
動物細胞の DNA の超らせん構造を支配する酵素の研究

Studies on mammalian topoisomerases that control DNA superhelicity

- 代表研究者 愛知県がんセンター研究所生化学部長 高橋 泰 常
Chief, Lab. of Biochem., Aichi Cancer Center Res. Inst.
Taijo TAKAHASHI
- 協同研究者 九州大学医学系研究科分子生命科学教授 西本 毅 治
Prof., Dept. of Molecular Biology, Graduate School of Medical Science,
Kyushu Univ.
Takeharu NISHIMOTO
- 愛知県ガンセンター研究所主任研究員 石田 良 司
Senior Researcher, Lab. of Biochem., Aichi Cancer Center Res. Inst.
Ryoji ISHIDA

Topoisomerases I and II are known to control the level of DNA superhelicity in bacteria, while the function of the topoisomerases in mammalian cells remains unclear. To investigate the biological role of topoisomerase II, we isolated two stable BHK mutants resistant to novobiocin, an inhibitor of topoisomerase II. Two novobiocin-resistant mutants (Nov^rA2, Nov^rA41) were three and four times more resistant than the wild-type cells to novobiocin, and were conversely sensitive to nalidixic acid. When we isolated derivatives of both Nov^r mutants which are resistant to nalidixic acid, those (Nov^rNal^r) were found to be phenotypically reverted to be novobiocin-sensitive, like the wild-type cells, thereby suggesting the relationship between the targets for novobiocin and for nalidixic acid. The DNA and RNA syntheses of Nov^r mutants were more resistant to novobiocin and more sensitive to nalidixic acid, than those of wild-type cells. However, *in vitro* assays of wild-type and Nov^r cell extracts were unable to demonstrate any differences in the sensitivity of P4 DNA unknotting activity of topoisomerase II to inhibition by novobiocin.

In the continuous study, we found that Nov^rA2 cells were also cross-resistant to the other inhibitors of topoisomerase II, VP-16 and adriamycin. A2Nal^r cells were partially reverted in the sensitivity of cells to VP-16 and adriamycin. When VP-16 was added to cell culture, the drug induced DNA strand breaks much more in BHK cells than in Nov^rA2 cells. However, there are no significant differences in the VP-16 induced DNA cleavage activity of partially purified topoisomerase II from both cell lines. There was also no difference in novobiocin uptake into both cell lines.

These results indicate that the resistance of Nov^rA2 cells to topoisomerase II inhibitors is not due to the reduced membrane permeability, and suggest that the topoisomerase II associated with chromatin structure is less susceptible to drugs in Nov^r cells, compared to that in wild-type cells.

研究目的

細胞内の DNA は原核、真核生物を問わず、二重らせん構造がさらにねじれた超らせん構造をとっている。この超らせん構造を支配する酵素はトポイソメラーゼと呼ばれ、I型とII型が存在する。DNAに超らせん構造を導入する酵素として

大腸菌からII型トポイソメラーゼであるDNAジャイレースが発見され(1976)、それがDNA複製に必須であることが示された。DNAの超らせん構造はDNA複製のみならず、遺伝子発現、染色体分配の機構にかかわることが明らかにされてきた。

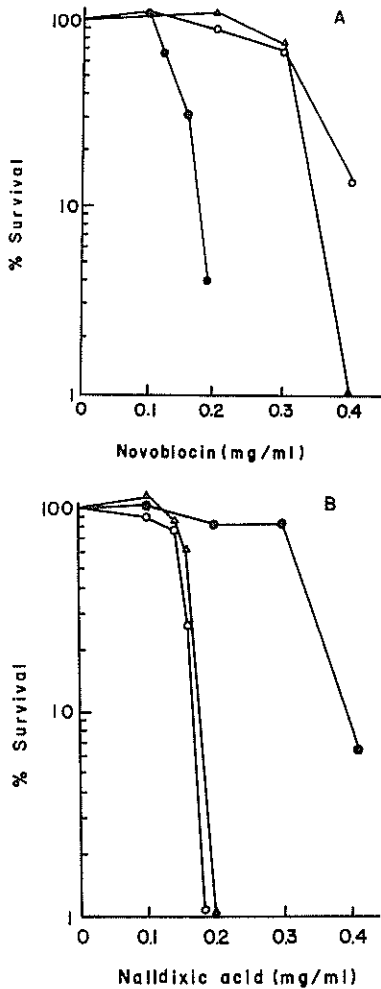


図1. BHK および Nov^r 細胞のコロニー形成能。
●, BHK; ○, Nov^rA2; △, Nov^rA41.

真核細胞では DNA ジャイレースに類似の酵素であるトポイソメラーゼ II (Topo II) が 1980 年に発見された。この酵素は ATP に依存して二重鎖 DNA を切断、再結合する点で DNA ジャイレースと同様である。しかし、正、負の超らせん構造を弛緩させる活性をもつが、DNA ジャイレースがもつ、DNA に超らせん構造を導入する活性は証明されていない。また DNA ジャイレースはノビオシン (Novo), ナリジキシン酸 (Nal) によって阻害されるが、真核細胞の Topo II については Novo によって阻害されるが、Nal による

阻害は明らかでない。

真核細胞、とくに動物細胞の Topo II は、その生化学は徐々にすすめられてきているが、細胞における機能についてはほとんど不明といってよい現状である。酵素の機能を探るための有力な方法は体細胞遺伝学的手法である。すなわち、その酵素に関する突然変異株細胞を分離し、変異株細胞のもつ表現型を酵素の変異と対応させて調べる方法である。我々は最近、動物細胞の Topo II の機能を知る目的で、ベビーハムスター腎 (BHK) 細胞より、Novo に耐性の変異株 2 株の分離に成功した。本研究はこの変異株を用いて、Novo 耐性の標的蛋白質の酵素学的検索を行ない、動物細胞の Topo II の性質、機能を明らかにすることを目的とする。

研究経過

1) Novo 耐性細胞の分離

BHK 細胞を MNNG で処理し、のち 3 世代以上培養し、段階的に濃度を高めた Novo 存在下で培養することによって、安定な二つの Novo 耐性 (Nov^r) 細胞株、Nov^rA2, Nov^rA41 を得た。これらは 200 μg/ml Novo 存在下でもよく増殖するが、BHK 親株細胞の増殖はきわめて弱い。このことはコロニー形成能によっても明瞭に認められる。図 1A に示されたように、BHK 細胞は 200 μg/ml Novo 存在下ではコロニー形成はきわめてわずかであるが、Nov^r 細胞では 300 μg/ml Novo 存在下でもほぼ 100% のコロニー形成がみられる。

これらの Nov^r 細胞は、他の DNA ジャイレース阻害剤である、Nal に対しては逆に感受性に変異している。図 1B に示されるように、Nov^r 細胞は 200 μg/ml Nal 存在下ではコロニーを形成しないが、BHK 細胞は 300 μg/ml Nal 存在下でもコロニー形成能は 100% である。

なお、Novo の細胞膜透過性は ³H-Novo を用いて調べた結果、Nov^r 細胞、BHK 細胞の間に差がなかった。

2) Nov^r 細胞からのリバータント (復帰変異株)

Nov^r 細胞は DNA ジャイレースの一つの阻害

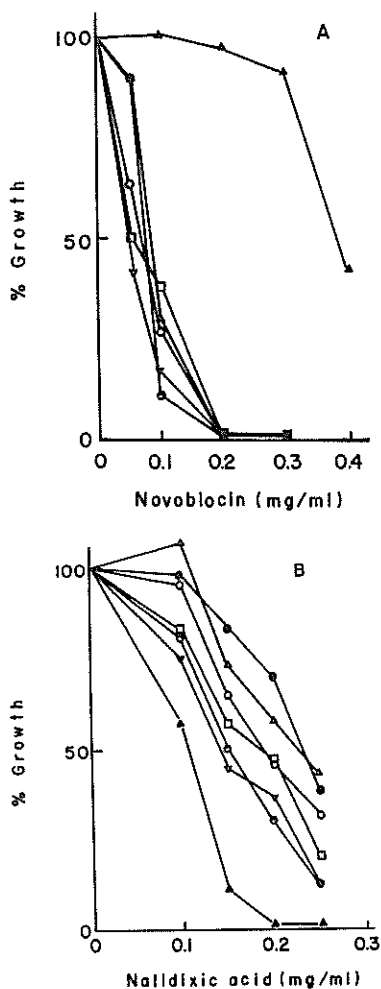


図2. Nov^rA2およびリバータント細胞株の増殖。
▲, Nov^rA2; ●, BHK; その他, Nov^rA2Nal^r.

剤である Novo に耐性であり、他の阻害剤である Nal に感受性であるという特色をもつ。この両属性の関連を知る目的で、Nov^r細胞からリバータントの分離を試みた。MNNG 処理後、Nal 耐性の細胞を拾うことによって、Nov^rA2 から五つの、Nov^rA41 から四つのリバータントを得た。これらのリバータントの増殖に対する Novo, Nal の作用を調べた結果を、ここには Nov^rA2 からのリバータント (Nov^rA2 Nal^r) のみについて図 2 に示す。リバータントは Nal に対してより耐性であり、Novo に対しては BHK 細胞と同程度に感受

性であった。この事実は細胞内の Novo および Nal の標的が互いに関連するものであることを示す。

3) DNA, RNA 合成

DNA, RNA 合成はそれぞれ ³H-チミジン, ³H-ウリジンの取込みで調べた。図 3 に示されるように、細胞の増殖と同じく、Nov^r細胞のそれらは、BHK 細胞に比べて Novo に耐性であり、Nal に感受性であった。これらの結果は、Topo II が細胞の DNA 複製、遺伝子発現にかかわることを示唆する。

4) トポイソメラーゼ II 活性

次に Nov^r細胞の Topo II が変異しているか否かを、細胞抽出液の Topo II について調べた。細胞は log phase にある細胞を集め、液体窒素で凍結し、-70℃に保存したものをを用いた。低調バッファー (10 mM Tris-HCl, pH 7.8, 1 mM CaCl₂, 1 mM dithiothreitol, 1 mM PMSF) に浮遊させ、Dounce のホモジナイザーを用いてホモジナイズし、遠沈により、核と細胞質に分けた。Topo II の活性としてバクテリオファージ P4 の knotted DNA を基質として、その unknotted 活性を調べた。細胞質分画、核分画 (その塩抽出液) はともに unknotted 活性を含んでいた。図 4 に細胞質分画の Topo II 活性の Novo 感受性を示す。生ずる unknotted DNA の位置は図 4 の 0 μg/ml Novo の lane に示される。図 4 には、Nov^rA2 細胞の抽出液の Topo II は、増加する Novo の濃度に対して、BHK 細胞 (図の WT) からのそれと同程度に阻害されることが示されている。(酵素量を漸次うすめて、両者ほぼ同一の酵素活性に合わせて比較している。)

細胞核からの 0.35 M NaCl 抽出液の Topo II についても調べたが、細胞質分画の結果と同様であった。上述の方法で得た細胞質分画に含まれる Topo II 活性の多くは、細胞破碎時に細胞核から遊離したものと考えられる。

なお、Nal による Topo II 活性の阻害は認められなかった。

5) これまでの結論

BHK 細胞から二つのノボビオシン耐性 (Nov^r)

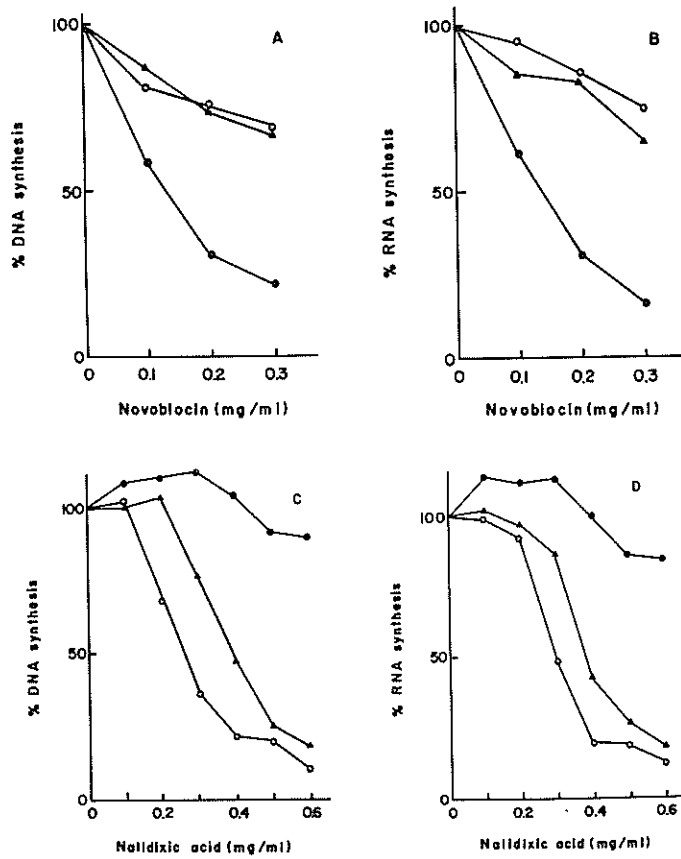


図3. BHK および Nov⁺細胞の DNA, RNA 合成能。
●, BHK; ○, Nov⁺A2; △, Nov⁺A41.

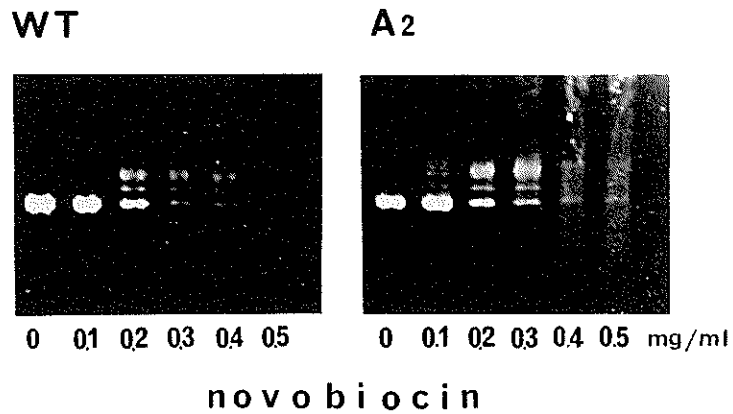


図4. BHK(WT) および Nov⁺A2 細胞の抽出液のトポイソメラーゼIIのノビオシン感受性.

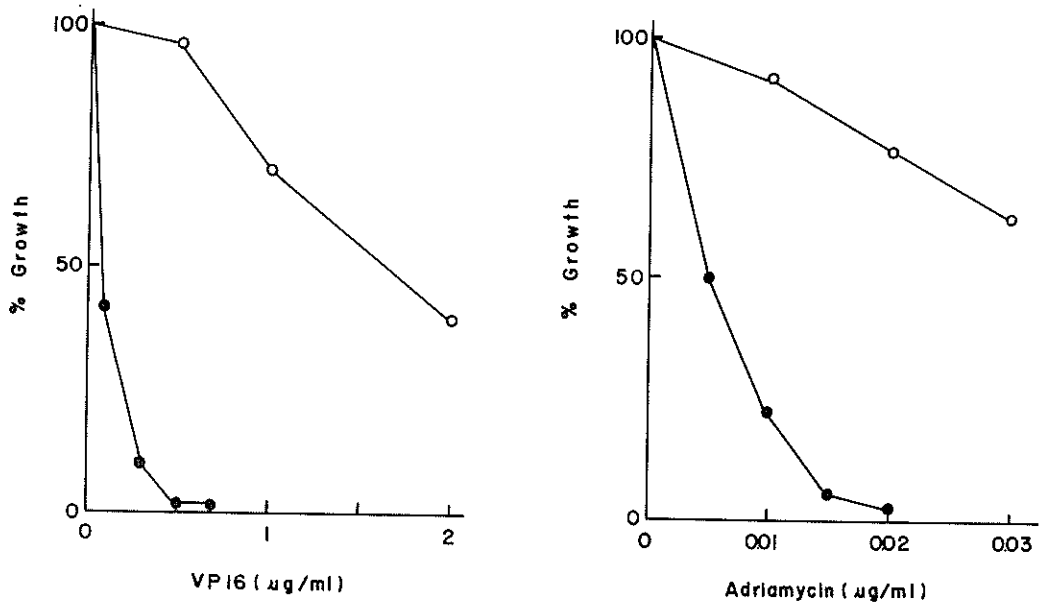


図5. Nov^rA2細胞の交叉耐性。
●, BHK; ○, Nov^rA2.

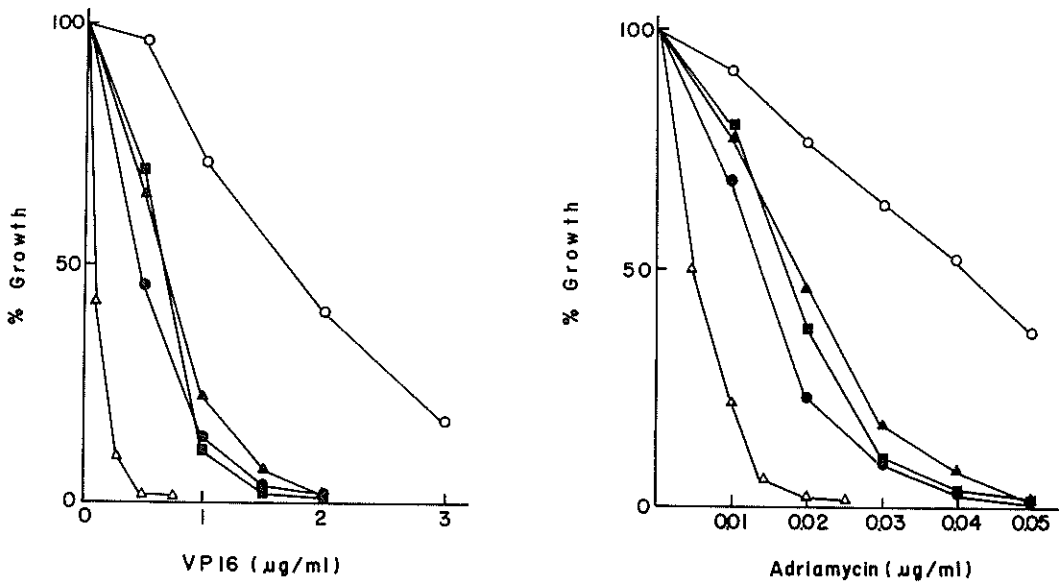


図6. Nov^rA2およびリバタント細胞株の増殖。
△, BHK; ○, Nov^rA2, その他, Nov^rA2Nal^r.

細胞を得た。Nov^r細胞の増殖、DNAおよびRNA合成はNovoに対して耐性であるが、Nalに対して感受性であった。Nov^r細胞からリバタントを得たが、それらの表現型は親株に復帰し

た。以上の結果からNovoおよびNalの細胞内標的が関連していることが強く示唆された。しかし、細胞抽出液のTopoIIのP4 DNA unknottting活性は、親株、Nov^r細胞の間でNovo

WT

Nov^rA2

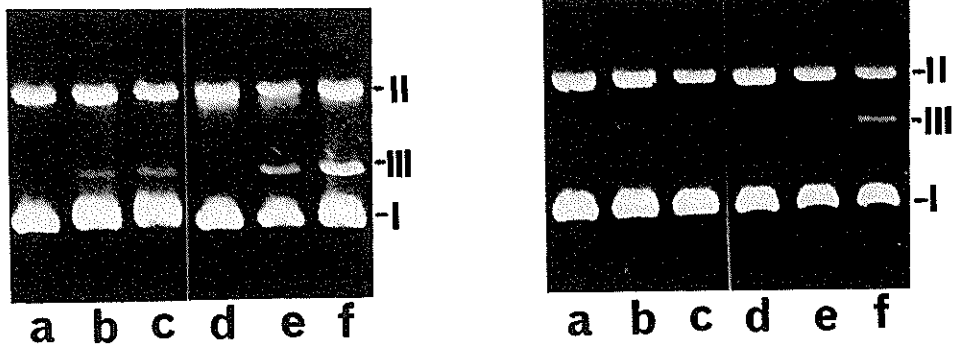


図7. BHK(WT) および Nov^rA2 細胞の抽出液の VP-16 induced DNA 切断活性.
 VP-16 濃度: a, d, 0 $\mu\text{g/ml}$; b, e, 10 $\mu\text{g/ml}$; c, f, 100 $\mu\text{g/ml}$. a, b, c は d, e, f の酵素量の 1/5.
 I, 負の超らせん DNA; II, 弛緩型 DNA; III, 線状 DNA.

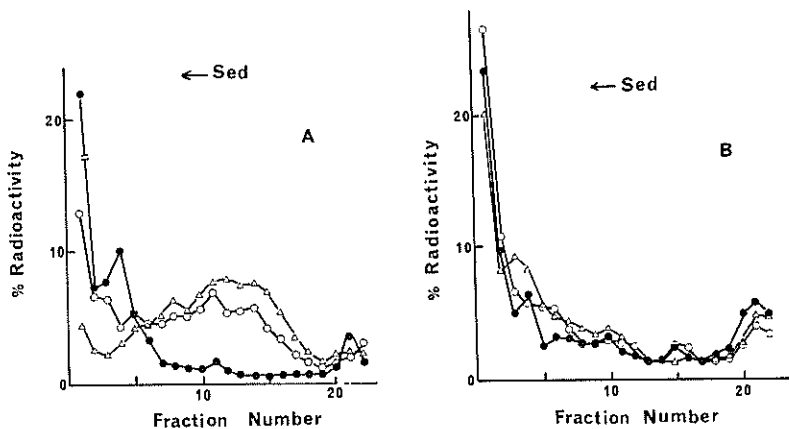


図8. 細胞 DNA の VP-16 による切断.
 A, BHK 細胞; B, Nov^rA2 細胞.
 VP-16 濃度: ●, 0 $\mu\text{g/ml}$; ○, 30 $\mu\text{g/ml}$; △, 100 $\mu\text{g/ml}$.

による阻害度に差を見いだし得なかったことから、Nov^r 細胞における変異が Topo II にあるとは認められなかった。

6) Nov^r 細胞の交叉耐性

その後、Nov^rA2 細胞は、他の Topo II 阻害剤である VP-16、アドリアマイシンに対しても交叉耐性をもつことを見いだした。その結果を図5に示す。VP-16 に対する耐性は Novo に対する耐性度より高く約 10 倍であった。また、リバータント (Nov^rA2 Nal^r) は VP-16、アドリアマイシン感

受性が部分的に復帰することが認められた (図6)。

7) VP-16 による Topo II の DNA 切断活性

Topo II は DNA の二重鎖を切断し、超らせんのねじりをかえて再び切断部位を結合することによって、超らせん DNA を弛緩させるが、VP-16 は Topo II が二重鎖切断を行なう部位に働き、次いで起こるべき再結合を妨げる作用をもつ。その作用の検出には、試験管内反応では、Topo II が二重鎖切断を行なった部位に結合した状態にある

ので、SDS および蛋白質分解酵素処理によって、Topo II を除くと、超らせん DNA は二重鎖切断をきたし、結果的に線状 DNA を生ずる。生じた線状 DNA の量を求めれば切断の割合を知ることができ、VP-16 の量が多ければ切断の割合は高まる。この活性を Topo II の VP-16 induced DNA 切断活性とよぶ。

Nov^r細胞が VP-16 に耐性であることは、この Topo II の VP-16 induced DNA 切断活性が親株とことなることによる可能性があり、それを調べた。酵素標品は細胞核を分離し、細胞核から 0.35 M NaCl を用いて得た抽出液である。0.35 M NaCl によって核の Topo II 活性のほとんどすべてが抽出される。結果は図 7 に示すごとく、Nov^rA2 細胞と BHK 細胞 (図には WT) との間で、線状 DNA の生ずる VP-16 の濃度に差がみられなかった。すなわち、Nov^r細胞の核抽出液中の Topo II の VP-16 induced DNA 切断活性が VP-16 に対してより耐性であるという形式での、Topo II の変異を見いだすことができなかった。

以上は試験管内における Topo II の VP-16 induced DNA 切断活性であるが、細胞レベルでこれを調べることができる。細胞に VP-16 を与え、1 時間後に細胞を集め、細胞 DNA をアルカリ蔗糖濃度勾配遠心にかけ、細胞 DNA の切断をみる方法である。その結果を図 8 に示す。明らかに、BHK 細胞の DNA が VP-16 によって切断されているのに反して、Nov^r細胞の DNA が VP-16 によって切断されがたいことが示されている。

考 察

我々の得た Nov^r細胞は Novo のみならず、他の Topo II 阻害剤である VP-16、アドリアマイシンにも耐性を示したことから、Nov^r細胞のもつ Topo II の変異が予想されたが、細胞抽出液の Topo II の、P4 DNA unknotting 活性および VP-16 induced DNA 切断活性において変異を見いだし得なかった。しかし、一方、細胞レベルで調べた VP-16 による DNA 切断が、Nov^r細胞で BHK 細胞に比して VP-16 に対して耐性であったことから、Topo II が細胞内でクロマチン構造と関連して働く状態において耐性を示す可能性が考えられ、今後この点を明らかにしてゆく必要がある。

口 頭 発 表

- 1) 石田良司, 西沢美和子, 高橋泰常, 西本毅治: ノボビオシン耐性 BHK 細胞の分離とその解析. 第 39 回日本細胞生物学会大会 (昭和 61 年 10 月 15 日, 東京)
- 2) 石田良司, 西沢美和子, 高橋泰常: ノボビオシン耐性 BHK 細胞. 第 5 回「染色体の構築」ワークショップ (昭和 62 年 2 月 10 日, 京都)
- 3) 高橋泰常, 石田良司: 多剤耐性とトポイソメラーゼ II. 「DNA トポロジーの会」(昭和 62 年 6 月 2 日, 東京)

発 表 論 文

- 1) R. Ishida, M. Nishizawa, K. Fukami, K. Mae-kawa, T. Takahashi and T. Nishimoto: Isolation and Characterization of Novobiocin-Resistant BHK Cells. *Somat. Cell and Mol. Genet.*, 13, 11-20 (1987).