

## 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 3 月 8 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21710061

研究課題名（和文）：Foci on FISH 法を用いた染色体転座による ATM 持続的活性化の証明

研究課題名（英文）：Demonstration of persistent activation of ATM on translocated chromosomes by Foci on FISH method.

研究代表者

山内 基弘 (YAMAUCHI MOTOHIRO)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：60437910

研究成果の概要（和文）：

リン酸化ヒストン H2AX の蛍光免疫染色と染色体 FISH を組み合わせた Foci on FISH 法を確立し、染色体転座の一種である二動原体染色体上で H2AX のリン酸化が起こっていること、すなわち ATM 蛋白質の持続的活性化が起こっていることを証明した。

さらに ATM が p53 依存的な細胞周期チェックポイントおよび DNA-PK 依存的な DNA 二重鎖切断修復経路を介して放射線照射後の染色体転座の頻度を抑制していることを解明した。

研究成果の概要（英文）：

I established "Foci on FISH" method, which combines immunofluorescence staining of phosphorylated histone H2AX and fluorescence *in situ* hybridization (FISH) of chromosomes. Using this technique, I demonstrated that H2AX phosphorylation, which indicates ATM activation, persists on dicentric chromosomes, a kind of chromosome translocation. Moreover, the present study revealed that ATM suppresses frequency of ionizing radiation-induced chromosome translocation via p53-dependent cell cycle checkpoint and DNA-PK-dependent DNA double-strand break repair pathway.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：応答、ATM

## 1. 研究開始当初の背景

ATM 蛋白質は、細胞に放射線を照射することによりリン酸化酵素として活性化し、細胞周期チェックポイントや DNA 修復にかかわる多数の因子をリン酸化する、放射線応答における中心的な因子である。ATM は長らく放射線照射により生じる DNA 二重鎖切断に

2003年に Bakkenist と Kastan により ATM の活性化機構が報告され、DNA 二重鎖切断を伴わないクロマチンの高次構造変化によっても活性化することが明らかになった。一方、研究代表者は本補助金の申請前に、ATM リン酸化酵素活性の阻害剤を細胞に処理すると染色体転座頻度が顕著に上昇するという結果を得ていた。染色体転座は異なる 2 本

の染色体にできた DNA 二重鎖切断が誤って修復された結果、生成される染色体異常である。2本の染色体における DNA 二重鎖切断周辺のクロマチン構造は当然異なるはずであり、両者が結合すれば元とは異なるクロマチン構造になるはずである。そこで研究開始当初は、「染色体転座の融合部位ではクロマチン構造変化が起こっており、ATM はその構造変化を認識して DNA 二重鎖切断再結合後も持続的に活性化している」という仮説を立て、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

ヒストン H2A のサブタイプの一つである H2AX は、活性化した ATM によりセリン 139 にリン酸化を受ける。このリン酸化 H2AX は特異的抗体を用いた蛍光免疫染色法により顕微鏡下で斑点状の「フォーカス」として可視化できる。このリン酸化 H2AX フォーカスは  $\gamma$  線照射後に細胞核内において観察されることから  $\gamma$ -H2AX とも呼ばれている。 $\gamma$ -H2A フォーカスは一般的には DNA 二重鎖切断部位でのみ形成されると考えられている。そこで本研究ではこの  $\gamma$ -H2AX を ATM の活性化の指標として用いることとした。本研究の目的は「染色体転座の融合部位における ATM の持続的活性化の証明」であるが、これを達成するためには、FISH で検出した転座染色体上で  $\gamma$ -H2AX フォーカスを検出する必要がある。しかしながらこれは、染色体を展開する時に必要な酢酸を含む固定液が  $\gamma$ -H2AX のシグナルを消滅させてしまうため、従来は不可能であった。そこで本研究では  $\gamma$ -H2AX フォーカスの蛍光免疫染色と染色体 FISH を組み合わせた手法 (Foci on FISH 法) を確立し、転座染色体上における ATM の持続的活性化を証明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

Foci on FISH 法の確立のためには、 $\gamma$ -H2AX フォーカスのシグナルを酢酸耐性にする必要があった。そこで本研究では、酢酸を含む固定液で染色体を展開する前に、 $\gamma$ -H2AX シグナルを「チラミドシグナル」に変換するという手法をとった。この「チラミドシグナル増幅法」は、2次抗体に結合したホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) に過酸化水素存在下でビオチン化チラミドを作用させると、ビオチン化チラミドラジカルに変換され、このラジカルが2次抗体近傍の蛋白質のチロシン残基に結合するという原理に基づいている。このビオチン化チラミド/チロシン複合体は酢酸耐性であり、酢酸含有固定液で染色体を展開し、FISH を行った後に、蛍光標識したストレプトアビジンを作用させることにより転座染色体上で  $\gamma$ -H2AX フ

ォーカスを検出した。

## 4. 研究成果

図1に Foci on FISH 法により検出した、染色体上に形成されている  $\gamma$ -H2AX フォーカスの画像を示す。図1ではセントロメア (動原体) / テロメア FISH で染めた染色体上で  $\gamma$ -H2AX フォーカスを検出している。本実験は接触障害により細胞周期を G0/G1 期に同調した正常ヒト二倍体線維芽細胞に 4 Gy の  $\gamma$  線を照射後すぐに細胞周期の同調を解除し、40 時間後に現れた分裂期染色体を解析している。

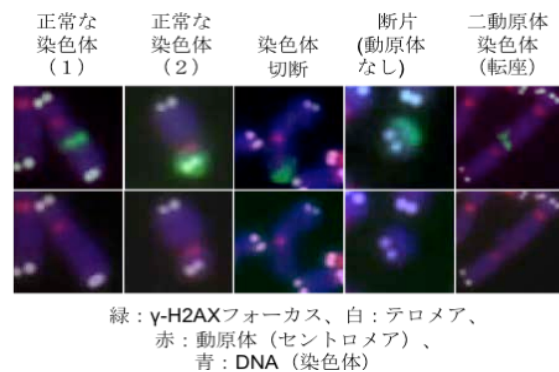


図1 Foci on FISH 法により検出した、様々な正常あるいは異常染色体上における  $\gamma$ -H2AX フォーカス

セントロメア/テロメア FISH で染めた染色体は正常であれば、両末端に2個ずつテロメアシグナルを持ち、さらに両末端のテロメアにはさまれる形で1個のセントロメアシグナルを持つ (図1; 正常な染色体 (1) (2))。放射線照射により生じた DNA 二重鎖切断が修復されないまま残ると、セントロメアを持っているものの、片方あるいは両方の末端のテロメアシグナルを失った「染色体切断」、とセントロメアを持たない「断片」が生じる (図1; 「染色体切断」および「断片 (動原体なし)」)。また染色体転座のように2本の染色体に生じた DNA 二重鎖切断同士で誤った修復が行われると、セントロメアを二つ持つ「二動原体染色体」が生じる (図1、一番右)。 $\gamma$ -H2AX フォーカスは一般的には DNA 二重鎖切断部位でのみ形成されると考えられている。しかしながら図1の実験の結果、驚くべきことに DNA 二重鎖切断を示す「染色体切断」と「断片」のみならず、すでに DNA 二重鎖切断の再結合は完了しているはずの一見正常な染色体や二動原体染色体上においても、 $\gamma$ -H2AX フォーカスが形成されることが分かった。検出された  $\gamma$ -H2AX フォーカスがどのような染色体上に形成されていたかを調べた結果を図2に示す。

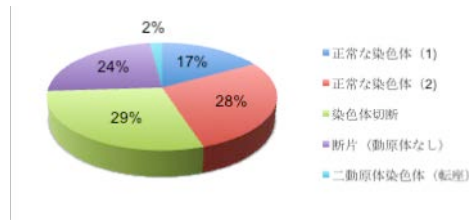


図2 γ-H2AX フォーカスを持つ染色体のスペクトラム

4 Gy 照射 40 時間後の M 期染色体上に検出された γ-H2AX フォーカスのうち、53%は染色体切断や断片など、DNA 二重鎖切断を示す異常染色体上に形成されていたが、残りの 47%は一見正常な染色体および二動原体染色体上に形成されていた。これは現在一般的に信じられている、「γ-H2AX フォーカス = DNA 二重鎖切断」というパラダイムとは一致していない。さらに転座の一種である、二動原体染色体上で γ-H2AX フォーカスが検出されたという結果は、本研究の仮説である、「染色体転座の融合部位における ATM の持続的活性化」を支持するものである。

図 1、2 の実験から転座染色体上では ATM の活性化が持続しうることが分かった。染色体転座に反応して ATM が活性化して細胞周期チェックポイントを誘導しているならば、ATM のリン酸化酵素活性を阻害した時には、分裂期に進行してくる転座陽性の細胞が増加するはずである。そこで ATM 阻害剤の転座頻度に対する影響を調べた (図 3)。

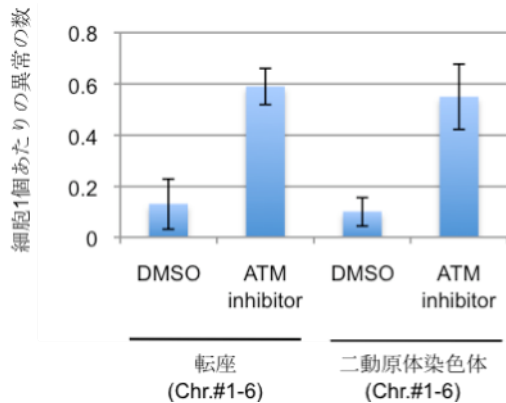


図3 ATM 阻害による転座頻度の増加

その結果、ATM 阻害剤処理により、2 Gy γ 線照射後の転座および二動原体染色体の頻度は顕著に上昇した。

ATM には細胞周期チェックポイント誘導および DNA 二重鎖切断修復の 2 つの役割があるが、ATM のチェックポイント誘導能の転座頻度抑制における役割を調べるため、ATM の G1 チェックポイント能を担ってい

る p53 蛋白質の転座頻度への影響を調べた (図 4)。

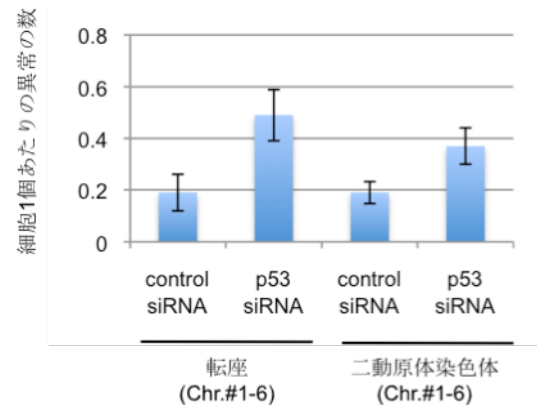


図4 p53 発現抑制による転座頻度の増加

p53 mRNA に対する small interfering RNA (siRNA) を処理して p53 蛋白質の発現を抑制したところ、2 Gy の γ 線照射後の転座および二動原体染色体の頻度は顕著に上昇した。この結果から ATM/p53 依存的な G1 チェックポイントが ATM による転座頻度抑制に関与していることが分かった。

しかしながら図 3 と図 4 の結果を比較すると転座や二動原体染色体の頻度は ATM 阻害 > p53 発現抑制であった。これは ATM が p53 依存的 G1 チェックポイント以外の機能を介しても転座頻度抑制に関与していることを示唆している。そこで p53 shRNA および Chk1/2 阻害剤を処理して全ての細胞周期チェックポイントがかからない条件下で ATM 阻害剤の影響を見た (図 5)。

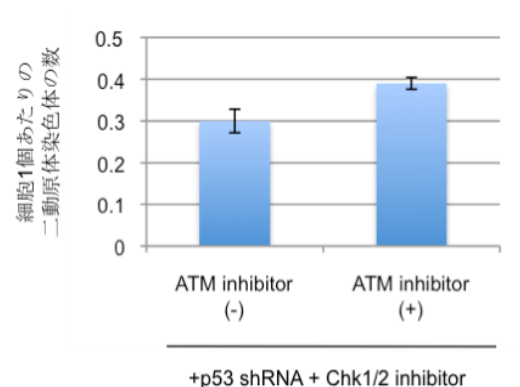


図5 チェックポイントがかからない条件下における ATM 阻害剤の二動原体染色体頻度に対する影響

その結果、ATM 阻害により二動原体染色体の頻度が少しではあるが、有意に上昇した。これは ATM がチェックポイント以外の機能を介しても転座頻度の抑制に関与している

ことを意味する。ATM のチェックポイント以外の機能としては DNA 二重鎖切断修復があるが、修復においては DNA-PK 依存的な古典的非相同末端結合 (Classical NHEJ) の経路において DNA-PK と協調的に働いていることが分かっている。そこで転座頻度の抑制においても ATM が DNA-PK と同じ経路で働いているかどうかを検討するため、両蛋白質の阻害剤を用いたエピスタシス解析を行った (図 6)。

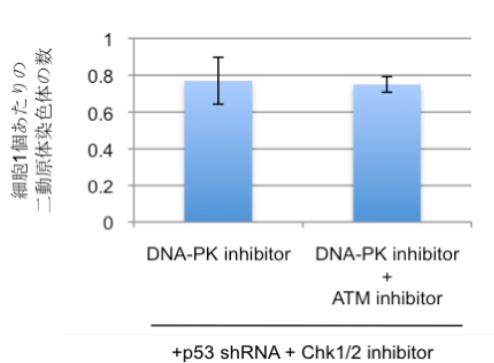


図 6 二動原体染色体形成頻度における ATM と DNA-PK のエピスタシス解析

その結果、DNA-PK 阻害剤処理により二動原体染色体の頻度は有意に上昇したが、これにさらに ATM 阻害剤を処理しても頻度の上昇は見られなかった。これは ATM と DNA-PK が同じ「転座形成抑制経路」で機能していることを意味する。

本研究の主な成果は、(1) 従来 DNA 二重鎖切断部位にのみ形成されるとされていた  $\gamma$ -H2AX フォーカスが、二動原体染色体のような誤った修復により生成した染色体上でも形成されていること、すなわち誤って修復された染色体を ATM が認識して活性化していること、(2) これまで明らかではなかった ATM による転座頻度抑制機構を明らかにしたことである。(1) については現在論文投稿準備中であり、(2) については 2011 年、*Biochemical and Biophysical Research Communications* に発表した。

今後の展望としては、(1) ATM を活性化させる転座融合部位のクロマチン構造の同定、具体的には転座融合部位特異的なヒストンの翻訳後修飾やその部位に結合している蛋白質を同定すること、(2) ATM や DNA-PK によりリン酸化を受け、転座頻度抑制に貢献している蛋白質の同定などが挙げられる。

## 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 7 件)

- ① 山内基弘、鈴木啓司、岡泰由、鈴木正敏、近藤久義、山下俊一  
Mode of ATM-dependent suppression of chromosome translocation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 査読有、416 巻、2011、111-118
- ② 岡泰由、山内基弘、鈴木正敏、山下俊一、鈴木啓司  
Persistence and dynamics of DNA damage signal amplification determined by microcolony formation and live-cell imaging. *Journal of Radiation Research* 査読有、52 巻、2011、766-774
- ③ 鈴木啓司、山内基弘、岡泰由、鈴木正敏、山下俊一  
Creating localized DNA double-strand breaks with microirradiation. *Nature Protocols* 査読有、6 巻、2011、134-139
- ④ 鈴木啓司、山内基弘、山下俊一  
ATM-dependent cellular response to DNA double strand breaks plays a pivotal role in the maintenance of the integrity of the genome. *Radiation Protection Dosimetry* 査読有、143 巻、2011、279-283
- ⑤ 石川彩、山内基弘、鈴木啓司、山下俊一  
Image-based quantitative determination of DNA damage signal reveals a threshold for G2 checkpoint activation in response to ionizing radiation. *Genome Integrity* 査読有、1 巻、2010、10
- ⑥ 鈴木啓司、高橋麻衣子、岡泰由、山内基弘、鈴木正敏、山下俊一  
Requirement of ATM-dependent pathway for the repair of a subset of DNA double strand breaks created by restriction endonucleases. *Genome Integrity* 査読有、1 巻、2010、4
- ⑦ 鈴木啓司、山内基弘、岡泰由、鈴木正敏、山下俊一  
A novel and simple micro-irradiation technique for creating localized DNA double-strand breaks. *Nucleic Acids Research* 査読有、38 巻、2010、e129

[学会発表] (計 3 件)

- ① 山内基弘「誤った DNA 二重鎖切断再結合部位に対する ATM 依存的チェックポイント応答」日本放射線影響学会第 53 回大会、京都 2010 年 シンポジウム

② 山内基弘、鈴木啓司、山下俊一「ATMによる染色体転座の認識」日本放射線影響学会第52回大会 広島 2009年 ワークショップ

③ 山内基弘 “ATM-p53 axis suppresses propagation of chromosome translocation by foci-growth-dependent G1 checkpoint” Nagasaki Global COE program young investigators’ international symposium 長崎 2009年 シンポジウム

[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0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  
なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山内基弘 (YAMAUCHI MOTOHIRO)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・  
助教  
研究者番号：60437910

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし