

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 28 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24310038

研究課題名(和文)新規細胞系樹立による放射線DNA損傷修復経路と突然変異の関係解明

研究課題名(英文) Analysis of the relationship between DNA double strand break repair pathway and mutagenesis in response to ionizing radiation by using novel assay systems

研究代表者

田内 広 (Tauchi, Hiroshi)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：70216597

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射線で生じるDNA二重鎖切断(DSB)の主要な2つのDSB修復系路(相同組換えと非相同末端結合)を中心に、DSB修復過程と突然変異や遺伝的不安定性を直接的に関連づけて解析するために、時間と部位を制御してゲノムDNAにDSBを導入でき、その修復効率や精度と突然変異誘発を解析できる新たな視点に立った細胞系を樹立した。また、配列特異的人工ヌクレアーゼにより内在ゲノムに部位特異的DSBを導入する突然変異実験系を樹立して解析した結果、DSB修復の効率と質はそれぞれ異なる修復経路に依存することや、N末変異NBS1タンパク質の発現が遺伝的不安定性を変えることなく放射線感受性を上昇させることなどを発見した。

研究成果の概要(英文)：DNA double strand break (DSB), which is often induced by ionizing radiation, is one of the most serious DNA damage. To clarify the relationship between DSB repair pathway and mutation induction, we developed a site-specific DSB induction system by using artificial nucleases. We analyzed DSB repair efficiency and mutation spectrum at the DSB site, and found that efficiency and accuracy of DSB repair could be separately regulated. We also found that mutation at FHA domain of NBS1 renders the cells to be sensitive to radiation without increase in mutation frequency. A part of our findings were reported as several papers in scientific journals.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA修復 体細胞突然変異 放射線感受性

1. 研究開始当初の背景

たとえ低線量であっても放射線に照射された細胞内のDNAにはDNA二重鎖切断(DSB)が生じる。その大半は再結合(修復)されているが、修復不能な損傷や修復ミスは、細胞の致死や突然変異を誘発することになるため、DSB修復やそれに伴うシグナル制御は、放射線の生物影響を評価する上で特に考慮すべき重要な要素となる。DSB修復機構とその結果として現れる突然変異や癌化などとの関係を解明できれば、環境および人工放射線のリスク評価において、遺伝的バックグラウンドのような生物学的な要因を考慮する際の重要な情報が得られ、よりきめの細かい評価が可能となるはずである。

DSBの修復機構には、非相同末端結合(canonical non-homologous end joining: c-NHEJ)と相同組換え(homologous recombination: HR)の2つの主要な経路が存在し、細胞周期によってこれらの経路を使い分けることでゲノム安定性が保たれている。それらの分子機構に関する個々のタンパク機能が少しずつ明らかになるなかで、HRとNHEJという単純2分類ではなく、より詳細なDSB修復の区別も提唱されており、修復機構に関わるタンパク機能とDNA修復の精度、さらにはDNA損傷に起因する遺伝子変異などとの関連はいまだに未解明のままである。そのため、DSB修復からゲノム安定性維持に関わる全容を解明するには、修復と細胞周期、タンパク質相互作用の時間的、空間的な関係と修復の結果を明らかにする新たな切り口が必要であった。特に、個々のタンパク機能に支えられたDSB修復機構全体と、実際に細胞や個体に現れる突然変異とを直接に関連づけて理解しようという実験的アプローチはほとんど例がなく、新たな手法を取り入れることが必須であった。本課題では、これまでの研究によって独自に樹立した新規のHR解析細胞系に、人工酵素であるジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)をはじめとしたゲノム編集酵素を組み合わせることとした。

2. 研究の目的

本研究課題では、HRとNHEJという2つのDSB修復系路に関わるタンパク機能について、「修復精度の制御」という新たな視点から解明することを目指した。具体的には、(i) HRに必須なNbs1とNHEJに必須なKu70のダブルノックアウト細胞が生存可能なことから、この2つのタンパクに依存しない修復経路の実体を解明すること、(ii) 部位・時間制御が可能なHR修復レポーターを用いてDSB修復効率と細胞周期および修復関連タンパク質の制御シグナルとの関係を解明すること、そして

(iii) 配列特異的人工ヌクレアーゼであるジンクフィンガーヌクレアーゼ(ZFN)を用いて、内在するゲノムDNA中に部位特異的なDSBを1箇所だけ導入し、突然変異を解析できる新規の細胞実験系を樹立すること、の3点を目指した。(i)および(ii)の研究には、HRとc-NHEJのそれぞれにおいて中心的な制御因子であるNBS1とKu70のダブルノックアウト細胞に加えて、部位・時間特異的なDSB導入が可能なHR修復のレポーターアッセイ系を使用し、(iii)の実験系は新たに樹立をするものである。iiiの細胞系樹立後には、DSB修復と突然変異頻度や変異スペクトルとの関係を明らかにしてゆく。これらをもとにDNA損傷修復の制御から遺伝的不安定性につながる機構を包括的に解明する糸口をつかむことを目的とした。

3. 研究の方法

本課題の採択以前に、Nbs1とKu70のダブルノックアウト細胞の性質については解析がかなり進み、目的のiiにあげた細胞系についても樹立済みで本格的な解析を始めたところであった。また、iiiの細胞系についてはZFNのデザインが完了して細胞系樹立に取り組むところであった。しかし、東日本大震災により多くの試料を失った事により、研究そのものがかなり後退することになった。本課題はそれを受けて研究全体を再構築したものである。これまでの研究で樹立した下記(2)の細胞実験系については、一部は凍結ストックの無事が確認でき、研究開始初期に再樹立できたので、これらを用いてあらためてデータを収集するとともに、ほぼ振り出しに戻った(3)のZFNによる突然変異系を立ち上げることを目指した。用いた細胞および樹立を目指した細胞の概要は下記のとおりである。

(1)ハムスター細胞にヒトX染色体を導入した突然変異高感度検出系(Tauchi *et al.* J. Radiat. Res.2009)。この細胞は0.2Gyという低線量の放射線でも有意な突然変異の上昇が認められることが確認できている細胞系である。この細胞を用いて変異NBS1によりHR機構をかく乱した細胞を樹立して、放射線感受性や体細胞突然変異の頻度およびスペクトル解析を行った。

(2)時間および部位特異的DNA切断が制御できるHR修復効率アッセイ系。このアッセイ系は、ネオマイシン耐性遺伝子の再構築を利用したSCneoを改造したレポーターコンストラクト(Tauchi *et al.* Nature 2002)を1コピーだけゲノム中に導入したヒト細胞に、薬剤による細胞内局在制御が可能なI-SceIを発現させたものである。DSB導入が薬剤処理後1時間程度の間起きることがリアルタイムPCRによる解析で確認できている。この細胞は、HR修

復頻度および DSB 再結合効率と細胞周期との関連の解析に用いる。

(3)人工酵素を用いた部位特異的 DSB による突然変異アッセイシステム。ZFN は、人工的にアミノ酸配列を設計した 2 つのジンクフィンガーモチーフにより認識塩基配列を高い自由度で設定できるエンドヌクレアーゼである。この酵素に関する最初の報告は 1998 年 (Bitinaite *et al.* PNAS 1998) であるが、最近になって Zn フィンガーヌクレアーゼによって標的遺伝子に 1 箇所の DSB を導入してその後起こる c-NHEJ を利用するというアプローチによるノックアウトマウスの作成が次々に公表されている (Guerts *et al.* Science 2009 ほか)。この酵素の標的として、突然変異検出によく用いられる *Hprt* を選び、発現ベクターの委託作成が平成 22 年度末に完了していたが、東日本大震災により試料の大半を失った。そのため、かろうじて救出できた菌体から ZFN 発現プラスミドを再回収し ZFN の改良に取り組むとともに、システムに最適な細胞系の探索と、その細胞を用いての DSB 修復経路と突然変異頻度や変異スペクトルの解析を行った。最終的に、DSB 導入のタイミング制御系までの樹立は困難であることが判明したが、細胞系を変えることで ZFN による単一 DSB 誘発性突然変異の解析が可能となった。この細胞を用いて DSB 修復経路と突然変異との関連の解明に取り組んだ。

4. 研究成果

以下に主な研究の成果の概要を項目立てて示す。

(1)突然変異の高感度検出系を用いた DSB 修復と細胞感受性・遺伝的安定性の解析

課題代表者らは以前に、NBS1 タンパク質は HR 修復の制御に必須の因子であることを報告した (Tauchi *et al.* Nature 2002)。特に、NBS1 の N 末端に位置する FHA ドメインによる MRN 複合体の局在制御が、HR 修復能と深くリンクしており、NBS1 の FHA ドメインが HR 修復制御に重要であることもわかっていた (Sakamoto *et al.* Oncogene 2007)。そこで本研究では、突然変異の高感度検出系に、FHA ドメインを変異させたヒト NBS1 を高発現させ、HR 修復能を低下させた時に放射線感受性と突然変異の関係がどう変化するのかを調べた。

まず、ハムスター細胞の Mre11 および Rad50 がヒト NBS1 と相互作用するかどうかを免疫沈降法により確認し、発現させたヒト NBS1 がハムスター Mre11/Rad50 と相互作用して MRN 複合体を形成できることが確認できた。次に放射線照射後の MRN 複合体による DNA 損傷フォーカス形成を調べたところ、以前にヒト細胞で確認された結果と同様に、FHA ドメインに変異がある NBS1 を発

現させた細胞ではフォーカス形成が不十分となり、HR 修復能が低下していることが推測された (図 1)。

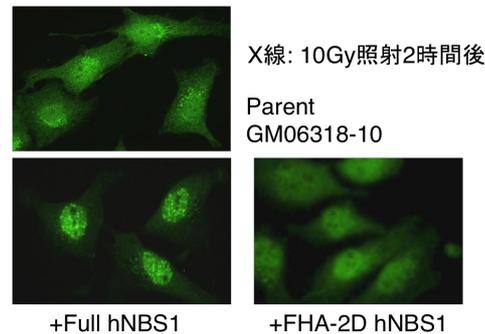


図 1. 損傷応答フォーカスの解析結果 (Ohara *et al.* 2014 より)

そこで、HR 修復能が確かに低下しているかを確認するため、トポイソメラーゼ阻害剤であるカンプトテシン感受性 (カンプトテシンによる損傷は主に HR によって修復される) を調べた。その結果、FHA ドメインが変異紫檀 BS1 を発現する細胞はカンプトテシンに高感受性であり (図 2)、DNA 損傷

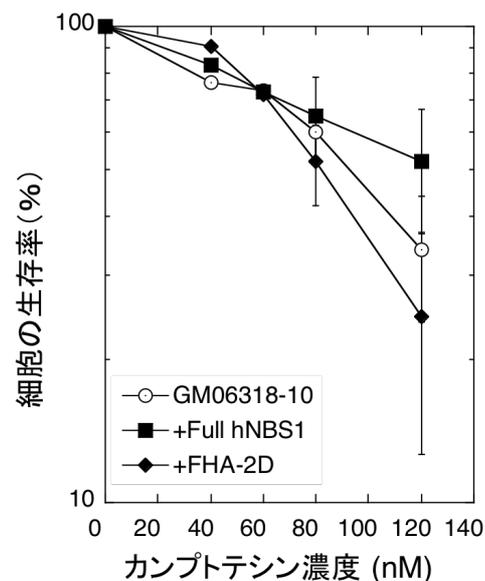


図 2. 正常および変異 NBS1 発現細胞のカンプトテシン感受性解析結果

誘発フォーカス形成不全と一致する結果が得られたので、ヒト細胞での HR 修復能解析結果と合わせて、この細胞でも変異 NBS1 が HR 修復能を低下させていると結論づけた。次に、これらの細胞を用いて、X 線照射後の体細胞突然変異頻度に HR 機能の攪乱がどう影響するのかを解析した。その結果、FHA ドメイン機能を失わせた NBS1 を発現させても突然変異頻度は変化しないことが明らかとなった。なお、低い線量 (2Gy) では、全長 NBS1 を高発現することで突然変異頻度がやや上昇する傾向が見られたこと

は、後述の部位特異的 DSB による突然変異の途中経過と合わせると大変興味深い。

FHA ドメイン変異 NBS1 の発現は、HR の機能低下により細胞の放射線感受性をあげる一方で、ゲノム安定性にはほとんど影響しないという我々の結果は、NBS1 の FHA ドメインが、がん放射線増感の有効な分子標的となり得るものであることを強く示唆する成果といえる。

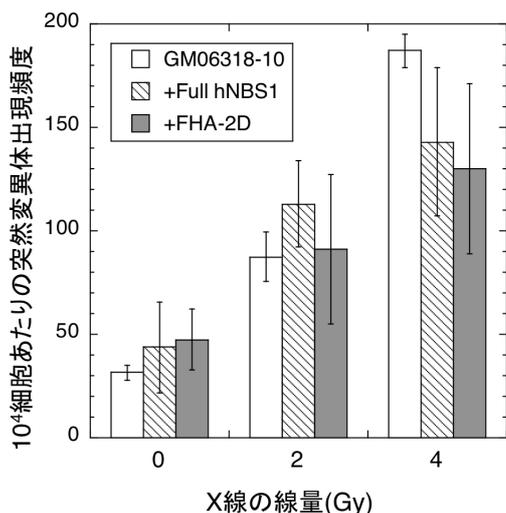


図3. 正常および変異 NBS1 発現細胞における放射線誘発体細胞突然変異頻度

以上の成果は、Ohara *et al.* 2014 の論文として J. Radiat. Res. 誌に報告した。

(2) ZFN を用いた新たな突然変異検出系の樹立と解析

この項目では当初、より高感度での検出を目指してヒト X 染色体導入ハムスター細胞を用いた突然変異の高感度検出系を用いることを計画した。しかし実験を進める中で、この細胞系では自然誘発突然変異の頻度が高いために ZFN 誘発突然変異でない変異体が多数出現し、変異スペクトルの解析が困難であることが判明した。そこで、いくつかのヒト培養細胞系 (hTERT 不死化株および SV40 不死化株) を用いて、より高効率で ZFN 誘発変異体が検出できる細胞を探索した。その結果、時間制御を可能にすることはできなかったものの、有効なデータが取得できる細胞アッセイシステムを組み上げることができた。この細胞を用いた解析により、DSB 修復の最初の過程である末端プロセッシングが突然変異の誘発に大きく関与することが明らかとなった。論文投稿の都合で詳細は記載しないが、現在は解析結果を論文として公表するための取り組みを続けている。これに加えて、CRISPR/Cas9 による新たなゲノム編集酵素系についてもテストした結果、こちらでも有効に動くことが確認できたが、突然変異の誘発効率は

ZFN とはあまり差がなかった。本研究の中で、ZFN を基本として制御因子を融合したタンパク質では DSB 導入効率が極端に低下することがわかったので、今後は Cas9 酵素による DSB 導入の時間制御にも取り組んでゆく予定である。

(3) 制御された DSB による HR 修復とその修飾要因の解析

本課題のもうひとつの主要な細胞系である時間・部位特異的 DSB による相同組換え修復系については、本課題の開始前にほぼ樹立していた細胞系 (震災で一部クローンが消失) を再構築し、これらを用いた解析を実施した。

本課題で再構築した時間・部位特異的な DSB による HR 修復アッセイ系では、レポーターに DSB を導入するヌクレアーゼに核移行制御機能を有するペプチドを付加している。実際に、薬剤処理で核移行を刺激すると刺激後 30 分から 1 時間後までの間に DSB 導入量がピークに達することが確認できている。そこで、細胞周期を同調あるいは損傷応答キナーゼの阻害による HR 修復効率の変化を調べたところ、いくつかの新たな発見を得ることができた。特に、細胞周期を通じての HR の制御については、従来時期に限定されていない可能性が強く示唆された。本課題の終了時点では、これらの新たな発見をさらに裏付けるデータもほぼ取得できており、追加実験を加えながら成果の主要部分に関する論文の受理に向けた取り組みを継続しているところである。

なお、本項目の成果の一部は、J. Cell Sci. 誌 (2014) および J. Radiat. Res. 誌 (2012) に掲載されている。

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4件)

Oliveira, D.V., Kato, A., Nakamura, K., Ikura, T., Okada, M., Kobayashi, J., Yanagihara, H., Saito, Y., Tauchi, H., Komatsu, K.: Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20. *Journal of Cell Science* 127:763-772, 2014. (査読有)

Ohara, M., Funyu, Y., Ebara, S., Sakamoto, Y., Seki, R., Iijima, K., Ohishi, A., Kobayashi, J., Komatsu, K., Tachibana, A., Tauchi, H.: Mutations in the FHA-domain of ectopically expressed NBS1 lead to radiosensitization and to no increase in somatic mutation rates via a partial suppression of homologous

recombination. *Journal of Radiation Research* 55(4),690-698, 2014. (査読有)

Someya, M., Sakata, K., Matsumoto, Y., Tauchi, H., Kai, M., Hareyama, M., Fukushima, M.: Effects of depletion of dihydropyrimidine dehydrogenase on focus formation and RPA phosphorylation. *Journal of Radiation Research* 53, 250-256, 2012. (査読有)

Ushigome, T., Shikazono, N., Fujii, K., Watanabe, R., Suzuki, M., Takakura, C., Tauchi, H., Yokoya A.: Yield of single-, double-strand breaks and nucleobase lesions in fully hydrated plasmid DNA films irradiated with high-LET charged particles. *Radiation Research* 177, 614-627, 2012. (査読有)

[学会発表](計 17 件)

坂本敬祥, 小林穂波, 小林健太, 本田千明, 飯島健太, 小林純也, 小松賢志, 立花章, 田内 広: 部位特異的 DNA 二重鎖切断により誘発される体細胞突然変異の解析. 日本放射線影響学会ワークショップ(富山) 2015.10.16

坂本裕貴, 大川沙織, 穀田哲也, 勅使河原愛, 飯島健太, 高田 穰, 小松賢志, 田内 広: 細胞周期による相同組換え修復効率の変化. 日本放射線影響学会ワークショップ(富山) 2015.10.16

Tauchi, H.: Function of NBS1 protein in the pathways responding to DNA double strand breaks induced by ionizing radiation. The 12th International Workshop on Microbeam Probes of Cellular Radiation Response (Tsuruga, Japan) 2015.5.31 国際会議招待講演
Sakamoto, Y., Okawa, S., Kokuta, T., Teshigahara, A., Iijima, K., Takata, M., Komatsu, K., Tauchi, H.: Cell cycle dependence of DNA double strand break repair by homology-directed repair. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), Kyoto, 2015.5.27

Sakamoto, K., Kobayashi, H., Kobayashi, K., Honda, C., Iijima, K., Kobayashi, J., Komatsu, K., Tachiban, A., Tauchi, H.: Analysis of mutation spectrum induced by a site specific DNA double strand break. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), Kyoto, 2015.5.27

Tauchi, H.: Cell cycle dependence for the efficiency of homology-directed repair of DNA double strand break. 広島大学原爆放射線医科学研究所国際シン

ポジウム(ポスター) 2015.3.2

Tauchi, H.: An experimental approach for analysis of biological effect of low dose radiation and factors affecting DSB repair fidelity 30th RBC-NIRS International Symposium (英語口演) 2015.2.20-21

田内 広, 坂本裕貴, 穀田哲也, 大川沙織, 小林健太, 小林純也, 飯島健太, 小松賢志: 細胞周期と NBS1 機能が DNA 二重鎖切断修復効率と精度に与える影響. 第 37 回日本分子生物学会年会ワークショップ(横浜) 2014.11.26

小林穂波, 小林健太, 本田千明, 立花 章, 田内 広: 部位特異的 DNA 二重鎖切断によって誘発された体細胞突然変異の解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会(鹿児島) 2014.10.1

坂本裕貴, 大川沙織, 穀田哲也, 勅使河原愛, 飯島健太, 高田 穰, 小松賢志, 田内 広: 相同組換え修復の細胞周期依存性解析. 日本放射線影響学会第 57 回大会(鹿児島) 2014.10.1

Ohara, M., Tanaka, A., Isaka, S., Tomatsu, S., Takata, M., Komatsu, K., Tatibana, A., Tauchi, H.: Modification of camptothecin sensitivity by PARP inhibitor in DNA double strand break repair deficient cell lines. 広島大学原爆放射線医科学研究所国際シンポジウム(ポスター) 2014.2.13

大原麻希, 阿部紘子, 田中 彩, 井坂早央里, 戸松静香, 高田 穰, 立花 章, 田内 広: DNA 二本鎖切断修復タンパク質欠損細胞の DNA 複製阻害剤感受性. 日本放射線影響学会第 56 回大会(青森) 2013.10.18
本田千明, 小林健太, 宮本智弘, 大原麻希, 立花 章, 田内 広: 人工ヌクレアーゼによって誘発した部位特異的 DSB による体細胞突然変異. 日本放射線影響学会第 56 回大会(青森) 2013.10.18

Ohara, M., Sakamoto, Y., Fukasaku, J., Komatsu, K., Matsuura, S., Tauchi, H.: Kinetics of Radiation-Induced DNA Double Strand Break Rejoining in DNA Repair Deficient Cells. 広島大学原爆放射線医科学研究所国際シンポジウム(ポスター) 2013.2.12

田内 広, 江原俊介, 船生悠美, 大原麻希, 宮本智弘, 関 良太, 小松賢志, 立花章: 高感度検出系を用いた放射線感受性修飾効果の解析. 日本放射線影響学会第 55 回大会(ワークショップ), 仙台, 2012.9
大原麻希, 阿部紘子, 深作直子, 田中 彩, 井坂早央里, 戸松静香, 田内 広: Nbs1/Ku70 二重欠損細胞の DNA 複製阻害剤感受性. 日本放射線影響学会第 55 回大会, 仙台, 2012.9

穀田 哲也, 勅使河原愛, 長谷川直己, 飯島健太, 高田 穰, 小松賢志, 田内

広：DNA 二重鎖切断修復機構の細胞周期依存性．日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台，2012.9

〔その他〕

ホームページ等

<http://tauchilab.sci.ibaraki.ac.jp>

6．研究組織

(1)研究代表者

田内 広 (TAUCHI HIROSHI)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：70216597

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし