

平成21年 5月 22日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19710051

研究課題名（和文） DNA 相同組み換え修復装置の制御機構解析

研究課題名（英文） The analysis of molecular mechanisms of DNA homologous recombination repair.

研究代表者

藤本 浩子 （ FUJIMOTO HIROKO ）

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：70397553

研究成果の概要：

DNA 二本鎖切断(DSB)の DNA 相同組み換え修復に NBS1 は必須であるがその機能は未だ不明な点が多い。NBS1 を含む DNA 相同組み換え修復装置の機能解明を目指し、新規 NBS1 結合タンパク質 (X1) を同定した。X1 はクロマチンリモデリング因子として知られているが、DNA 損傷修復との関連は報告されていない。本研究より、NBS1 との結合ならびに X1 ノックダウン細胞において放射線に感受性が確認され、現在盛んに研究されている DNA 修復とクロマチン制御の機構解析につながる結果が得られた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

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：放射線生物影響・DNA 損傷修復機構

1. 研究開始当初の背景

電離放射線の生物影響には DNA 二本鎖切断 (DSB) の関与が大きいことが知られている。DSB は通常の DNA 複製時にも誘発され、わずか一カ所でも修復されないと細胞にとって致命的である。DSB の修復機構として相同的

DNA 配列を検索して組換えを行い、正確な修復が行なわれる相同組換え (HR) と DSB の両末端同士が直接再結合され塩基配列失い、突然変異の原因となりうる非相同末端結合 (NHEJ) の2つの経路が存在する。最近の研究から高等真核細胞では細胞周期の S/G2 期において HR が DSB 修復に重要であり、HR 経路

の異常が放射線感受性やゲノム不安定、高発癌性をもたらすことから HR が遺伝情報の恒常性を保つ重要な経路であると考えられる。多くの HR 因子が同定され、その経路の各段階に応じて作用する精巧な HR 修復装置として機能し、実際に HR 因子の変異は放射線感受性や家族性乳癌の原因となることが知られている。HR に関与するメカニズムや電離放射線の生物影響における意義は今後明らかにされるべき興味深い問題であり、治療の観点からも重要な意味があると考えられる。

2. 研究の目的

NBS1 は放射線感受性を示すヒト遺伝性疾患ナイミーヘン染色体不安定症候群 (NBS) の原因遺伝子で Mre11 と Rad50 タンパク質と NMR 複合体を形成する。NBS1 欠損細胞においては HR の頻度が低下していること、細胞周期チェックポイントに異常がることから DSB 修復と細胞周期チェックポイントの電離放射線応答に必須因子であると考えられる。しかし、その機能については不明である。そこで申請者は NBS1 の機能の解明を目指し、本研究は (I) NBS1 が作用する HR 修復装置の解析。(II) NBS1 が作用する新規 HR 因子の検索と機能解析を目的とする。

3. 研究の方法

- ① yeast-two-hybrid 法を用いた新規 NBS1 結合タンパク質の検索を行い、X1 を同定した。
- ② HeLa 細胞抽出液を用いて免疫沈降法にて、NBS1 と X1 の結合を確認した。
- ③ RNAi 法を用いて X1 のノックダウンを行い、western-blot 法にて X1 タンパク質の減少を確認した。
- ④ RNAi 法による X1 ノックダウン細胞の放射線感受性を colony-assay 法にて確認した。
- ⑤ HeLa 細胞に放射線照射後、NBS1 抗体と X1

抗体の免疫染色を行い、NBS1 の核内フォーカス形成と X1 の核内局在を確認した。

4. 研究成果

本研究は (I) NBS1 が作用する HR 修復装置の解析。(II) NBS1 が作用する新規 HR 因子の検索と機能解析を行った。

HeLa 細胞抽出液からの NBS1 複合体精製と yeast two-hybrid assay の結果より、① NBS1 と結合する分子 X1 を同定した。HeLa 細胞抽出液を用いた免疫沈降により細胞内で NBS1 と X1 は結合を示すことがわかった (図1)。

X1 はクロマチンリモデリング複合体の因子として報告されており、現在まで DNA 二本鎖切断 (DSB) の修復への関与は報告されていなかった。NBS1 は DNA 二本鎖切断 (DSB) 時、核内においてフォーカスを形成することが知られているので、X1 の細胞内局在を免疫染色法により調べた。

② その結果 X1 は放射線照射の有無に関わらず、核全体に染色が確認された (図2)。

③ 分子 X1 を RNAi 法によりノックダウンした細胞の放射線感受性を測定したところ、コントロール細胞と比較して放射線に感受性を示すことがわかった (図3)。

④ また X1 をノックダウンした細胞においては DNA 損傷の有無に関わらず、ヒストン H4 のアセチル化が上昇している可能性が示唆された。

⑤ さらに放射線照射による DSB 時の X1 と NBS1 の結合を免疫沈降法により解析した結果、損傷後 1 時間後に結合が増強し、4 時間後には低下することが明らかとなった。以上①から⑤に示すように本研究において新規 DSB 修復因子 X1 を同定し、損傷にตอบสนองして NBS1 との結合を増強することを明らかとした。また近年 DNA 損傷修復とクロマチンリモデリングの関係を示す報告が多く出されており、本研究の成果は非常に興味深いと考えられる。

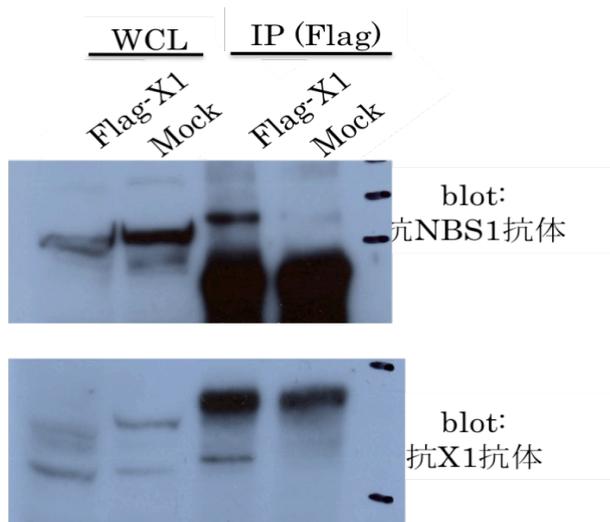


図1 免疫沈降法によるNBS1とX1の結合。

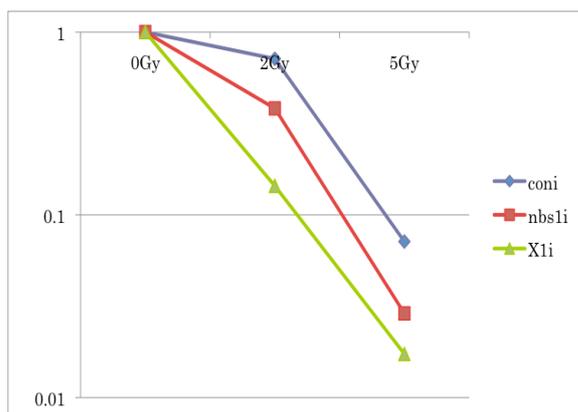


図2 NBS1ノックダウン細胞とX1ノックダウン細胞の放射線感受性。

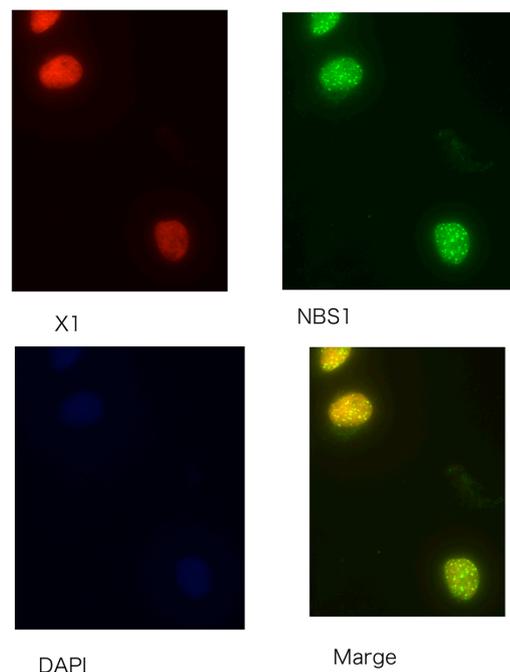


図3 放射線照射後のNBS1とX1の細胞内局在。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

①「NBS1のアルキル化剤によるDNA損傷修復における役割」
日本放射線影響学会2008年(北九州)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤本浩子 (FUJIMOTO HIROKO)
京都大学・放射線生物研究センター・研究員
研究者番号：0397553