

平成 21 年 4 月 3 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19310038

研究課題名（和文）放射線誘発クロマチン損傷シグナル増幅における MDC1/53BP1 の役割

研究課題名（英文）Role of MDC1/53BP1 in amplification of radiation-induced chromatin damage signal

研究代表者

鈴木 啓司（SUZUKI KEIJI）

長崎大学大学院・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00196809

研究成果の概要：放射線の被ばくは様々な影響を成体に及ぼすが、生命の基本単位である細胞は、遺伝子の本体である DNA が放射線のエネルギーを吸収しておこる二重鎖切断を認識し、それに応答するシステムを有している。本研究は、その DNA 損傷シグナルが、DNA を含んだゲノムを基本構造であるクロマチンを構成する基本単位であるヌクレオソームの構成要素の 1 つのヒストン H2AX のリン酸化を基点とした MDC1/53BP1 複合体の形成とリン酸化の連鎖反応が、DNA 損傷シグナルの増幅に必須であることを突き止めた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2008 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
年度			
総計	10,200,000	3,060,000	13,260,000

研究分野：複合新領域

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：放射線作用機構

1. 研究開始当初の背景

放射線などによりゲノムに損傷を与えられた細胞内では、最上流にある ATM キナーゼが DNA 二重鎖切断部位で多量体から単量体へと変換し、セリン 1981 の自己リン酸化により活性化して、下流の因子をリン酸化することで DNA 損傷情報が伝達され、細胞応答が誘導されることが知られている。従来、この DNA 損傷チェックポイント経路は、DNA 二重鎖切断の再結合が終了するのにもない shut-off されると考えられてきたが、応募者が科学研究費補助金（平成 17 年度か

ら平成 18 年度、科学研究費補助金基盤研究（B）の補助を受けて展開してきたこれまで研究により、放射線照射によって誘発されるリン酸化 ATM、リン酸化ヒストン H2AX および MDC1/53BP1 の斑点状の存在形態、いわゆるフォーカスは、照射直後からその数が減少していくが、照射後 24 時間たっても残存するものがあり、このような残存フォーカスは、もはや DNA 二重鎖切断端には存在せず、再結合ミスにより生じた異常なクロマチン構造（損傷クロマチン）部位に局在することを発見した。本研究では、このような

結果から、細胞に存在する新規チェックポイントとしてクロマチン損傷チェックポイントの存在を提唱した。さらに興味深いことに、残存するフォーカスは、初期のフォーカスとはそのサイズが有意に異なり、増大したフォーカスサイズを持っていた。つまり、細胞内にはクロマチン損傷情報を増幅する巧妙なメカニズムが細胞内に存在することが予想された。

これまでの研究により、リン酸化 ATM フォーカスは MDC1/53BP1 フォーカスとその局在性が一致することがわかっている。MDC1/53BP1 の局在化にはヒストン H2AX のリン酸化が必要であることもわかっている。そこで本研究では、MDC1/53BP1 複合体がクロマチン損傷情報増幅の場を提供しているのではないかと考え、クロマチンコアヒストン蛋白質の一つである H2AX の ATM によるリン酸化を基点とした MDC1/53BP1 複合体の連鎖的リン酸化がクロマチン損傷情報を増幅するメカニズムであると仮定し、これを証明するために本研究を計画をするに至った。

2. 研究の目的

放射線照射後の細胞内で、クロマチンコアヒストン蛋白質の一つである H2AX の ATM によるリン酸化を基点とした MDC1/53BP1 複合体の連鎖的リン酸化が、クロマチン損傷情報を増幅するメカニズムであるとの仮定にもとづき、これを証明するために、以下の2点について明らかにすることを研究の目的とした。

目的の1つ目は、MDC1/53BP1 複合体がクロマチン損傷情報の増幅にかかわっていることの証明である。MDC1 あるいは 53BP1 が、リン酸化ヒストン H2AX を基点として集積することがクロマチン損傷情報の伝達にかかわっていると考えられるため、ヒストン H2AX、MDC1 あるいは 53BP1 を欠損するノックアウトマウス由来線維芽細胞において、リン酸化 ATM フォーカスのサイズ変化があるかどうかを検討する。2つ目の目的は、連鎖的リン酸化がクロマチン損傷情報の増幅に必須であることの証明である。ヒストン H2AX、MDC1 あるいは 53BP1 の ATM によるリン酸化がクロマチン損傷因子のフォーカス形成に必要であることを、ATM の特異的阻害剤を用いたタイムラプス解析により検討し、クロマチン損傷情報の増幅に連鎖的リン酸化が必須であることを証明する。

3. 研究の方法

(1) ノックダウン細胞の樹立と培養

MDC1 および 53BP1 がクロマチン損傷情報の増幅に関与することを証明するためには、これら因子を欠損する細胞を樹立して、放射線照射後のフォーカスサイズに変化が

誘導されることを明らかにする必要がある。そこで、MDC1 あるいは 53BP1 を欠損するノックアウトマウス胎児由来の線維芽細胞および野生型マウス胎児由来の線維芽細胞を樹立した。これらマウス胎児由来細胞の培養には、 α MEM 培地を用いた。細胞は、 3×10^5 個の細胞を底面積 25cm^2 の T25 型フラスコにうえ、3 日ごとに継代培養を繰り返すことにより対数増殖状態を維持した。いっぽう、げっ歯類細胞を用いた実験と平行して、ヒト細胞における検討を可能にするため、テロメラーゼ遺伝子の導入により無限増殖化した正常ヒト二倍体細胞 (BJ-hTERT ; 以降 BJ 細胞) を用いた。BJ 細胞はもともと増殖が比較的遅い細胞であるため、10%FBS を含む MEM 培地中でコロニー形成を行い、14 日後に最も大きなサイズで形成されたコロニーを単離しクローン化した。MDC1 および 53BP 遺伝子発現のノックダウンには siRNA を用いる方法を応用した。siRNA の設計および合成は、Dharmacon 社のものを持ち、10nM のオリゴヌクレオチドを 2ml の培養液に懸濁して、細胞に添加する方法を用いた。72 時間培養後に次項で述べる蛍光免疫染色法により蛋白質の発現を評価した。あるいは蛋白質を抽出しウェスタンブロット法により siRNA の効果を評価した。

(2) 放射線照射

細胞への放射線照射は、X 線発生装置による X 線照射により行った。線量率は、X 線管からの距離によって調整し、ラムテックチャンパーによって線量の測定を行った。照射は、プラスチック製の培養容器に細胞を付着させたまま、ショウ社直前に X 線発生装置に移動することによって行った。

(3) 免疫蛍光染色法

放射線照射による MDC1、53BP1 あるいは DNA 損傷チェックポイント関連因子のフォーカス形成は、特異的抗体を用いた免疫染色法により検討した。まず、火炎滅菌したカバーガラス上に 1×10^5 個の細胞を播種して 24 時間培養した。細胞の接着および増殖を確認後に 4%フォルマリン溶液を用いて細胞を固定し、ついで 0.5%Triton-X100 にて細胞膜を可溶化し、標本作製した。その後、抗リン酸化 ATM 抗体、抗 MDC1 抗体、抗 53BP1 抗体を 5%Skim milk を含む TBS 緩衝液に懸濁して細胞に反応させた。これら一次抗体は、Alexa 蛍光分子を結合させた二次抗体により検出することによって免疫蛍光染色を行った。作製した標本は、蛍光顕微鏡下で観察を行い、蛍光シグナルはデジタル画像として取得した。DNA 損傷チェックポイント関連因子のフォーカスのサイズ変化を検討する際は、画像解析システムに内蔵されているマイクロメータを用いて長径および短径を計測して平均直径を算出することに

より調べた。

(4) ATM 機能の抑制と効果の検討

ヒストン H2AX および MDC1/53BP1 複合体のリン酸化がクロマチン損傷情報の増幅にかかわっていることを証明するために、これら因子をリン酸化する ATM の活性を特異的に抑制する低分子化合物を用いた。この特異的阻害剤は KU55933 とよばれ、ATM 類縁の ATR あるいは DNA-PK 活性は阻害しない。具体的には、放射線照射 30 分前から $20 \mu\text{M}$ から $40 \mu\text{M}$ の KU55933 を細胞に処理し、前項で述べた特異的抗体によるリン酸化 ATM フォーカスおよび MDC1/53BP1 フォーカスの検出をおこなった。また、KU55933 添加後短時間での MDC1/53BP1 フォーカスのサイズ変化を追跡する必要から、タイムラプス解析を行なった。まず、BJ 細胞に EGFP タグの付いた 53BP1 発現ベクターを導入し、同発現ベクター中に設計された G418 耐性マーカーの発現を指標に EGFP-53BP1 発現クローンを単離した。EGFP 融合蛋白質の発現レベルは、X線照射後のフォーカス形成を EGFP の蛍光を指標に検出することにより確認した。ついで、これらクローンに X線照射後 KU55933 ($10 \mu\text{M}$) を処理し、照射 1 時間後までの 53BP1 フォーカスサイズの変化をタイムラプス解析した。このため、細胞を薄膜カバーガラスが底面に接着された培養ディッシュに培養し、生細胞観察装置 (BioStation ID) により、定時的に蛍光画像を取得し動画として保存していった。

4. 研究成果

(1) MDC1 および 53BP1 ノックダウン細胞における DNA 損傷情報の増幅

MDC1 あるいは 53BP1 がリン酸化ヒストン H2AX を基点として集積することがクロマチン損傷情報の伝達にかかわっているかどうかを明らかにするために、ヒストン H2AX、MDC1 あるいは 53BP1 を欠損するノックアウトマウス由来線維芽細胞において、リン酸化 ATM フォーカスのサイズ変化があるかどうかを検討した。まず、ヒストン H2AX のリン酸化がこれら DNA 損傷因子フォーカスの基点になっていることを、H2AX ノックアウトマウス由来の線維芽細胞で確認した。その結果、H2AX ノックアウトマウスでは、リン酸化 H2AX のシグナルは当然のように消失したが、MDC1 および 53BP1 のフォーカスも、完全に消失することが確認された。興味深いことに、リン酸化 ATM フォーカスの消失を検討したところ、増幅されたシグナルを示す大きなサイズのフォーカスは検出されなかったが、極微細な点状のフォーカスは残存する可能性が示された。そこで、通常の細胞の固定は 4% フォルマリンで行っていたが、固定方法をいくつかの種類検討し

たところ、メタノールを固定に用いたときに、明らかな尾西フォーカスの出現が確認された。この結果は、H2AX はフォーカス形成に必要であるがリン酸化 ATM の初期フォーカスの形成には必須ではないことを意味している。言い方を変えれば、ヒストン H2AX は ATM の DNA 損傷シグナル増幅に必須の因子であるすることができよう。

つぎに、MDC1 ノックアウトマウスにおいて DNA 損傷チェックポイント因子のフォーカス形成について検討したところ、MDC1 の発現のない細胞では、リン酸化 ATM のフォーカスが完全に消失することはないことが明らかになった。また、リン酸化 H2AX も、H2AX ノックアウト細胞と比較すると、明らかな消失は認められなかった。これらの結果は、MDC1 が放射線照射後の初期の ATM の活性化には必須ではなく、その後の DNA 損傷シグナルの増幅に必要であることを示すものであった。同様の結果は、正常ヒト BJ 細胞を用いた実験からも明らかになった。MDC1 の siRNA を導入した細胞においてリン酸化 ATM のフォーカス形成を確認したところ、明らかな消失が認められた。またこのとき同時に、53BP1 フォーカスの消失も認められた。

以上の得られた結果から、ヒストン H2AX のリン酸化を基点として MDC1/53BP1 の複合体が形成され、この MDC1/53BP1 複合体形成を介して ATM のリン酸化、すなわち DNA 損傷シグナルの増幅が行われていることが証明された。

(2) ATM 機能阻害による DNA 損傷情報増幅の抑制

放射線照射後に ATM の活性化による自己リン酸化が始まり、その活性によりヒストン H2AX がリン酸化され、さらに、リン酸化 H2AX を基点としてさらなる複合体形成が促進されリン酸化 ATM フォーカスサイズが増大することによりクロマチン損傷情報が連鎖的に増幅されるとすると、ATM の持続的リン酸化活性は、DNA 損傷情報の増幅において欠くことのできない反応ということになる。そこで、放射線照射後に ATM の活性を特異的に阻害することにより DNA 損傷チェックポイント因子のフォーカスが消失するかどうかを調べた。

まず、使用した ATM 阻害剤である KU55933 ($20 \mu\text{M}$) が、ATM の活性を完全に抑制できる条件であることを確認するために、放射線照射前に阻害剤を添加し、照射 2 時間後に細胞を固定してリン酸化 ATM フォーカスを検出した。その結果、フォーカスは完全に消失することを確認した。そこで次に、放射線照射前から阻害剤を添加し、放射線照射 30 分後あるいは 1 時間後に阻害剤を

取り除くことによってフォーカス形成にどのような影響が及ぶかを検討した。その結果、照射後に阻害剤を除くことによって、フォーカス形成およびフォーカスの増大がいずれも回復することを明らかにした。さらに、照射後から阻害剤を添加する実験を行ったところ、照射1時間後からの抑制でも、リン酸化 ATM フォーカスは消失してしまうことを見いだした。これらの結果は、DNA 損傷情報の増幅には ATM の持続的活性化が必要であることを明確に示し、また、その活性化がリン酸化と脱リン酸化のバランスによって保持されていることも明らかにしている。これらの結果は、EGFP-53BP1 を導入した細胞でも観察され、放射線照射直後の微細なフォーカスの形成から、照射数時間後のフォーカスサイズの成長まで、全ての過程に ATM の活性化が必要であることを確認した。

以上の結果により、クロマチン損傷情報の増幅は、ヒストン H2AX のリン酸化を基点とした MDC1/53BP1 複合体の形成、および活性化 ATM による MDC1/53BP1 複合体の連鎖的リン酸化に依存したプロセスであることを証明した。今後は、クロマチン高次構造の視点から、どのような構造が ATM の持続的活性化に寄与しているか明らかにする必要があるのと同時に、MDC1/53BP1 複合体の連鎖的リン酸化によってクロマチン損傷がどのように修復されていくのか、またそこに関与する因子にはどのようなものがあるかを明らかにしていくことが必須であろう。

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 11 件)

1. Yamauchi M, Oka Y, Yamamoto M, Niimura K, Uchida M, Kodama S, Watanabe M, Sekine I, Yamashita S, Suzuki K: Growth of persistent foci of DNA damage checkpoint factors is essential for amplification of G1 checkpoint signaling. 査読有, *DNA repair* 7(3): 405-417, 2008.
2. Kobayashi J, Iwabuchi K, Miyagawa K, Sonoda E, Suzuki K, Takata M, Tauchi H: Current topics in DNA double-strand break repair. 査読有, *J Radiat Res* 49(2): 93-103, 2008.
3. Naruke Y, Nakashima M, Suzuki K, Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Kondo H, Sekine I: Alteration of p53-binding protein 1 expression during skin carcinogenesis: association with genomic instability. 査読有, *Cancer Sci* 99(5): 946-951, 2008.
4. Nakashima M, Suzuki K, Meirmanov S,

Naruke Y, Matsuu-Matsuyama M, Shichijo K, Saenko V, Kondo H, Hayashi T, Ito M, Yamashita S, Sekine I: Foci formation of p53-binding protein 1 in thyroid tumors: activation of genomic instability during thyroid carcinogenesis. 査読有, *Int J Cancer* 122(5): 1082-1088, 2008.

5. Hamamoto T, Suzuki K, Yamauchi M, Kodama S, Sasaki H, Watanabe M: p53 status-dependent sensitization of human tumor cells to hyperthermia by plant flavonol. 査読有, *Int J Hyperthermia* 24(5): 415-424, 2008.

6. Nakazawa Y, Saenko V, Rogounovitch T, Suzuki K, Mitsutake N, Matsuse M, Yamashita S: Reciprocal paracrine interactions between normal human epithelial cells and mesenchymal cells protect cellular DNA from radiation-induced damage. 査読有, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 71(2): 56-577, 2008.

7. Kashino G, Prise KM, Suzuki K, Matsuda N, Kodama S, Suzuki M, Nagata K, Kinashi Y, Masunaga S, Ono K, Watanabe M: Effective suppression of bystander effects by DMSO treatment of irradiated CHO cells. 査読有, *J Radiat Res* 48(4):327-333, 2007

8. Hamamoto T, Suzuki K, Kodama S, Sasaki H, Abe K, Hayashi T, Watanabe M: Correlation of malignant phenotypes of human tumour cell lines with augmented expression of Hsp72 protein measured by laser scanning cytometry. 査読有, *Int J Hyperthermia*. 23(4):363-370, 2007

9. Mukaida N, Kodama S, Suzuki K, Oshimura M, Watanabe M: Transmission of genomic instability from a single irradiated human chromosome to the progeny of unirradiated cells. 査読有, *Radiat Res* 167(6):675-681, 2007

10. Ariyoshi K, Suzuki K, Goto M, Watanabe M, Kodama S: Increased chromosome instability and accumulation of DNA double-strand breaks in Werner syndrome cells. 査読有, *J Radiat Res* 48(3):219-231, 2007

11. Kashino G, Suzuki K, Matsuda N, Kodama S, Ono K, Watanabe M, Prise KM: Radiation induced bystander signals are independent of DNA damage and DNA repair capacity of the irradiated cells. 査読有, *Mutat Res* 619(1-2):134-138, 2007

[学会発表] (計 20 件)

1. 鈴木啓司、岡泰由、鈴木正敏、山内基弘。DNA 二重鎖切断誘発クロマチン高次構造異

常による ATM 分子活性化機構. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

2. 鈴木啓司. Living Cell Imaging による DNA 損傷応答のダイナミクス解析. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

3. 山内基弘、鈴木啓司、山下俊一. DNA 損傷チェックポイントの生物学的意義. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

4. 高橋麻衣子、鈴木啓司、山下俊一、甲斐雅亮. DNA 二重鎖切断修復の切断末端構造依存性. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

5. 石川彩、山内基弘、鈴木啓司. 放射線照射後の G2/M チェックポイント誘導に関与する DNA 損傷シグナルの定量的解析. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

6. 早田知永、岡泰由、山内基弘、鈴木啓司. 放射線照射後の G1 チェックポイント維持機構の解明. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

7. 小橋川新子、鈴木啓司、山下俊一. 放射線照射正常ヒト細胞における遅延的ストレスの増加へのミトコンドリアの関与. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

8. 成毛有紀、中島正洋、鈴木啓司、近藤久義、松山睦美、七條和子、関根一郎. 原爆被爆者皮膚組織ではゲノム不安定性が亢進している. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

9. 渡邊正己、渡邊喜美子、吉居華子、菓子野元郎、田野恵三、鈴木啓司. 低線量放射線の併用によるがん細胞の温熱致死選択的増強. 日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 19 日-21 日、北九州.

10. 鈴木啓司、山内基弘. DNA 損傷チェックポイント増幅と相同組換え修復との共役. 第 67 回日本癌学会学術総会、2008 年 10 月 28 日-30 日、名古屋.

11. 鈴木啓司、岡泰由、山内基弘. 放射線誘発ゲノム欠失によるクロマチン高次構造変化と不安定性. 第 31 回日本分子生物学会大会、2008 年 12 月 9 日-12 日、神戸.

12. 鈴木啓司、山内基弘、児玉靖司、渡邊正己. ヒト癌細胞における DNA 損傷チェックポイント異常と mitotic catastrophe の誘導. 第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3 日-5 日 横浜

13. 山内基弘、児玉靖司、渡邊正己、鈴木啓司. DNA 損傷応答因子のフォーカス成長による G1 チェックポイントシグナルの増幅. 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日-5 日 横浜

14. 渡邊正己、吉居華子、鈴木啓司、大津山彰. 四倍体化ではなく異数体化が p53 ノックアウトマウス細胞における腫瘍性を促進する. 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日-5 日 横浜

15. 菓子野元郎、鈴木啓司、鈴木実、増永慎一郎、小野公二、渡邊正己. 放射線誘発バイスタンダー効果における DNA 二重鎖切断修復機構の関与. 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日-5 日 横浜

16. 奥田平和、齋藤史路、降幡睦夫、鈴木啓司、執印太郎. 腎細胞癌における HOXB13 癌抑制遺伝子の転写標的の同定. 第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日-5 日 横浜

17. 鈴木啓司、山内基弘、児玉靖司、渡邊正己. 放射線誘発 mitotic catastrophe による細胞死の分子メカニズム. 日本放射線影響学会第 50 回大会、2007 年 11 月 14 日-17 日 千葉

18. 鈴木啓司、山内基弘. RAD51 フォーカスと ATM 経路活性化. 日本放射線影響学会第 50 回大会、2007 年 11 月 14 日-17 日 千葉

19. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己. 放射線誘発がん初期過程のジェネティクスとエピジェネティクス. 日本放射線影響学会第 50 回大会、2007 年 11 月 14 日-17 日 千葉

20. 鈴木啓司、山内基弘、児玉靖司、渡邊正己. DNA 二重鎖切断と共役した DNA 損傷チェックポイントシグナルの増幅. 第 30 回日本分子生物学会年会/第 80 回日本生化学会大会合同大会 (BMB2007)、2007 年 12 月 11 日-15 日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 啓司 (SUZUKI KEIJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：00196809