

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月18日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21310034

研究課題名（和文） DNA 損傷による中心体異常の機構解明

研究課題名（英文） Mechanisms of Centrosome Aberrations Induced by DNA damage

研究代表者

宮川 清（MIYAGAWA KIYOSHI）

東京大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40200133

研究成果の概要（和文）：中心体数の安定な維持は、染色体の正確な分配に必須であるが、放射線はこの異常をもたらす。この機序を解明するために、DNA 損傷応答機構の中心体への関与を検討した。その結果、相同組換え修復機能が低下する場合には、ATR から Chk1 を介する情報伝達経路が活性化されることが中心体数増加の原因となることが判明した。中心体数増加はがんで高頻度に観察されるが、がん精巣抗原の一つである SYCE2 が発現した場合には ATM が関与することも明らかとなった。また、相同組換え修復機能の低下時には、中心体とは別の経路で染色体の異数性が誘導されることも判明し、この状況では複数の経路が染色体の安定性を制御していることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Maintenance of centrosome numbers is required for correct chromosome segregation, and radiation induces its aberrations. In order to understand their mechanisms, we investigated roles of the DNA damage response in maintenance of centrosome integrity. We found that activation of the signaling pathway mediated by ATR and Chk1 causes supernumerary centrosomes when homologous recombination repair is inhibited. Supernumerary centrosomes are frequently observed in cancer. We also found that activation of ATM is involved in centrosome aberrations when SYCE2, a cancer testis antigen, is expressed. Additionally, aneuploidy is induced by centrosome-independent mechanisms in cells defective in homologous recombination repair, indicating that multiple pathways are involved in regulation of chromosome integrity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：医学

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：DNA 損傷、中心体、相同組換え、染色体不安定性、放射線発がん

1. 研究開始当初の背景

100 年以上も前にドイツの Theodor

Boveri が提唱した中心体の数的異常ががんの原因となる仮説は、近年になって再評価さ

れるようになったが、それまで1世紀近くこの仮説は忘れ去られていた。ゲノム変異だけではすべてのがんが説明できないことが明らかになり、遺伝子の変異によらない量的異常が注目されるようになったことがその大きな理由である。その量的異常の一つとして染色体の数的異常である異数体があり、異数体の原因として中心体異常が注目されるようになった。生命科学において中心体研究は国際的に見て発展期にあり、中心体に存在する約100種類の蛋白質が同定され、その一部の異常で中心体の異常がおこることも証明されている。

このような生命科学における中心体研究の発展期と比べて、放射線生物学における中心体研究はまだ誕生期と言ってもよいくらい未熟である。放射線により中心体の数的異常がおこることは比較的よく知られているが、その分子機構となるとほとんど未知と言ってよい。一方、放射線影響研究においては、依然としてなぜ放射線被ばくから長時間を経過して晩発障害が発生するのかについて確立した説がない。このような状況において、本研究者はジーン・ターゲティングにより自ら作製した相同組換え修復異常を有するヒト細胞において中心体の数的異常と異数体が増加することを観察し、その放射線影響における生物学的意義に着目してきた。

放射線影響研究における相同組換え修復の意義は、複雑な放射線の生体に対する作用の中で、最も重篤なDNA損傷の一つを単純化した形で相同組換え修復異常が誘発することである。それゆえに、複雑な作用をそのまま解析したのではわからない現象も、その一部を取り出した形で単純化した実験モデルを作製することによって、初めて解明のヒントが得られる可能性がある。このような理由により、本研究者は放射線の晩発影響の機構を解明するために相同組換え修復異常による中心体異常の機構解明の着想に至った。したがって、国内外の放射線影響研究における中心体研究はいまだに誕生期であり、本研究はこの分野の発展に大きく寄与する可能性を有していると考えられる。

2. 研究の目的

放射線は細胞分裂に必須である微小管を制御する中心体の異常をもたらす。これにより細胞は死に至るか、あるいは染色体の数的異常である異数体を形成する。前者は放射線の急性障害の本態であり、後者は異常な染色体情報を次世代細胞に伝播することによって晩発障害の発現に寄与する可能性が想定される。したがって、放射線による中心体異常誘発の分子機構を解明することは、放射線の人体影響の機構解明に大きく寄与するものである。しかしながら、生物学一般におい

て中心体の存在は古くから知られていたにもかかわらず、その異常の意義については長い期間忘れ去られていた。このような中心体異常がにわかに注目されるようになったのは、がんの発生が必ずしもゲノムの変異だけでは説明がつかず、場合によっては遺伝子の量的効果をもたらす異数体が原因となるがんも存在することが提唱されてからである。様々な原因によって異数体は生成されるが、その一つに中心体の数的異常が想定されている。このように、中心体生物学は今世紀に入ってから生命科学の一つのトピックスであるが、放射線がどのように中心体の異常をもたらすのかは解明されていない。そこで本研究では、放射線による中心体異常の一部を反映すると考えられるDNA二重鎖切断による中心体異常の分子機構を解析することによって、DNA損傷から中心体異常に至る情報伝達経路を明らかにすることを目的とする。このような研究によって、放射線の急性障害と晩発障害に共通する初期の分子機構が解明されることが期待され、ひいてはこの成果は放射線の人体影響の診断や治療の開発の基盤となることが期待される。

3. 研究の方法

(1) 中心体異常

中心体に存在する蛋白質である γ -tubulinに対する抗体を用いて、蛍光免疫によって、中心体を可視化する。通常は、1つないしは2つの中心体が存在するが、3つ以上存在する場合を異常とする。

(2) DNA損傷応答経路の影響

DNA損傷のセンサーとしての役割を有するATMとATRは、DNA損傷応答経路の最も上流に存在する分子であるため、中心体異常が観察された場合、DNA損傷応答経路の関与を検討するために、ATMとATRの各々のsiRNAを用いてノックダウン細胞を作製する。また、ATM単独の作用を見る場合には、ATM阻害剤であるKU55933を10 μ Mの濃度で細胞に暴露させる。これらの分子の影響が観察された場合には、その下流に存在するChk1とChk2の影響を検討するために、これらの阻害剤であるUCN-01を100nMの濃度で細胞に暴露させる。

(3) 染色体数的異常

染色体の特定の部位にハイブリダイズする蛍光プローブを用いたFISH法によって、特定の染色体の1細胞あたりの数を計数する。正常では2つの染色体が存在するが、2つ以外の染色体数を有するものを異数体とする。

4. 研究成果

(1) RAD51Cの中心体への影響

放射線を代表とする DNA 損傷の結果として生じる中心体異常による染色体異常の機序を解明するために、一つのモデルとして、自発的にこのような異常を呈する RAD51C 変異細胞を用いて解析を行なった。RAD51C 変異細胞では中心体数の増加と染色体の異数体の増加が観察される。この異常が DNA 損傷の存在が直接的原因となって起こるのか否かを理解するために、DNA 損傷のセンサーとしての役割を果たす ATM と ATR の機能を RNA 干渉によって低下させて検討した。その結果、ATR の機能低下時にのみ RAD51C 変異細胞で増加した中心体異常が軽減した。その次に、ATR のリン酸化の標的である Chk1 と Chk2 の関与をこれらの阻害剤処理ならびに RNA 干渉によって検討した。その結果、Chk1 の抑制によって中心体異常は軽減した。さらに、Chk1 の中心体機能への直接的な関与を調べるために、二重免疫染色によって Chk1 と中心体の場所的な関係を検討した。その結果、ハイドロキシウレアによる DNA 複製阻害時に Chk1 は中心体と共局在する傾向があり、特に RAD51C 変異細胞ではその傾向が増強された。一方で、同様に細胞周期の抑制に関与する Chk2 は、このような動きをとらなかった。以上の結果より、DNA 複製の異常に起因する DNA 損傷が存在する場合には、ATR-Chk1 の経路が活性化し、活性化された Chk1 が中心体に移動することによって、中心体数の増加がおこることが示唆された。このように、相同組換えに重要な役割を果たす RAD51C の機能が低下した場合の中心体異常の生成に、DNA 損傷に応答する情報伝達経路が寄与していることが明らかとなった。

(2) SYCE2 の中心体への影響

相同組換え修復においては RAD51 を中心とする分子群が重要な役割を担うことが知られているが、中心体の異常による発がんの可能性について考察する場合、RAD51 の周辺分子の異常によるがんは BRCA1 と BRCA2 の変異による遺伝性乳がんや卵巣がんのみが知られているに過ぎない。DNA 損傷による中心体の異常と発がんとの関連性を明らかにするために、体細胞ではがんのみに特異的に発現する減数分裂期の分子の、DNA 損傷応答経路と中心体への影響を検討した。

SYCE2 は減数分裂期に形成される相同組換えに重要なシナプトネマ複合体の構成分子であるが、造血器腫瘍や乳がんなどで異所性に発現することを我々は見出した。この SYCE2 を正常上皮細胞に外来性に発現させたところ、放射線やシスプラチンに対する抵抗性ととも中心体の数の増加が認められた。また、染色体の異数性も SYCE2 発現細胞において増加がみられた。一方、SYCE2 の発現によって DNA 損傷のセンサーである ATM や γH2AX

の活性が亢進することも判明した。

中心体増加に対する DNA 損傷応答経路の関与を検討するために、ATM 阻害剤を添加したところ、増加していた中心体の数は低下した。この結果は、がんで見られる遺伝子の発現異常の中でも、SYCE2 が発現した場合には、内因性の DNA 損傷が増加し、ATM を介する情報伝達経路を活性化することによって中心体の数の増加をもたらすことを示唆するものであり、これはがんの進展の一つの機序と考えられる。

(3) RAD52 と RAD54B による染色体安定性維持

RAD51 に依存する相同組換え修復分子の機能低下によって中心体数が増加することを明らかにしたために、この研究を拡大して、同じ相同組換え修復に補助的な役割を果たす RAD52 と RAD54B の機能低下による染色体不安定性の誘導について検討した。その結果、これらのノックアウト細胞において、染色体の異数性の増加は確認されたが、中心体の関与については明確な結論が得られなかった。そこで、RAD54B については、結合する蛋白質の解析を行い、細胞分裂の進行に重要な役割を果たす APC/C と複合体を形成することが判明した。この結果より、相同組換え修復による染色体不安定性の誘導においては、中心体の関与の他に、細胞分裂の進行に影響を及ぼす機序が存在することが示唆された。

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 6 件)

- ① Enomoto A, Kido N, Ito M, Takamatsu N, Miyagawa K: Serine-Threonine Kinase 38 is regulated by Glycogen Synthase Kinase-3 and modulates oxidative stress-induced cell death. *Free Radical Biol Med* 52:507-515, 2012 査読有
DOI:10.1016/j.freeradbiomed.2011.11.006
- ② Takaku M, Takahashi D, Machida S, Ueno H, Hosoya N, Ikawa S, Miyagawa K, Shibata T, Kurumizaka H: Single-stranded DNA catenation mediated by human EVL and a type I topoisomerase. *Nucleic Acids Res* 38:7579-7586, 2010 査読有
DOI: 10.1093/nar/gkq630
- ③ Zhan H, Suzuki T, Aizawa K, Miyagawa K, Nagai R: Ataxia telangiectasia mutated

(ATM)-mediated DNA damage response in oxidative stress-induced vascular endothelial cell senescence. *J Biol Chem* 285:29662-29670, 2010 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M110.125138

- ④ Katsura M, Tsuruga T, Date O, Yoshihara T, Ishida M, Tomoda Y, Okajima M, Takaku M, Kurumizaka H, Kinomura A, Mishima HK, Miyagawa K: The ATR-Chk1 pathway plays a role in the generation of centrosome aberrations induced by Rad51C dysfunction. *Nucleic Acids Res* 37:3959-3968, 2009 査読有
DOI: 10.1093/nar/gkp262
- ⑤ Takaku M, Machida S, Hosoya N, Nakayama S, Takizawa Y, Sakane I, Shibata T, Miyagawa K, Kurumizaka H: Recombination activator function of the novel RAD51- and RAD51B-binding protein, human EVL. *J Biol Chem* 22:14326-14336, 2009 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M807715200
- ⑥ Tomoda Y, Katsura M, Okajima M, Hosoya N, Kohno N, Miyagawa K: Functional evidence for Emel as a marker of cisplatin resistance. *Int J Cancer* 124:2997-3001, 2009 査読有
DOI: 10.1002/ijc.24268

[学会発表] (計 10 件)

- ① Hosoya N, Miyagawa K: The synaptonemal complex protein SYCE2 induces chromosome instability in mitotic cells through activation of the ataxia-telangiectasia-mutated kinase. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- ② Katsura M, Aihara M, Yamagishi R, Shimazawa M, Hara H, Miyagawa K, Araie M: 53BP1 nuclear foci are reduced by hypoxia in neural cells. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横浜市)
- ③ Yasuhara T, Miyagawa K: Rad54B controls Numb tumor suppressor function by interacting with LNX1. 第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県、横

浜市)

- ④ Miyagawa K: Health effects of DNA damage. 2011 Kyoto University International Forum "Towards a New Synthesis of Knowledge", 2011 年 10 月 16 日、京都大学百周年記念ホール (京都府 京都市)
- ⑤ Hosoya N, Miyagawa K: The synaptonemal complex protein SYCE2 induces chromosome instability through activation of ATM in cancer. 第 70 回日本癌学会学術総会、2011 年 10 月 4 日、名古屋国際会議場 (愛知県 名古屋市)
- ⑥ Miyagawa K: The DNA-dependent ATPase RAD54B maintains complex nuclear functions. 第 33 回日本分子生物学会年回、2010 年 12 月 10 日、神戸ポートアイランド (兵庫県 神戸市)
- ⑦ Miyagawa K: Involvement of multiple pathways in the generation of aneuploidy caused by defective homologous recombination. 26th Radiation Biology Center International Symposium、2010 年 10 月 22 日、京都テルサ (京都府 京都市)
- ⑧ 宮川 清: DNA 損傷修復の核ダイナミクス. 日本放射線影響学会第 52 回大会. 2009 年 11 月 11 日、広島市南区民文化センター (広島県 広島市)
- ⑨ Katsura M, Tomoda Y, Miyagawa K: The ATR-Chk1 pathway plays a role in the generation of centrosome aberrations induced by Rad51C dysfunction. 第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜 (神奈川県 横浜市)
- ⑩ Miyagawa K, Hosoya N: Disruption of the RAD52 gene results in increased radiosensitivity and aneuploidy in human cells. The 11th International Wolfsberg Meeting on Molecular Radiation Biology/Oncology, 2009 年 6 月 27 日、Wolfsberg Castle Conference Center (Ermatingen, Switzerland)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮川 清 (MIYAGAWA KIYOSHI)
東京大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：40200133

(2) 研究分担者

無

(3) 連携研究者

無