

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2007 ～ 2009
課題番号：19310037
研究課題名（和文） 放射線応答における細胞核高次構造変換
研究課題名（英文） CONFORMATIONAL CHANGE OF NUCLEAR ARCHITECTURE IN RESPONSE TO IONIZING IRRADIATION

研究代表者
田代 聡 （TASHIRO SATOSHI）
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号：20243610

研究成果の概要（和文）：本研究では、ゲノム損傷に応答して形成されるさまざまな放射線誘発核内フォーカスの構造と動態、およびゲノム損傷によるクロマチンの構造変化に焦点を当て、ヒト細胞の放射線応答機構の解明に取り組んだ。その結果、ゲノム修復蛋白質RAD51がゲノム損傷領域に核内フォーカスを形成するためには、ヒストンH2AバリエーションであるヒストンH2AXのアセチル化およびユビキチン化修飾による損傷クロマチンから放出が重要であることを報告した。さらに、もうひとつのヒストンH2AバリエーションH2AZも、ゲノム損傷部位で損傷クロマチンから放出されることを見だし、現在論文投稿準備中である。

研究成果の概要（英文）：We examined the mechanism of human cellular response against ionizing irradiation. For this purpose, we analyzed the structure and dynamics of the radiation-induced nuclear foci and reorganization of damaged chromatin. We found that DNA damage-induced release of histone H2AX, a variant of histone H2A, from damaged chromatin is required for the DNA damage-induced focus formation of RAD51. The release of H2AX from damaged chromatin is regulated by acetylation and ubiquitination of H2AX by TIP60 and UBC13, respectively. We also found that histone H2AZ, another H2A variant, is released from chromatin after induction of DNA damage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
2008年度	4,800,000	1,440,000	6,240,000
2009年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	14,900,000	4,470,000	19,370,000

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線応答、ゲノム修復、クロマチン構造、細胞核高次構造

1. 研究開始当初の背景
放射線は、直接、あるいは酸化ストレスなど

を介して間接的にさまざまな障害を細胞にもたらす。そのなかでも最も重篤かつ放射線

に特徴的なゲノム障害のひとつである DNA 二本鎖切断は細胞にとって致命的である。このため、その修復機構をより深く理解することは、現在でも放射線影響研究の重要な課題となっている。また、致命的な放射線障害とともに、低線量被曝の人体影響も放射線生物学における重要な研究課題のひとつとなっている。

DNA 二本鎖切断修復機構については、1990 年代にさまざまなヒト細胞の修復因子が同定され、これらの因子のプロテオミクス解析などの新しい生化学的手法や酵母や遺伝子破壊マウスを用いる遺伝学的手法を用いた研究が精力的に行われた。その結果、ゲノム修復に関連する多くの蛋白質が放射線照射後に核内ドメイン（放射線誘発核内フォーカス）を形成することが明らかになってきた。しかし、放射線応答に係わるさまざまな核内ドメインの動態やその相互関係、およびゲノム損傷によるクロマチンの高次構造変化については未だ不明な点が未だ多い。このため、放射線障害に体する細胞および個体の応答をより深く理解するためには、ゲノム損傷誘導後の細胞核高次構造の変化を検証するという新しい生物学的アプローチが重要であると考えられた。

我々は、新しい細胞生物学的手法を用いてヒト細胞の核高次構造とゲノム修復機構の関連を追求してきた。1996 年には、DNA 二本鎖切断修復の重要な因子である RAD51 がヒトリンパ球で DNA 合成期に核内フォーカスを形成することを見出し、ゲノム修復機構と核高次構造の関連を初めて報告した。その後、放射線誘発核内フォーカスが損傷部位に集積した修復蛋白質により形成されているのか、あるいは細胞核全体での反応として形成されるのかを検証するために、核内の限局した領域に DNA 二本鎖切断を誘導する「紫外線レーザーマイクロ照射法」を開発した。この新しい細胞生物学的手法を用いることで、ゲノム損傷誘導後に形成される RAD51 フォーカスは修復の「場」に集積した RAD51 が形成していることを 2000 年に初めて報告した。また、2003 年には、紫外線レーザーマイクロ照射法をより使いやすく改良した(J Microsc., 2003)。2004 年には、最新のバイオイメージング技術である生細胞実験系や転写標識法を用いて、ゲノム修復や転写調節との関連が示唆されている核内ドメイン PML ボディと酸化ストレス応答における転写調節機構の関連を明らかにし報告していた(MCB, 2004)。

2. 研究の目的

我々は、放射線被曝によるゲノム損傷誘導後の細胞核高次構造の変化、特に損傷を受けたクロマチンとゲノム修復蛋白質の動的変化を詳細に解析することが、放射線応答機構のより深い理解に結びつくと考えた。また、酵母では遺伝学的アプローチを用いた研究を進めやすいため、ゲノム修復や組換え機構の解明が進んでいる。しかし、近年酵母とヒト細胞ではゲノム修復機構に多くの異なる点が存在することが明らかになり、ヒト細胞のゲノム修復機構を解明する研究の重要性が指摘されている。この点においても、酵母と比較して細胞核が大きいため詳細な細胞生物学的解析を行うことができるヒト細胞では、放射線応答機構に関する新しい知見が得られることが期待された。そこで、本研究では、我々が開発した紫外線レーザーマイクロ照射法などの新しい細胞生物学的アプローチを用いることにより、

1) ゲノム損傷に応答して形成されるさまざまな放射線誘発核内フォーカスの構造とその動態

2) ゲノム損傷によるクロマチンの構造変化およびその構成成分の動態

に焦点を当て放射線応答における細胞核高次構造の動的構造変化の解析を行うことで、ヒト細胞の低線量と大線量放射線照射に対する放射線応答の違いを明らかにすることを旨とする。

3. 研究の方法

ヒストン H2AX は DNA 二本鎖切断誘導数分以内にリン酸化され (γ -H2AX) 核内フォーカスを形成し、ゲノム修復蛋白質を修復の「場」に保持するために重要であるとされている。そこで、Green fluorescence protein (GFP) で標識した H2AX を発現する細胞を用いて、紫外線レーザーマイクロ照射法と生細胞実験系を組み合わせることで DNA 二本鎖切断誘導直後に起こる H2AX の動態解析を行う。具体的には、紫外線レーザーマイクロ照射法を用いて核の一部に DNA 二本鎖切断を導入した直後に、Ar レーザーで DNA 二本鎖切断誘導領域とそれ以外の場所の GFP を一部線状に褪色させ、経時的に GFP シグナルの変動を定量的に解析することで、H2AX の損傷部位における動態の検討する。さらに、H2AX 動態の制御機構を明らかにするために、H2AX 複合体解析を行い、H2AX の損傷依存的蛋白質翻訳後修飾やその制御機構の解析を行う。H2AX 複合体解析から得られた知見から H2AX の動態制御に係わると考えられ

る因子について siRNA 法を用いた発現抑制実験を行い、紫外線レーザーマイクロ照射法による H2AX 動態制御へのこれらの因子の関与を検証する。

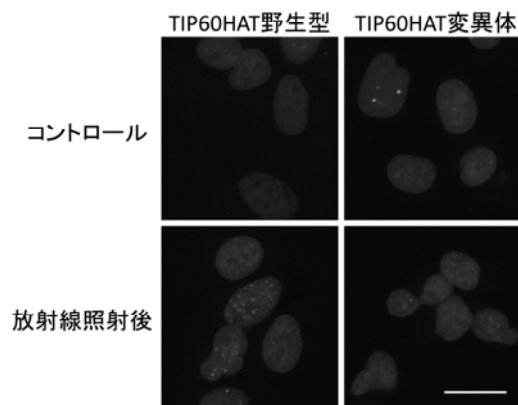
同様の解析を、RAD51 についてもを行い、代表的な放射線誘発核内フォーカスである RAD51 フォーカスの形成制御機構の解明に取り組む。

4. 研究成果

本研究で、ゲノム損傷に反応して形成されるさまざまな放射線誘発核内フォーカスの構造と動態、およびゲノム損傷によるクロマチンの構造変化に焦点を当て、ヒト細胞の放射線応答機構の解明に取り組んだ結果、RAD51がゲノム損傷領域に核内フォーカスを形成するためには、ヒストンH2AバリエーションであるヒストンH2AXのアセチル化およびユビキチン化修飾が重要であることを明らかになった。さらに、H2AXはアセチル化およびユビキチン化依存的に損傷クロマチンから放出されることを明らかにした。

一方、もうひとつのヒストンH2AバリエーションであるH2AZも、損傷クロマチンから放出されることが明らかになった。H2AXの放出に係わるユビキチン化酵素UBC13をsiRNA法により発現抑制した細胞ではH2AZの損傷クロマチンからの放出が低下することから、H2AZの動態制御にUBC13が関与することが示唆された。さらに、H2AXの放出に係わるヒストンアセチル化酵素TIP60の発現抑制実験では、H2AZの損傷クロマチンからの放出は影響されなかったことから、H2AXとH2AZは異なる分子機構により損傷クロマチンでの動態が制御されていることが示唆された。現在、これらの知見をもとに論文投稿準備中である。

放射線誘発核内フォーカスのひとつ RAD51 フォーカスの形成機構を解明するために行った RAD51 タンパク質複合体の解析では、複数の構造構築に重要であることが報告されているタンパク質が RAD51 と相互作用することが明らかになった。現在、これらのタンパク質と RAD51 との相互作用、および RAD51 核内フォーカス形成における役割を検証中である。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計10件)

1. Niida H, Katsuno Y, Sengoku M, Shimada M, Yukawa M, Ikura M, Ikura T, Kohno K, Shima H, Suzuki H, Tashiro S, Nakanishi M. Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev.* 24:333-8. 2010. 査読有
2. Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Bruma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, Komatsu K. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem Biophys Res Commun.* 380:752-757. 2009. 査読有
3. Ishiai M, Kitao H, Smogorzewska A, Tomida J, Kinomura A, Uchida E, Saberi A, Kinoshita E, Kinoshita-Kikuta E, Koike T, Tashiro S, Elledge SJ, Takata M. FANCI phosphorylation functions as a molecular switch to turn on the Fanconi anemia pathway. *Nat Struct Mol Biol.* 15(11); 1138-1146. 2008. 査読有
4. Kono K, Harano Y, Hoshino H, Kobayashi M, Bazzet-Jones D, Muto A, Igarashi K, Tashiro S. The mobility of Bach2 nuclear foci is regulated by SUMO-1 modification. *Exp Cell Res.* 314; 903-913. 2008. 査読有
5. Ikura T*, Tashiro S*, Kakino A, Shima H, Jacob N, Amunugama R, Yoder K, Izumi S, Kuraoka I, Tanaka K, Kimura H, Ikura M, Nishikubo S, Ito T, Muto A, Miyagawa K, Takeda S, Fishel R, Igarashi K, Kamiya K. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin

dynamics. Mol Cell Biol. 27; 7028-7040.
2007. (*these authors contributed equally)
査読有

6. Ono A, Kono K, Ikebe D, Muto A, Sun J,
Kobayashi M, Ueda K, Melo JV, Igarashi K and
Tashiro S. Nuclear positioning of the BACH2
gene in BCR-ABL positive leukemia cells.
Genes, Chromosomes & Cancer. 46; 67-74.
2007. 査読有

[学会発表] (計 38 件)

1. Satoshi Tashiro: Mechanism of
chromosomal translocation involving the
MLL gene. International Symposium DNA
Damage Response And Repair Mechanism.
Crete, Greece 2009. 4. 21

2. Jiyong Sun, Yukako Oma, Masahiko
Harata, Kazuteru Kono, Hiroki Shima, Aiko
Kinomura, Tsuyoshi Ikura, Shuki Mizutani,
Roland Kanaar and Satoshi Tashiro: ATM
modulates the loading of recombination
proteins onto a chromosomal translocation
breakpoint hotspot in therapy-related
leukemia. Keystone symposia on molecular
and cellular biology. Taos, USA
(2009. 2. 28-3. 5)

3. Tashiro S: ATM modulates the loading
of recombination proteins onto a
chromosomal translocation breakpoint
hotspot in therapy-related leukemia. The
3rd International Open Laboratory Workshop.
Chiba (2009. 2. 27)

4. 田代 聡: 放射線誘発核内ドメインの
ダイナミクス. 第 31 回日本分子生物学会年
会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会. 神
戸(2008. 12. 12)

5. Satoshi Tashiro: Dynamics of higher
order nuclear architecture upon DNA damage.
The 7th Japan-France Workshop on Radiation
Biology. Chiba, (2008. 10. 14-15)

6. Kazuteru Kono, Thomas Cremer,
Satoshi Tashiro: DISTRIBUTION OF
NON-CHROMATIN NUCLEAR DOMAINS IN
INTERCHROMATIN COMPARTMENT. Cold Spring
Harbor Laboratory meeting. New York, USA
(2008. 9. 18-21)

7. Jiyong SUN, Satoshi Tashiro:
Mechanism of chromosomal translocation
involving the MLL gene.
Ataxia-Telangiectasia Workshop. 大津,

(2008. 4. 22-26)

8. 田代 聡: ゲノム修復の細胞核ダイナミ
クス. 「特定領域研究」2 領域合同公開シ
ンポジウム「クロマチンシグナリングの分子
機構」. 東京, (2008. 1. 8)

[図書] (計 1 件)

Tashiro S, Cremer M, Solovei I, Cremer T.
Nuclear Architecture: Topology and
Function of Chromatin- and Non-Chromatin
Nuclear domains. Nuclear Dynamics.
(Nagata K, Takeyasu K, ed.), pp197-226,
Springer, Tokyo, 2007.

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/cellbio/Site/18ECC511-D377-11DA-83B6-000A956E89D4.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 聡 (TASHIRO SATOSHI)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
研究者番号 20243610

(2) 研究分担者

孫 継英 (Jiyong Sun)
広島大学・原爆放射線医科学研究所・助教
研究者番号: 80397926

(3) 連携研究者

()

研究者番号: