

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08117

研究課題名（和文）放射線被ばくによるがん化リスクを抑制する分子機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of molecular mechanisms that suppress the risk of radiation-induced cancer

研究代表者

齋藤 陽平（Saito, Yohei）

東北医科薬科大学・薬学部・講師

研究者番号：10613698

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）：放射線被ばくによるがん化リスクに関して、放射線によるDNA損傷後に伴うがん遺伝子としても知られるシチジンデアミナーゼAPOBEC3Bの放射線照射による突然変異への影響を調べることを目的とし、APOBEC3Bが放射線照射によるDNA損傷後どのように二次的にDNA損傷を誘発するかを細胞内動態及び相互作用解析から明らかにしようと研究を進め、核質に存在するAPOBEC3BがDNA損傷後に核マトリクスなどの相互作用タンパク質の変化に伴い、DNA損傷部位付近に移行することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くのがん細胞においてAPOBEC3Bによる変異蓄積は、がんの多様性の大きな原因となるため、APOBEC3Bの機能解析の結果は放射線被ばくによるがん化リスクに関してだけでなく広くがん研究に役立つ。APOBEC3Bの核内保持や核内移行に核マトリクスが関与することは、APOBEC3Bの機能抑制だけでなくAPOBEC3Bの未知の機能にも影響を与えている可能性があり、なぜAPOBEC3Bが核内に留まり続けるのかを解明する鍵となりうる。また、様々な核機能において足場を提供する核マトリクスの機能性の解析の必要性を提起した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to investigate the effect of APOBEC3B, a cytidine deaminase also known as an oncogene, on post-irradiation mutation after radiation-induced DNA damage. We found that APOBEC3B, which exists in the nucleoplasm, migrates to the vicinity of the DNA damage site after DNA damage due to changes in the nuclear matrix and other interacting proteins.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線 APOBEC3 DNA損傷 核マトリクス

1. 研究開始当初の背景

放射線の生体・環境への影響に対する社会的関心、今日の医療の発達による医療放射線量の増加と医療従事者の職業被ばく量増加、さらに放射線量の多い作業環境での活動や防護の問題など、放射線被ばくのさらなるリスク評価やリスクの低減が求められている。放射線被ばくによるがん化リスクは、主としてDNA損傷に基づく突然変異による。この突然変異は、物理化学的な直接的なDNA損傷だけではなく、DNA損傷修復機構の活性化や抑制、また二次的なDNA損傷によっても影響される。Apolipoprotein B mRNA-editing catalytic subunit 3 (APOBEC3)は、シチジンデアミナーゼの一つであり、ウイルスに対する防御に寄与するだけでなく、複数のがん種において潜在的な変異源となりうるということが知られている。特にAPOBEC3A及びAPOBEC3B(A3B)がヒトのがんにおいて重要な役割を担うことが示され、A3BはAPOBEC familyの中で恒常的に核内に存在するため、核内でのA3Bの存在は恒常的な突然変異誘発のリスクを高める。A3Bは、ゲノムの突然変異を蓄積させゲノムの不安定性を引き起こすが、A3Bは放射線照射により発現誘導されるだけではなく、照射によるDNA損傷応答にも影響する。

2. 研究の目的

A3Bは一本鎖ポリヌクレオチドと結合能を有し、RNAを含むRNA結合タンパク質(RBP)と複合体を形成することで機能抑制されていると考えられているが、DNA損傷応答における相互作用変化はあまりわかっていない。本研究は、照射後の突然変異形成過程におけるA3Bの作用機序の解明を目指し、放射線被ばくによるがん化リスクを増強させるA3Bの作用機序を明らかにすることでがん化リスクの抑制につながる分子機構を探る。A3B発現細胞やA3B KO細胞を用い、DNA損傷応答時における細胞内動態及び相互作用分子の同定・機能解析を行った。

3. 研究の方法

- (1) HepG2細胞及びA3B KO HepG2細胞に対し、薬剤誘導発現 Tet on systemを用いてA3Bを導入した細胞を作製し、A3Bを薬剤により誘導後、共焦点顕微鏡を用いてDNA二本鎖切断部位やA3Bの局在の観察を行なった。またA3B発現細胞はDouble thymidine blockを行い細胞周期を停止させた後、生細胞にHoechst 33342を添加し細胞周期の確認を行なった。
- (2) 放射線照射、薬剤によるDNA損傷誘導またはDNA合成阻害やRNA合成阻害を行い、A3Bの局在変化及びAldehyde Reactive Probe (ARP)を用いたAP siteの染色を超解像度共焦点顕微鏡を用いて観察した。また、(3)のDIA解析で検出された定量値上位のタンパク質との共局在も観察した。
- (3) 共免疫沈降のため、A3B-FLAG tagやtandem tagを発現させた細胞も作製したが、免疫沈降での回収率が低いため、A3B-AcGFPをターゲットに変更し、放射線照射や薬剤投与を行った細胞溶解液にVHH抗体を用いて共免疫沈降を行なった。共沈タンパク質はLC-MS、DIA解析を行いPrecursor FDRとProtein FDRがともに1%以下となるタンパク質の同定ならびに定量値の算出を行なった。データはSTRING及びcytoscapeを用いて作図した。

4. 研究成果

(1) A3Bと相互作用するタンパク質によるA3Bによる遺伝子突然変異への影響を調べるため、A3B KO細胞に薬剤誘導によりA3Bを発現する細胞を作成し、DNA損傷への影響及び細胞周期への影響を調べた。Doxycycline投与によるA3Bの高発現の結果、DNA二本鎖切断の増加と多くの細胞に核の増大が観察され、増殖死に至る細胞が増加した。また、A3Bを低レベルで恒常的に発現させた細胞でも、細胞周期の遅延が見られた。これらの細胞を用いた突然変異の評価系の作成を目指したが、特にA3B KO細胞にA3Bを再導入すると細胞死が多く、早期の解決は断念し、発現系の見直しを検討した。

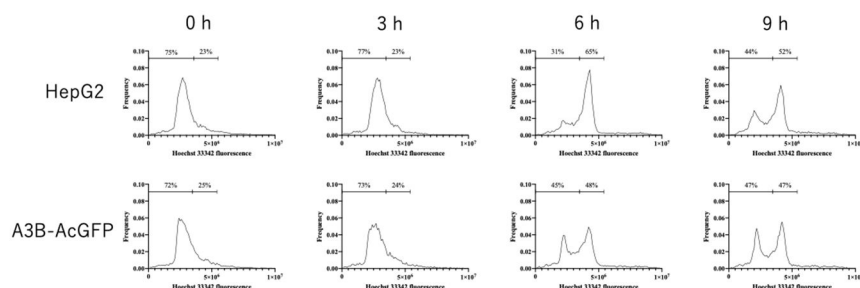


図1. Double Thymidine block後のA3B発現細胞の細胞周期の遅延

(2) A3B は核に存在し、RBP と相互作用し複合体を形成することが報告されているが、複合体の機能や A3B の機能への影響はよくわかっていない。本研究では、核を分画し A3B が核マトリクスを含む不溶性画分に多く存在すること、放射線照射や薬剤による DNA 損傷誘発後に A3B が局在変化することを明らかにした。また A3B は、DNA 損傷応答において二本鎖切断部位ではなく、AP site を認識する ARP と共同在することから、AP site 付近に集積する可能性があることを示した。A3B の核マトリクスへの保持には RNA が関与していたが、この AP site への集積は RNase A ではなく、RNase H や DNase I によって消失することから、R-loop に A3B を含む複合体が結合していることが示唆された。DNA の組替え修復には核内アクチンが関与することが報告されているが、DNA 損傷応答によるアクチンファイバーの形成部位と A3B の集積部位は異なり、またアクチンファイバーの形成阻害を行っても A3B は集積するが、集積にはエネルギーが必要とすることを確認した。

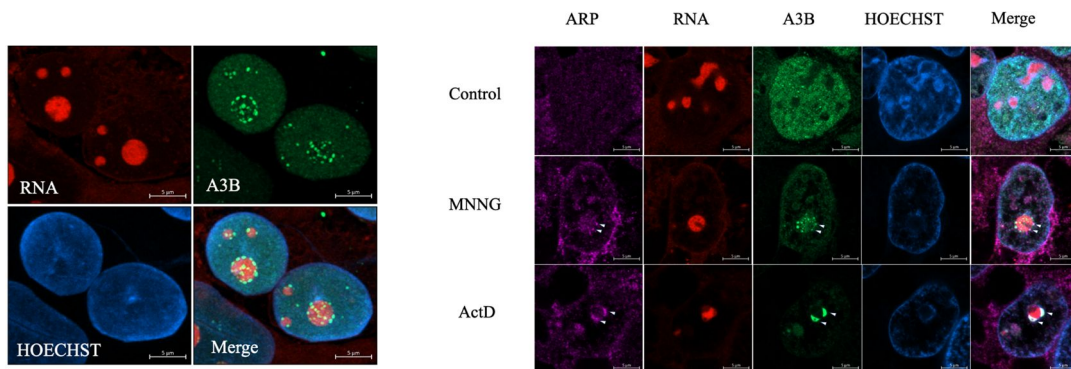


図2. 薬物投与後の A3B の核小体近傍への集積 (MIB)

図3. 薬物投与後の A3B の集積と AP site

(3) 放射線照射や薬剤投与後の A3B の相互作用タンパク質の探索・同定を行うため、A3B-tandem-tag を発現する細胞を作製した。A3B を免疫沈降するため、細胞を共免疫沈降条件下で可溶化しようとしたが、核マトリクスと共に多くの A3B が不溶性画分に移行した。RNase A を添加することで A3B-tandem-tag は可溶化できたが、A3B の核質保持に RNA が関与しているため、易溶性の A3B-AcGFP を RNase A 非存在下で用いて AcGFP を対照とし免疫沈降を行い、DIA プロテオーム解析を行った。超解像度共焦点顕微鏡による観察から、A3B は DNA 損傷応答時に核内で局在が変化したため、この局在変化が A3B と結合する RBP を含む核マトリクスの変化や核マトリクスからの解離の結果、また A3B の集積が別にコンパートメントへの移行の結果によるかなどを確認することを目的とした。先行研究から A3B は、RBP と相互作用することが報告されていたが、本研究ではこれらに加えて細胞骨格系タンパク質を含む核マトリクスタンパク質が有意に検出された。これらは、DNA 損傷応答時に検出量が大幅に減少する一方で RBP や DNA 修復タンパク質の検出量が増大した。解析により検出された定量値の多いタンパク質について A3B との共同在の有無を確認するため、免疫染色後共焦点顕微鏡での観察を行なった。これらの結果は、A3B を含む複合体が DNA 損傷応答に応じた核マトリクスの変化に伴い、DNA の損傷部位付近に部分的に集積することを示した。

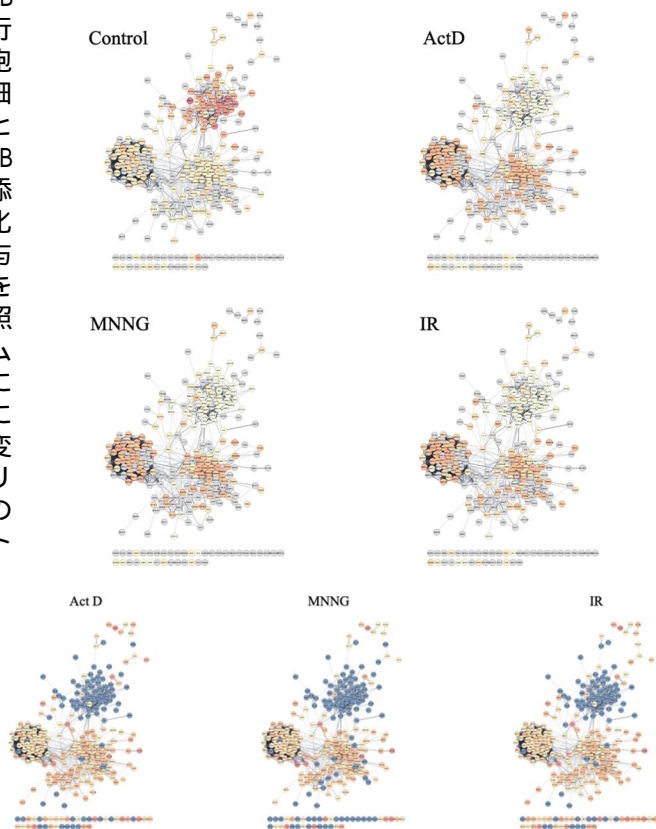


図4. 薬物投与後の A3B 相互作用タンパク質の定量値 (上) 及び変化量 (下)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 3件）

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 齋藤陽平, 山本由美, 山本文彦
2. 発表標題 DNA損傷後のAPOBEC3Bの核内局在変化の解析
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤陽平, 齊藤百花, 福嶋恵莉奈, 山本由美, 山本文彦
2. 発表標題 DNA損傷後のAPOBEC3Bの細胞内局在変化の解析
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 齋藤陽平, 今野里香, 福嶋恵莉奈, 山本由美, 山本文彦
2. 発表標題 DNA損傷後のAPOBEC3Bの細胞内局在の解析
3. 学会等名 日本薬学会第142年会, 名古屋（オンライン開催）
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------