明らかになりつつあり、DNA修復能もその一つであることがわかってきた。DNA修復能と老化・寿命調節との関連性は以前より指摘されていたが、近年Sirtuinタンパク質がこの過程に関与することが明らかになってきたことにより、この関連性への理解がさらに進むものと思われる。今後、Sirtuinタンパク質の下流で個々の過程がどのように調節されているのか、あるいはSirtuin機能が時間・空間的にどのように調節されるのか、それがDNA修復能をはじめとした個々の生理機能にどのように影響するのか、といった点が明らかになることで、Sirtuinの老化・寿命に与える影響についての理解が深まるものと思われる。

## 参考文献

- [1] Haigis MC and Sinclair DA. Mammalian sirtuins: biological insights and disease relevance. *Annu Rev Pathol* 5:253-295; 2010.
- [2] Michan S and Sinclair DA. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J* 404:1-13; 2007.
- [3] Yuan Z, Zhang X, Sengupta N, et al. SIRT1 regulates the function of the Nijmegen breakage syndrome protein. *Mol Cell* 27:149-162; 2007.
- [4] Fan W and Luo J. SIRT1 regulates UV-induced DNA repair through deacetylating XPA.

- Mol Cell 39:247-258; 2010.
- [5] Vijg J. The role of DNA damage and repair in aging: new approaches to an old problem. *Mech Ageing Dev* 129:498-502; 2008.
  - [6] Mostoslavsky R, Chua KF, Lombard DB, et al. Genomic instability and aging-like phenotype in the absence of mammalian SIRT6. *Cell* 124:315-329; 2006.
  - [7] Bhakat KK, Mokkapati SK, Boldogh I, et al. Acetylation of human 8-oxoguanine-DNA glycosylase by p300 and its role in 8-oxoguanine repair in vivo. *Mol Cell Biol* 26:1654-1665; 2006.
  - [8] Tini M, Benecke A, Um SJ, et al. Association of CBP/p300 acetylase and thymine DNA glycosylase links DNA repair and transcription. *Mol Cell* 9:265-277; 2002.
  - [9] Hasan S, El-Andaloussi N, Hardeland U, et al. Acetylation regulates the DNA end-trimming activity of DNA polymerase beta. *Mol Cell* 10:1213-1222; 2002.
  - [10] Yamamori T, DeRicco J, Naqvi A, et al. SIRT1 deacetylates APE1 and regulates cellular base excision repair. *Nucleic Acids Res* 38:832-845; 2010.
  - [11] Bhakat KK, Izumi T, Yang SH, et al. Role of acetylated human AP-endonuclease (APE1/Ref-1) in regulation of the parathyroid hormone gene. *EMBO J* 22:6299-6309; 2003.
  - [12] Caldecott KW. XRCC1 and DNA strand break repair. *DNA Repair (Amst)* 2:955-969; 2003.
  - [13] Vidal AE, Boiteux S, Hickson ID, et al. XRCC1 coordinates the initial and late stages of DNA abasic site repair through protein-protein interactions. *EMBO J* 20:6530-6539; 2001.
  - [14] Oberdoerffer P, Michan S, McVay M, et al. SIRT1 redistribution on chromatin promotes genomic stability but alters gene expression during aging. *Cell* 135:907-918; 2008.
  - [15] Wang RH, Sengupta K, Li C, et al. Impaired DNA damage response, genome instability, and tumorigenesis in SIRT1 mutant mice. *Cancer Cell* 14:312-323; 2008.