

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17888

研究課題名（和文）放射線誘発DNA二本鎖切断に応答する53BP1の超高解像度3次元動態解析

研究課題名（英文）Analysis of 53BP1 foci using super-resolution microscopy in response to radiation-induced DNA double-strand breaks

研究代表者

内原 脩貴 (Uchihara, Yuki)

慶應義塾大学・薬学部（芝共立）・助教

研究者番号：10883712

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：放射線照射により生じたDNA二本鎖切断部位（DSB）において53BP1 fociが形成されるが、超解像度蛍光顕微鏡により、このfociはナノドメインから形成されることが知られている。本研究では、超解像度蛍光顕微鏡3D-SIM（OMX）を用いて53BP1ナノドメイン間の距離（DMS）を3次元的に測定する実験系を構築した。本実験系を用いてDMSの放射線照射後の経時的な変化を解析し、DSB損傷後の時間に関わらず、53BP1ナノドメイン間の距離は維持され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

DNA二本鎖切断部位（DSB）に集積する53BP1は、DSBを中心として左右に約1-2 Mb分布するが、その意義は明らかとなっていない。本研究において構築された実験系および成果は、未だ多くが未知である53BP1の機能解明やゲノム安定性維持機構に関わる知見に貢献すると考えている。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that 53BP1 foci are composed of 53BP1 nanodomains at radiation-induced DNA double-strand break (DSB) sites using super-resolution fluorescence microscopy. In this study, we developed an experimental system to measure the distance between 53BP1 nanodomains in three dimensions (DMS: Distance from the Median Spot) using a super-resolution fluorescence microscope 3D-SIM (OMX). Using this experimental system, we analyzed the changes in DMS over time after irradiation and found that the distance between 53BP1 nanodomains is maintained regardless of the time after DSB damage.

研究分野：シグナル伝達

キーワード：DNA修復 53BP1 超高解像度解析 DNA二本鎖切断 クロマチン動態

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線照射は多種多様な DNA 損傷を誘発する。その中でも DNA 二本鎖切断 (DSB: DNA double strand break) は、欠失変異や染色体転座などの突然変異を誘発し、細胞死やがん化を引き起こす。したがって、放射線照射による人体影響を理解するためには、その分子機構の全容解明が必要不可欠であると考えられる。これまでの DSB 修復研究から、DSB の近傍では多数の DNA 修復分子が集積することが明らかになっている。特に H2AX (ヒストンバリエント H2AX のリン酸化) 及び 53BP1 は蛍光免疫染色により可視化され、DSB 近傍に多数集積することでフォーサイと呼ばれる円形のシグナルを示す。近年の報告から、その分布は 1 つの DSB を中心として約 1-2Mbp におよび、その 3 次元空間的分布は直径約 1  $\mu\text{m}$  にまで及ぶことが明らかになってきた。53BP1 が広範囲に局在する理由として、多数集積した 53BP1 が DSB 近傍のクロマチン構造を弛緩させ、その他の DNA 修復分子の集積を円滑にする役割があると考えられているが、未だそのクロマチン変換を可視化した例は無い。DSB 近傍のクロマチン制御欠損は放射線照射後に重篤な染色体異常を示すことから、DSB 近傍のクロマチン制御機構の解明は、放射線影響を理解する上で重要な研究テーマである。実際、53BP1 欠損細胞は放射線高感受性を示す。このような背景から、申請者は放射線誘発 DSB 近傍の 53BP1 ナノドメインがゲノム安定性に果たす役割について興味を持ち、本研究課題を立案した。

### 2. 研究の目的

これまで様々な先行研究により、放射線誘発 DSB に対する修復過程において、DSB 近傍でクロマチン構造変換が生じることは示唆されている。しかしながら、おそらくそのクロマチン変化は 53BP1 フォーサイの中でも局所的であり、空間サイズ的に約 1 マイクロメートルの範囲内の微小なイベントであると想定されるため、通常の蛍光顕微鏡では解析が不可能であった。申請者はこれまでに、超解像蛍光顕微鏡 3D-SIM を用いて 53BP1 ナノドメインを可視化することに成功している。そこで本研究では超解像蛍光顕微鏡 3D-SIM を用いて 53BP1 ナノドメイン間の空間的配置を解析し、53BP1 フォーサイ内の局所的な構造変化を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

RPE 細胞を接触阻害作用により G1 期に同調した後、X 線を照射した。照射一定時間後に細胞を固定し、53BP1 の免疫染色を行った。その後、超解像蛍光顕微鏡 3D-SIM (OMX) により 53BP1 の蛍光画像を取得した。その後、高精細 3D/4D 画像解析ソフトウェア Imaris を用いて、53BP1 フォーサイの中心座標からの 53BP1 ナノドメインの距離を算出した。また、53BP1 ナノドメインの数についても解析を行った。ATM 阻害剤は X 線を照射する 30 分前に処理した。また RIF1 のノックダウンは Dharmafect を用いて行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 53BP1 ナノドメイン間距離の経時的変化

X 線 1 Gy を照射した場合、照射 0.5 時間時点においては 53BP1 フォーサイは観察されるが、照射 24 時間後では DSB が修復されるため観察されない。そこで、53BP1 ナノドメインが観察可能な 10 Gy 照射 24 時間後の条件と 1 Gy 照射 0.5 時間後の条件を比較した。X 線 1 Gy 照射 0.5 時間後に 53BP1 フォーサイは 26 個程度形成され、X 線 10 Gy 照射 24 時間後では 14 個程度形成されることが確認できた (図 1A)。それぞれのフォーサイの 53BP1 ナノドメイン数を測定した結果、照射 0.5 時間後と比較して照射 24 時間後で 53BP1 ナノドメイン数が増加した (図 1B)。一

方で DMS を測定した結果、照射 0.5 時間後と照射 24 時間後で変化は認められなかった (図 1C)。したがって、DSB が生じた後の時間に関わらず、53BP1 ナノドメイン間の距離は維持されることが示唆された。

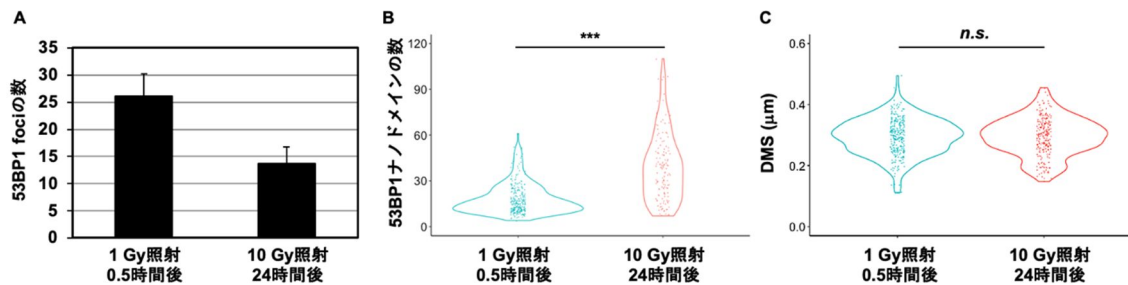


図 1 X 線照射一定時間後の DMS

### (2) ATM が 53BP1 ナノドメイン間距離に及ぼす影響

これまでにヘテロクロマチンに生じた DSB 部位は、損傷後時間が経ってから ATM 依存的に修復されることが知られている。そのため、ATM は損傷後期で 53BP1 ナノドメインを制御している可能性が考えられた。そこで、X 線 5 Gy を照射した 24 時間後に 53BP1 フォーサイを解析した。ATM 阻害剤により DSB 修復の遅延が確認された (図 2A)。また、ATM 阻害剤により、53BP1 ナノドメインの数は減少した (図 2B)。一方で DMS を測定した結果、ATM 阻害剤の有無で変化は認められなかった (図 2C)。したがって、ATM の阻害により 53BP1 ナノドメインの距離は変わらないまま、53BP1 フォーサイのサイズが減少したと考えられる。

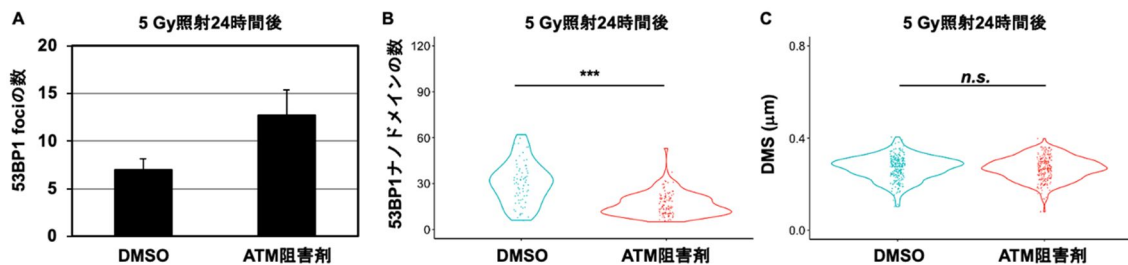


図 2 ATM 阻害剤処理後の DMS

### (3) RIF1 が 53BP1 ナノドメイン間距離に及ぼす影響

これまでに超解像蛍光顕微鏡を用いた解析により、53BP1 ナノドメインは RIF1 により環状構造を維持していると報告されている。RIF1 が 53BP1 ナノドメイン間の距離を維持している可能性が考えられたため、RIF1 をノックダウンし DMS の解析を行った。その結果、RIF1 のノックダウンにより 53BP1 ナノドメインの数は減少した (図 3A)。一方で、RIF1 をノックダウンしても DMS に変化は認められなかった (図 3B)。そのため、RIF1 は 53BP1 ナノドメインの位置関係の維持に影響しないことが示唆された。

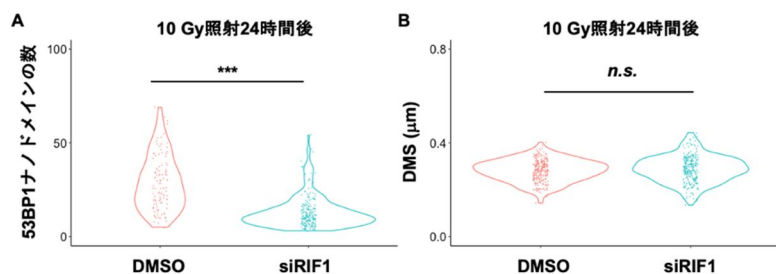


図 3 RIF1 ノックダウン後の DMS

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Haruna Shunji, Okuda Ken, Shibata Akiko, Isono Mayu, Tateno Kohei, Sato Hiro, Oike Takahiro, Uchihara Yuki, Kato Yu, Shibata Atsushi	4. 巻 194
2. 論文標題 Characterization of the signal transduction cascade for inflammatory gene expression in fibroblasts with ATM-ATR deficiencies after Ionizing radiation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Radiotherapy and Oncology	6. 最初と最後の頁 110198 ~ 110198
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.radonc.2024.110198	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Ryota, Okumura Hikaru, Isono Mayu, Yamauchi Motohiro, Unami Daiki, Lusi Rahmartani Tania, Yamamoto Masamichi, Kato Yu, Uchihara Yuki, Shibata Atsushi	4. 巻 rrae005
2. 論文標題 Inhibition of intracellular ATP synthesis impairs the recruitment of homologous recombination factors after ionizing radiation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 rrae005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrae005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uchihara Yuki, Shibata Atsushi	4. 巻 132
2. 論文標題 Regulation of DNA damage-induced HLA class I presentation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103590 ~ 103590
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2023.103590	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Uchihara Yuki, Permata Tiara Bunga Mayang, Sato Hiro, Kawabata-Iwakawa Reika, Katada Sayako, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, Yamauchi Motohiro, Kato Reona, Gondhowiardjo Soehartati, Hoson Naoki, Yasuhara Takaaki, Shibata Atsushi	4. 巻 82
2. 論文標題 DNA damage promotes HLA class I presentation by stimulating a pioneer round of translation-associated antigen production	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 2557 ~ 2570.e7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2022.04.030	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 内原 脩貴、柴田 淳史	4. 巻 57
2. 論文標題 放射線照射により惹起されるHLAクラス 提示の分子機構	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 265-284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada Kohei, Sato Hiro, Kumazawa Takuya, Mori Yasumasa, Permata Tiara Bunga Mayang, Uchihara Yuki, Noda Shin-ei, Suzuki Keiji, Ikota Hayato, Yokoo Hideaki, Gondhowiardjo Soehartati, Nakano Takashi, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 8
2. 論文標題 Calreticulin Upregulation in Cervical Cancer Tissues From Patients After 10 Gy Radiation Therapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Advances in Radiation Oncology	6. 最初と最後の頁 101159 ~ 101159
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.adro.2022.101159	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 該当する

1. 著者名 Permata Tiara Bunga Mayang, Sato Hiro, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, Uchihara Yuki, Yoshimatsu Yukihiko, Sato Itaru, Kato Reona, Yamauchi Motohiro, Suzuki Keiji, Oike Takahiro, Tsushima Yoshito, Gondhowiardjo Soehartati, Ohno Tatsuya, Yasuhara Takaaki, Shibata Atsushi	4. 巻 62
2. 論文標題 High linear energy transfer carbon-ion irradiation upregulates PD-L1 expression more significantly than X-rays in human osteosarcoma U2OS cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 773 ~ 781
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rrab050	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 該当する

1. 著者名 Uchihara Yuki, Permata Tiara Bunga Mayang, Sato Hiro, Shibata Atsushi	4. 巻 104
2. 論文標題 Modulation of immune responses by DNA damage signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103135 ~ 103135
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2021.103135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kumazawa Takuya, Mori Yasumasa, Sato Hiro, Permata Tiara, Uchihara Yuki, Noda Shin-Ei, Okada Kohei, Kakoti Sangeeta, Suzuki Keiji, Ikota Hayato, Yokoo Hideaki, Gondhowiardjo Soehartati, Nakano Takashi, Ohno Tatsuya, Shibata Atsushi	4. 巻 23
2. 論文標題 Expression of non-homologous end joining factor, Ku80, is negatively correlated with PD-L1 expression in cancer cells after X-ray irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/ol.2021.13147	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 該当する

1. 著者名 Yasuhara Takaaki, Kato Reona, Yamauchi Motohiro, Uchihara Yuki, Zou Lee, Miyagawa Kiyoshi, Shibata Atsushi	4. 巻 38
2. 論文標題 RAP80 suppresses the vulnerability of R-loops during DNA double-strand break repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110335 ~ 110335
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2022.110335	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 該当する

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 内原 脩貴、柴田 淳史
2. 発表標題 53BP1およびRAP80を介したDNA二本鎖切断部位の高次クロマチン構造制御
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 内原 脩貴、宇波 大輝、林 僚汰、奥村 光遥、堅田 明子、磯野 真由、宮成 悠介、安原 崇哲、山内 基弘、加藤 優、柴田 淳史
2. 発表標題 53BP1およびRAP80による放射線誘発DNA二本鎖切断部位の高次クロマチン構造制御
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 内原 脩貴, Permata Tiara Bunga Mayang, 佐藤 浩央, 川端 麗香, 堅田 明子, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, 山内 基弘, 加藤 玲於奈, Gondhowiardjo Soehartati, 保仙 直毅, 安原 崇哲, 柴田 淳史
2. 発表標題 DNA損傷シグナルによるHLAクラスIの抗原提示の分子メカニズム
3. 学会等名 2022年度 日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内原 脩貴, Permata Tiara Bunga Mayang, 佐藤 浩央, 川端 麗香, 堅田 明子, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, 山内 基弘, 加藤 玲於奈, Gondhowiardjo Soehartati, 保仙 直毅, 安原 崇哲, 柴田 淳史
2. 発表標題 放射線照射により促進されるパイオニアラウンド翻訳を介したHLAクラスIの提示
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 内原 脩貴, 柴田 淳史
2. 発表標題 DNA損傷が惹起するATR-AKT-mTORC1-S6Kシグナル伝達経路を介したHLAクラスIの提示
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内原 脩貴, 柴田 淳史
2. 発表標題 DNA損傷シグナルに伴い活性化されるHLAクラスI提示の分子機構
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 内原 脩貴, Permata Tiara Bunga Mayang, 佐藤 浩央, 川端 麗香, 堅田 明子, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, 山内 基弘, 加藤 玲於奈, Gondhowiardjo Soehartati, 保仙 直毅, 安原 崇哲, 柴田 淳史
2. 発表標題 DNA損傷応答シグナル伝達を介したHLAクラスIの抗原提示
3. 学会等名 第143回 日本薬学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuki Uchihara, Tiara Bunga Mayang Permata, Hiro Sato, Reika Kawabata-Iwakawa, Sayako Katada, Wenchao Gu, Sangeeta Kakoti, Motohiro Yamauchi, Reona Kato, Soehartati Gondhowiardjo, Naoki Hosen, Takaaki Yasuhara, Atsushi Shibata
2. 発表標題 DNA damage promotes HLA class I presentation by stimulating a pioneer round of translation-associated antigen production
3. 学会等名 The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 内原 脩貴, Permata Tiara, Bunga Mayang, 佐藤 浩央, 川端 麗香, 堅田 明子, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, 山内 基弘, 加藤 玲於奈, Gondhowiardjo Soehartati, 保仙 直毅, 安原 崇哲, 柴田 淳史
2. 発表標題 放射線照射により促進されるHLAクラスIの抗原提示の分子機構
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 内原 脩貴, Permata Tiara, Bunga Mayang, 佐藤 浩央, 川端 麗香, 堅田 明子, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, 山内 基弘, 加藤 玲於奈, Gondhowiardjo Soehartati, 保仙 直毅, 安原 崇哲, 柴田 淳史
2. 発表標題 DNA損傷が惹起するナンセンス変異依存mRNA分解機構を介した抗原産生およびHLAクラスIの提示
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年



1. 発表者名 内原 脩貴, Permata Tiara, Bunga Mayang, 佐藤 浩央, 川端 麗香, 堅田 明子, Gu Wenchao, Kakoti Sangeeta, 山内 基弘, 加藤 玲於奈, Gondhowiardjo Soehartati, 保仙 直毅, 安原 崇哲, 柴田 淳史
2. 発表標題 DNA損傷が惹起するHLAクラスIの抗原提示の分子機構
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
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
---------	---------