

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：24405

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12243

研究課題名(和文)新規のDNAリガーゼ 遺伝子変異マウスにおける放射線応答異常の解析

研究課題名(英文)Abnormal radiation response of a newly identified DNA ligase IV mutant mice

研究代表者

児玉 靖司 (Kodama, Seiji)

大阪公立大学・大学院理学研究科 ・客員研究員

研究者番号：00195744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：非相同末端結合は、生物にとって最も有害なDNA損傷であるDNA 2本鎖切断(DSB)を修復する主要経路のひとつである。本研究は、非相同末端結合の最終ステップで、DNA切断端同士を結合する酵素であるDNAリガーゼに新規遺伝子変異を導入したマウス(Lig4^{W447C/W447C})細胞を用いて、放射線被ばく影響を解析した。その結果、本研究は、Lig4^{W447C/W447C}細胞が、DSB修復速度の低下、並びに修復誤りの促進、放射線致死高感受性、細胞老化の促進、テロメア不安定化などの特徴を示すことを明らかにした。本研究の成果は、生命恒常性維持におけるDSB修復経路の新しい局面を切り拓くものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非相同末端結合は、生物にとって最も有害なDNA損傷であるDNA 2本鎖切断(DSB)を修復する主要経路である。この修復経路に関わるタンパク質分子の遺伝子に変異がある疾患では、免疫不全、成長遅延、放射線高感受性、高発がん性などの症状を呈する。本研究は、この修復経路の最終ステップでDNA切断端同士を結合する酵素であるDNAリガーゼ(Lig4)に新規遺伝子変異を導入したマウス細胞の放射線応答について調べた。その結果、新規Lig4変異により、これまでに知られていない放射線応答異常が明らかになった。この成果は、生命恒常性維持において、DSB修復経路が必須の役割を果たしていることを示している。

研究成果の概要(英文)：Non-homologous end joining is one of the major pathways to repair DNA double strand breaks (DSB), which are the most deleterious DNA damage to the organism. In the present study, we studied radiation effects on mouse cells with a novel mutation in DNA ligase IV (Lig4^{W447C/W447C}) gene. Lig4 is an enzyme that joins the ends of DNA break in the final step of non-homologous end joining. The results revealed that Lig4^{W447C/W447C} cells exhibit a reduced DSB repair kinetics, as well as promoted error-prone repair, hyper radiosensitivity, accelerated cellular senescence, and telomere instability. These results provide new aspects of the DSB repair pathway in cellular homeostasis.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNAリガーゼ DNA2本鎖切断修復 非相同末端結合 放射線感受性 姉妹染色分体交換 二動原体染色体 テロメア不安定化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA2 本鎖切断 (DSB) は生物にとって最も脅威となる DNA 損傷である。非相同末端結合は、主要な DSB 修復経路の一つであり、その最終ステップで2つの DNA 切断端を結合する役割を担うのが DNA リガーゼIV (Lig4) である。Lig4 の活性低下は、DSB 修復が完結しないために染色体異常、細胞老化、及び細胞死などが誘発され、臓器の機能不全を招くと推定される。一方、Lig4 遺伝子に変異を示すヒト疾患は Lig4 症候群として知られており、成長遅延、小頭症、血球減少、免疫不全、放射線感受性、悪性腫瘍発生などの多彩な病態を示す。その病態について研究するために、Lig4 遺伝子変異を両アレルに導入したマウスが作出された。この Lig4 ホモ変異マウスは、Lig4 酵素活性ドメインの 447 番目のアミノ酸が、トリプトファン(W)からシステイン(C)に置換されており ($Lig4^{W447C/W447C}$) 体長、及び脳、脾臓、胸腺等の臓器サイズがヘテロ変異マウスに比べて小さくなる (図1)。

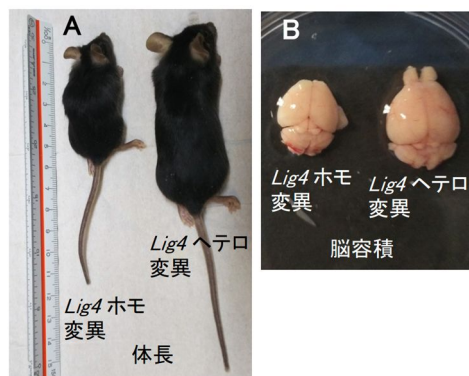


図1 Lig4 ホモ変異とLig4ヘテロ変異マウスの (A)体長と(B)脳容積

$Lig4^{W447C/W447C}$ マウスの病態解析はまだ進んでおらず、ほとんど未知のまま残されているのが現状である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新規の遺伝子変異を導入した DNA リガーゼIV (Lig4) が引き起こす DNA2 本鎖切断 (DSB) 修復不全による放射線応答異常を解析し、それによって生命恒常性維持における DSB 修復機構のこれまでに知られていない役割を明らかにすることである。Lig4 の遺伝子変異では、変異部位によって現れる病態が異なるため、本研究で用いる新規変異導入の $Lig4^{W447C/W447C}$ マウスに現れる DSB 修復不全の病態は未知であり、そこから非相同末端結合が果たす新しい役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) Lig4 ホモ変異 ($Lig4^{W447C/W447C}$) が DSB 修復動態に及ぼす影響の解析

Lig4 ホモ変異マウス、及び対照として Lig4 野生型、または Lig4 ヘテロ変異マウス胎児から、神経幹/前駆細胞 (NSPC) 並びに線維芽細胞 (MEF) を採取した。細胞に X 線 (1Gy) を照射後、10 分~24 時間まで経時的に細胞を固定し、細胞当たりに残存する DSB 数をリン酸化ヒストン H2AX (γ -H2AX) フォーカスを指標として計測した。

(2) MEF における増殖能と細胞老化の解析

細胞増殖は、MEF を用いて培養日数ごとの増殖率を解析した。また、細胞老化の解析は、指標に老化関連 β ガラクトシダーゼ (SA- β gal) 活性の上昇を用いた。SA- β gal 活性陽性細胞を老化細胞と判定してその数を計測した。

(3) MEF の不死化と X 線致死感受性の解析

高コロニー形成率の細胞を得るために、MEF の長期継代培養を実施し、自然に不死化した Lig4 ホモ変異細胞、野生型、及び Lig4 ヘテロ変異細胞を得た。これらの不死化細胞を用いて、X 線

致死感受性試験をコロニー形成法により実施した。

(4) 姉妹染色分体交換 (SCE)、テロメア SCE (T-SCE)、及びテロメア FISH シグナルの解析
Lig4 ホモ変異の染色分体組換え頻度に対する影響を探るために、SCE とテロメア SCE (T-SCE) 頻度を調べた。さらに、*Lig4* ホモ変異のテロメア不安定化への影響を探るために、テロメア FISH シグナル異常を調べた。MEF に X 線を照射後、SCE、T-SCE、及びテロメア FISH シグナルを検出するための染色体標本を作製し、それぞれの出現頻度を *Lig4* ホモ変異 MEF、及び野生型 MEF で解析した。

(5) ライブセルイメージングを用いた細胞分裂異常、及び染色体異常の解析

(3) で作成した不死化細胞に、蛍光色素 *mCherry* 遺伝子を連結したヒストン *H3* 遺伝子を導入して核を可視化した *Lig4* ホモ変異細胞、及び野生型を作成した。これらの細胞に X 線を照射し、ライブセルイメージング装置を用いて細胞世代を追跡することにより細胞系譜解析を行った。特に小核、及び架橋の形成に着目して解析した。さらに、架橋形成の原因となる二動原体染色体形成頻度について、細胞を G1 期で X 線照射後第 1 回目の分裂期で回収して染色体標本を作製し、解析した。

4. 研究成果

(1) *Lig4* ホモ変異 (*Lig4*^{W447C/W447C}) が DSB 修復動態に及ぼす影響の解析

Lig4 ホモ変異マウス胎児由来細胞は、野生型マウス胎児及び *Lig4* ヘテロ変異マウス胎児由来細胞に比べて、DSB 修復速度が遅く、NSPC では被ばく後 6 時間、また、MEF では 12 時間まで DSB 数が有意に低下しなかった。このことは、*Lig4* 遺伝子に導入された新規遺伝子変異が *Lig4* 活性を有意に低下させる効果を持つことを示している。

(2) MEF における増殖能と細胞老化の解析

野生型 MEF と *Lig4* ホモ変異 MEF の自然発生 DSB 数を比較すると、前者に比べて後者では 2 ~3 倍多い蓄積がみられ、また、倍加時間は、それぞれ 31.3 時間と 41.2 時間であり、後者で増殖能の明らかな低下がみられた。さらに、前者と後者における老化細胞の割合を調べると、培養 2 日目ではそれぞれ 2.9% と 3.3% で差がないが、培養 5 日目では 5.0% と 19.7% を示した。この結果は、*Lig4* ホモ変異 MEF において、細胞分裂数の増加に伴い、急激に細胞老化が促進されることを示している。

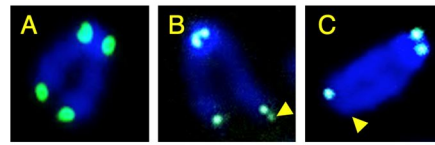
(3) MEF の不死化と X 線致死感受性の解析

Lig4 ホモ変異 MEF、*Lig4* ヘテロ変異 MEF、及び野生型 MEF の 3 種の細胞を 10 日ごとに長期にわたり継代培養した。いずれの細胞も、集団倍加数 15 程度までに一時的な増殖能低下を示したが、その後回復して増殖率が安定した。そこで、集団倍加数 50 を超えた時点で、不死化したと判定した。次に、これらの不死化細胞を用いて、X 線致死感受性をコロニー形成法で調べた。その結果、野生型細胞、及び *Lig4* ヘテロ変異細胞の D0 値は、それぞれ、1.23Gy、1.11Gy であったのに対し、*Lig4* ホモ変異細胞の D0 値は、0.3Gy であった。このことは、*Lig4* ホモ変異細胞が、野生型細胞や *Lig4* ヘテロ変異細胞に比べて、X 線の致死作用に対しておよそ 4 倍高感受性であることを示している。

(4) 姉妹染色分体交換 (SCE)、テロメア SCE (T-SCE)、及びテロメア FISH シグナルの解析

初めに、自然発生 SCE について調べたところ、*Lig4* 遺伝子型の違いによる変化はみられなかった。X 線 (0.5Gy) 誘発 SCE については、野生型細胞では頻度の増加はみられなかった。これに対し、ヘテロ変異 (*Lig4*^{+/W447C}) 及びホモ変異 (*Lig4*^{W447C/W447C}) 細胞では、SCE 発生頻度の有意な増加がみられた。このことは、*Lig4* が X 線誘発染色分体組換えの抑止に関わっていること

を示唆している。次に、テロメアにおける SCE (T-SCE) については、*Lig4* ホモ変異 (*Lig4*^{W447C/W447C}) は、自然発生頻度をおよそ 3 倍増加させた。一方、X 線 (0.5Gy) 誘発 T-SCE は、全ての遺伝子型細胞で、自然発生頻度のおよそ 2 倍に増加した。このことは、*Lig4* 活性低下は、T-SCE の自然発生



正常シグナル シグナル過剰 シグナル欠失

図2 テロメアFISHシグナル異常 (A)正常シグナル (B)シグナル過剰、(C)シグナル欠失を示す。

を高める効果があること、さらに、テロメアは放射線誘発損傷に感受性が高く、その修復には T-SCE が関与している可能性を示唆している。次に、テロメア不安定化の指標として、テロメア FISH シグナル異常を調べたところ (図 2) *Lig4* ホモ変異 (*Lig4*^{W447C/W447C}) は、シグナル過剰、及びシグナル欠失ともに増加させること、また、X 線被ばくにより、前者は増加するが、後者は変化しないことが分かった。このことは、*Lig4* ホモ変異がテロメア不安定化を促進する可能性を示唆している。

(5) ライブセルイメージングを用いた細胞分裂異常、及び染色体異常の解析

ライブセルイメージングを用いた細胞分裂異常解析の結果、*Lig4* ホモ変異細胞は、野生型細胞に比べて、自然発生、及び X 線 (0.5, 1Gy) 誘発分裂異常 (小核、架橋、その他の異常) 頻度が、2 倍程度高くなることが分かった。興味深いことに、*Lig4* ホモ変異は、小核ではなく、架橋形成比率を増加させることが分かった。そこで、G1 期停止細胞に X 線照射し、24 時間の修復時間を置いた後の二動原体染色体と断片の形成頻度を調べた。その結果、1Gy 被ばくにおいて、*Lig4* ホモ変異細胞では、断片頻度は約 2 分の 1 に減少するが、二動原体染色体頻度はほとんど減少しないことが分かった。このことは、*Lig4* ホモ変異が、染色体切断端の再結合誤りを促進することを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sakamoto Yoshimi, Shiraishi Kazunori, Kodama Seiji	4. 巻 65
2. 論文標題 Enhanced induction of abnormal telomere FISH signals in response to oxidative DNA damage	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 187 ~ 193
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrad102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 児玉靖司、佐竹和泉、平井將登、川喜多愛、村田香織、杉本憲治、田村志宣、白石一乗
2. 発表標題 DNAリガーゼ ホモ変異マウス細胞におけるX線誘発DNA 2本鎖切断の再結合誤りの促進
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 豊里咲夏、武田佳恩、田村志宣、児玉靖司、白石一乗
2. 発表標題 DNAリガーゼ 症候群モデルマウス由来不死化細胞の細胞学的特徴に関する解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上村紗也果、児玉靖司、白石一乗
2. 発表標題 マウス胎児線条体のニューロンにおけるX線誘発アポトーシスとその細胞起源に関する解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平井將登、川喜多愛、村田香織、白石一乗、田村志宣、杉本憲治、児玉靖司
2. 発表標題 ライブセルイメージングによるDNA ligase ホモ接合体変異マウス細胞における高頻度なX線誘発異常核分裂の検出
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 増田祐一郎、浅野万結子、白石一乗、児玉靖司
2. 発表標題 染色体移入実験で明らかになった被ばく染色体と切断をもつ染色体との相互作用
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 白石一乗、北畠涼、児玉靖司
2. 発表標題 同等のDNA修復動態を示すにもかかわらず、胎児線条体における神経幹細胞と神経細胞の放射線感受性は異なる
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 豊里咲夏、白石一乗、田村志宣、児玉靖司
2. 発表標題 トポイソメラーゼ 阻害剤誘発DNA 2本鎖切断の修復におけるDNA ligase 変異の影響
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河田真唯子、白石一乗、田村志宣、児玉靖司
2. 発表標題 DNA ligase 変異マウス胎児繊維芽細胞由来不死化細胞における放射線高感受性と染色体不安定性
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松井大地、白石一乗、田村志宣、児玉靖司
2. 発表標題 DNA ligase ホモ変異マウス胎児線維芽細胞における自然発生およびX線誘発姉妹染色分体交換(SCE)とテロミアSCE
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平井將登、白石一乗、田村志宣、児玉靖司
2. 発表標題 DNA ligase ホモ接合体変異マウス胚線維芽細胞におけるX線誘発小核形成
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒川壱平、白石一乗、児玉靖司
2. 発表標題 In vivo 照射されたマウス神経幹/前駆細胞におけるテロミア姉妹染色分体交換の誘導と6週間の持続
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 浅野万結子、白石一乗、児玉靖司
2. 発表標題 被ばくマウス染色体と切断を含むヒト染色体との相互作用の検出
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増田祐一郎、浅野万結子、白石一乗、児玉靖司
2. 発表標題 被ばく染色体が切断を有する非被ばく染色体を不安定化する可能性について
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北島涼、白石一乗、児玉靖司
2. 発表標題 マウス胎児脳組織におけるX線誘発DNA 2本鎖切断とcleaved caspase-3陽性細胞の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021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
研究 分 担 者	白石 一乗 (Shiraishi Kazunori) (40347513)	大阪公立大学・大学院理学研究科 ・助教 (24405)	

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
---------	---------