

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18195

研究課題名(和文)放射線誘発修復関連核内ドメイン形成における核骨格タンパク質の機能解析

研究課題名(英文)Functional analyses of nucleoskeleton proteins on formation of radiation-induced nuclear foci of DNA repair factors

研究代表者

堀越 保則(Horikoshi, Yasunori)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教

研究者番号：00719429

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞核高次構造と、細胞の放射線応答やDNA修復機構の制御との関連は十分には理解されていない。本研究では、核構造を形作る「核骨格」タンパク質の1つであるNuMAに着目し、放射線感受性やDNA修復に関与することを示した。一方で、NuMAは細胞核内に一様に存在するものの、DSBs部位近傍に存在するものだけが、DNA修復の過程において早い段階からリン酸化修飾を受け、経時的に増幅していくことを明らかにした。さらに、放射線量依存的に存在量が減少することを見出し、放射線被ばくによりDNA以外にも細胞核、特にその高次構造が損傷を受けうることを示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞核高次構造と、細胞の放射線応答やDNA修復機構との、機能の関連については、これまで十分には理解されていない。本研究は、ゲノム修復という「核機能」の制御に「核構造」を担う因子が関わっている具体例を示したことで、「構造による機能制御」の新しいモデルの提唱・確立に貢献した。また、放射線被ばくによりDNA以外にも細胞核、特にその高次構造が損傷を受けうるという研究結果は、今後放射線生物学に新たな展開をもたらすものと考えている。放射線治療という観点からも新たな知見であり、将来的な応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：The functional connectivity between higher-order nuclear architecture and responses to radiation exposure or DNA repair mechanisms of cells has been poorly understood. In this study, we focused NuMA, one of the “nucleoskeleton” proteins, and showed its involvement in both radiation susceptibility and DNA repair. We also revealed that the phosphorylation of NuMA occurs in the early stage of DNA damage responses and then amplified. This modification is limited to the vicinity of damage sites albeit their distribution throughout the entire nucleus. Besides, we found the radiation dose-dependent reduction of NuMA proteins, suggesting the effect of radiation exposure on the higher-order nuclear architecture together with chromosome DNA.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 DNA修復 細胞核構造 核骨格タンパク質

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線の生物作用の標的は、生命の設計図たる DNA である。放射線被ばくにより多様な DNA 損傷が誘発されるが、中でも DNA 二本鎖切断(DNA Double-Strand Breaks:DSBs)は最も重篤な DNA 損傷の1つで、細胞死や発がんの原因となる。骨髄・消化管をはじめ、臨床的に観察される臓器・組織および個体レベルの急性障害の原因は細胞死である。一方、発がんなどの晩発障害についても DNA の変異に起因する現象であり、生体への放射線影響を議論する際に、細胞レベルでの放射線応答、特に DSBs 修復機構に着目するという観点は、非常に重要となる。

DSBs 修復機構は上記の通り、生命が活動を存続するうえで不可欠なメカニズムである。このため、遺伝学的スクリーニングやオミクス解析を用いた網羅的な検証による修復因子の同定、あるいはハイスループットな自動イメージング機器や超解像度顕微鏡など、最先端の実験技術が導入され、DSBs 修復機構に関する知見は、飛躍的に蓄積してきた。さらに近年、発生や細胞分化の過程・細胞周期の進行などに伴いクロマチンや核内構造の相互作用がダイナミックに変化することが、次世代シーケンサーを用いた Chromosome Conformation Capture(3C)アッセイ法の開発などにより明らかになってきた。このような研究から、細胞核内の「構造による機能制御」の仕組みが注目されている。しかし、DSBs 誘導後のクロマチン構造の変化や修復因子との相互作用の変化は、未解明な点が多い。顕微鏡観察により、DSBs 部位や修復因子が核膜などの核内構造と相互作用することが報告されているが、その多くが酵母を用いた実験系からもたらされた知見である。ヒトをはじめとした高等真核生物の細胞核には、PML ボディなど酵母にはない核内高次構造体も存在しており、さらに細胞核のサイズも酵母と比べて約 1,000 倍と大きく異なることから、ヒト細胞には酵母とは異なる独自の細胞核構造に関連する修復制御機構が存在する可能性が考えられていた。

### 2. 研究の目的

細胞核高次構造と、細胞の放射線応答や DNA 修復機構との、機能の関連の解明を目指す。核構造を形作る「核骨格」タンパク質が、ゲノム修復という核機能の制御にどのように関与しているかを検証する。本研究では核骨格タンパク質の1つである NuMA に着目し、解析を進めた。

### 3. 研究の方法

(1) NuMA の発現を抑制した細胞に放射線を照射し、放射線感受性や DNA 修復機構への影響について検証する。放射線感受性への影響の評価には、コロニーフォーメーションアッセイを用いる。DNA 修復機構への影響に関しては、DSBs のマーカとして知られているリン酸化ヒストン H2AX( $\gamma$ H2AX)抗体を用いた間接蛍光免疫染色法により解析する。

(2) DNA 損傷依存的な NuMA のリン酸化について解析を行う。放射線に被ばくさせた細胞内のリン酸化 NuMA を、ウェスタンブロット法により検出する。また、DNA 損傷部位とリン酸化 NuMA の時空間的な位置関係を検証するため、紫外線レーザーによって核内の任意の場所に DSBs を誘発させた細胞に対し、リン酸化 NuMA 抗体を用いた間接蛍光免疫染色法を行う。

(3) 被ばくさせた放射線量と NuMA タンパク質との関連を調べる。照射する放射線量を変化させた場合、細胞内の NuMA タンパク質に量的・質的な差異が生じるかをウェスタンブロット法により検証する。

### 4. 研究成果

(1) NuMA の発現を抑制した細胞に 1Gy、3Gy、5Gy の X 線を照射し、コロニーフォーメーションアッセイにより放射性感受性への影響を検証した。NuMA の発現を抑制すると、放射線感受性が有意に上昇した。続いて、NuMA の発現を抑制した細胞を 2Gy の X 線に被ばくさせ、照射後 1 時間および 10 時間の時点で  $\gamma$ H2AX 抗体を用いた間接蛍光免疫染色法を行ない、DNA 修復機構への影響を調べた。対照実験と比較して、NuMA の発現を抑制することにより、照射後 10 時間を経過しても  $\gamma$ H2AX のシグナルが多く観察された。以上より、NuMA が細胞の放射線応答や DNA 修復機構に関与していることが示唆された。

(2) 2 Gy の X 線に被ばくさせた細胞の抽出液を、被ばく後 5 分、10 分、15 分、30 分、60 分の各時点で作成し、DNA 損傷依存的な NuMA のリン酸化の経時変化をウェスタンブロット法により検証した。リン酸化は照射後 5 分の時点で既に観察され、60 分後までシグナル強度は増加し続けた。この結果から、DNA 損傷依存的な NuMA のリン酸化は早い段階で起こり、その後増幅していくという動態が示唆された。次に、DNA 損傷部位とリン酸化 NuMA の時空間的な位置関係を間接蛍光免疫染色法により観察した。紫外線レーザーによって細胞核内の任意の場所に DSBs を誘発させたところ、DSBs 部位に合致するようにリン酸化 NuMA のシグナルが検出された。NuMA タンパク質自体は DNA 損傷とは無関係に核内に一様に観察されたことから、DSBs 部位近傍でのみリン酸化が起こるといえることが考えられる。今後、超解像度顕微鏡を用いた観察を行い、より詳細な解析を進めていくことが肝要である。なお、経時変化については、上述の結果と一致するデータが得られた。

(3) 細胞に 3 Gy、6 Gy、9 Gy、12 Gy、15 Gy の X 線を照射して、1 時間後に細胞抽出液を作成し、放射線量と NuMA タンパク質との関連をウェスタンブロット法により検証した。結果として、線量依存的に細胞内の NuMA タンパク質存在量が減少することが明らかになった。このことから、放射線被ばくにより DNA 以外にも細胞核、特にその高次構造が損傷を受けうることが示唆され、今後の詳細な解析が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shi L, Sun J, Kinomura A, Fukuto A, Horikoshi Y, Tashiro S	4. 巻 166
2. 論文標題 Matrin3 promotes homologous recombinational repair by regulation of RAD51.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of biochemistry	6. 最初と最後の頁 343-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvz041	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 堀越 保則
2. 発表標題 ゲノム損傷依存的RAD51核内フォーカス形成の制御機構
3. 学会等名 第59回原子爆弾後障害研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀越 保則
2. 発表標題 相同組換え修復時の相同的対合は特徴的な核内区画で起こる
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasunori Horikoshi
2. 発表標題 Homologous pairing during recombinational DNA repair take place within distinctive nuclear compartment
3. 学会等名 EMBO Workshop Chromatin and Epigenetics (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堀越 保則, 孫 継英, 田代 聡
2. 発表標題 ゲノム損傷依存的RAD51核内フォーカス形成の制御機構
3. 学会等名 第十一回「光塾」
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----