

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25340042

研究課題名(和文) S期ヒト細胞におけるDNA二本鎖切断の修復過程に関する新しい概念の検証

研究課題名(英文) Repair pathway of DNA double strand breaks in S-phase cells

研究代表者

矢島 浩彦 (YAJIMA, Hirohiko)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 人材育成センター・主任研究員(任常)

研究者番号：30261895

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二本鎖切断(DSB)の修復経路に関する新たな知見を得るために、本研究を始めた。複雑な構造を持つDSBはresectionと呼ばれる相同組換え初期の反応で高頻度に処理されることを明らかにし、またヒトG1期細胞がresection反応を示すことも示した。この反応にはS/G2期と同様にCtIPが重要な役割を担っていること、resection開始後にも未知の機能を持っていることも明らかにした。また、重粒子線照射により複雑なDSBが生じた細胞では細胞老化、細胞死関連遺伝子が高いレベルで誘発されている事が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：This study was begun to extend our knowledge of the repair pathways for DNA double strand breaks (DSBs). We showed that complex DSBs efficiently activate the DNA end resection, an early step in homologous recombination (HR). It was also elucidated that human cells in the G1-phase exhibit resection activity, which requires CtIP as the activity in the S/G2-phase does. Furthermore, it was suggested that CtIP has unknown roles at the DSB sites following the initiation of resection. In addition, the signals for cell senescence and cell death were highly induced in cells following heavy ion beam-exposure, which produces complex-type DSBs.

研究分野：分子生物学、DNA損傷応答

キーワード：DNA二本鎖切断 DNA修復 相同組換え end resection CtIP

1. 研究開始当初の背景

(1) ヒト細胞における、DNA二本鎖切断(DSB)の主要な修復経路は非相同末端結合(NHEJ)と相同組換え(HR)である。

(2) HR反応には姉妹染色分体が存在していることが必須であるため、S/G2期でのみ起こると考えられる。

(3) HRの初期課程は、切断末端の2本のDNA鎖のうち一方が削り込まれて残る1本鎖が露出する反応で、DNA end resectionと呼ばれる。その始動にはCtIPが必要とされる。

2. 研究の目的

(1) 複雑な末端構造を持つDSBに対する修復課程を解析し、損傷の質の違いによる細胞応答の違いを明らかにする。

(2) 細胞周期によってDSB修復の制御がどのように異なっているかを明らかにする。

(3) DSB修復経路選択の鍵を握るCtIPの機能と性質を解析する。

3. 研究の方法

(1) 低LETのX線と、高LETで複雑なDSBを生じさせる重粒子線で培養細胞を照射し、非照射細胞と各照射細胞を各種の手法で解析し比較する。

(2) 細胞から調製したライセートを用い、特異的抗体を使ったウェスタンブロットによりDNA損傷応答関連タンパク質の量的変化やリン酸化等の修飾を解析する。

(3) 特異的抗体を利用した蛍光免疫染色法でDNA損傷応答関連タンパク質を検出し、細胞レベルの観察による解析を行う。

(4) コロニーフォーメーション法により、細胞生存率を検証する。

(5) HPRT遺伝子座の突然変異株を分離し、ゲノム内に生じたDSB修復の痕跡をエクソンPCR法によって解析する。

(6) 細胞老化検出キットを利用し、放射線照射後の細胞老化頻度を検証する。

(7) 定量PCR法により、放射線照射後の細胞運命関連遺伝子の発現量変動を解析する。

4. 研究成果

(1) まず、S期を中心として各細胞周期におけるresection活性を調べることが本研究

の初めの取り組みとして重要であった。検証の結果、ヒトS/G2期細胞に生じた複雑なDSBの80%以上はresectionを受けていることが明らかになった。さらに、30%前後のG1期細胞が重粒子線照射後にresection活性を示す事を明らかにした。また、S/G2期でのresectionの始動にCtIPがMre11とともに重要な役割を果たすことが知られているが、このG1期でのresection活性もCtIPに依存していることを明らかにした(DNA Repair, 2013)。この結果は、その後の他の研究グループからの報告でも確認され、機構の解明が進んでいる。

(2) CtIPはresection反応の始動の段階で機能するため、resection活性の細胞周期制御とDSB修復経路選択の機構を解明する上でも重要な因子である。CtIPがresectionの始動以外の機能を持っている可能性に関して詳細に検討した結果、放射線照射後の長時間に渡って低レベルのリン酸化状態を維持しながらCtIPがフォーカスを形成しており、そのリン酸化はATMだけでなくATRにも制御されていると考えられること、DNA損傷後にはCtIPの分解が始まり、DSB部位では新規合成されたCtIPタンパク質の積極的なリクルートが絶えず続いていると考えられることなどを明らかにした(Mutat Res, 2015)。これらのことからCtIPはresectionが進行した後も何らかの役割を果たしていると考えられ、resection後の修復過程の解明に重要な知見を得られた。

(3) さらに、CtIP機能の解明を進めるために相互作用タンパク質の探索を進めた。CtIP断片を用いた実験と細胞のライセートを用いた実験によって得られた相互作用タンパク質を質量分析によって同定したところ、幾つかの興味深いタンパク質が含まれていた。

(4) 重粒子線誘発の複雑なDSBがどのような経路で修復されているかを検討するために、重粒子線誘発HPRT遺伝子変異細胞株を分離した。ゲノム遺伝子内部での欠失配列を解析するためにエクソン領域のPCRを行ったところ、変異株の大多数は全てのエクソンを保持しているか逆に全てを失っているかのどちらかであった。損傷構造の違いによる修復方法の差を修復の痕跡を調べる事によって定量的に解析するためには、相当数の変異株を用いる必要があると判断される。

(5) 損傷の質の違いによる細胞運命の違いを検証したところ、高LET重粒子線照射によってX線照射よりも高頻度で細胞老化が誘発されていることが明らかになった。さらに、損傷の質の違いが細胞シグナルにどのような影響を及ぼしているかを検討するため、照射後の細胞運命関連遺伝子の発現レベルを定量PCRによって解析した。その結果、高LET

放射線では細胞老化、細胞死関連遺伝子が X 線に比べて高いレベルで誘発されている事が明らかになった。

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 8 件) 全て査読付き。
(*: corresponding author)

1) Su, F., Bhattacharya, S., Abdisalaam, S., Mukherjee, S., Yajima, H., Yang, Y., Mishra, R., Srinivasan, K., Ghose, S., Chen, D.J., Yannone, S.M. and Asaithamby, A. (2016) Replication stress induced site-specific phosphorylation targets WRN to the ubiquitin-proteasome pathway. *Oncotarget*. 7, 1, 46-65

2) Fujisawa, H., Nakajima, H., Sunada, S., Lee, Y., Hirakawa, H., Yajima, H., Fujimori, A., Uesaka, M. and Okayasu, R. (2015) VE-821, an ATR inhibitor, causes radiosensitization in human tumor cells irradiated with high LET radiation. *Radiation Oncology*. 10: 175, doi: 10.1186/s13014-015-0464-y

3) Yajima, H.* and Xue, L. (2016) DNA Repair Processes and Checkpoint Pathways in Human Cells Exposed to Heavy Ion Beams. *International Journal of Particle Therapy*. 2: 439-446, doi: 10.14338/IJPT-15-00020.1

4) Fujisawa, H., Fujimori, A., Okayasu, R., Uesaka, M. and Yajima, H.*. (2015) Novel characteristics of CtIP at damage-induced foci following the initiation of DNA end resection. *Mutation Research / Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 771, 36-44

5) Xue, L., Furusawa, Y., Okayasu, R., Miura, M., Cui, X., Liu, C., Hirayama, R., Matsumoto, Y., Yajima, H.* and Yu, D*. (2015) The complexity of DNA double strand break is a crucial factor for activating ATR signaling pathway for G2/M checkpoint regulation regardless of ATM function. *DNA repair*. 25, 72-83

6) Takahashi, M., Hirakawa, H., Yajima, H., Izumi-Nakajima, N., Okayasu, R., Fujimori, A. (2014) Carbon ion beam is more effective to induce cell death in sphere-type A172 human glioblastoma cells compared with X-rays. *Int. J. Radiat. Biol.* 90, 12, 1125-1132

7) Yajima, H.*, Fujisawa, H., Nakajima, H., Hirakawa, H., Jeggo, P.A., Okayasu, R. and Fujimori, A. (2013) The complexity of DNA double strand breaks is a critical factor enhancing end-resection. *DNA repair*. 12, 11, 936-946.

8) Hirota, Y., Masunaga, S.I., Kondo, N., Kawabata, S., Hirakawa, H., Yajima, H., Fujimori, A., Ono, K., Kuroiwa, T. and Miyatake, S.I. (2014) High linear-energy-transfer radiation can overcome radioresistance of glioma stem-like cells to low linear-energy-transfer radiation. *Journal of Radiation Research*. 55, 1, 75-83.

[学会発表] (計 14 件)

1) 中島 菜花子、矢島 浩彦「休止期細胞の DNA 修復機構」第 19 回癌治療増感研究シンポジウム. 2017. 2. 3~4 奈良文化会館 (奈良県・奈良市)

2) 矢島 浩彦、劉 翠華、薛 蓮、中島 菜花子、河合 秀彦「DNA end resection の誘発と細胞の応答」第 39 回日本分子生物学会年会. 2016. 11. 30~12. 2. パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

3) 矢島 浩彦、劉 翠華、薛 蓮、中島 菜花子、河合 秀彦「DNA 二本鎖切断の修復経路選択と細胞応答」日本放射線影響学会 第 59 回大会. 2016. 10. 26~28. JMS アステールプラザ (広島県・広島市)

4) 矢島 浩彦、劉 翠華、薛 蓮、小原 麻希、中島 菜花子、河合 秀彦、安井 明「複雑な構造を持つ DNA 二本鎖切断の修復経路と細胞応答」第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会大会 合同年会. 2015. 12. 1~4. 神戸ポートアイランド (兵庫県・神戸)

5) Hirohiko Yajima, Cuihua Liu, Lian Xue, Hiroshi Fujisawa, Nakako Izumi Nakajima and Hidehiko Kawai. 「Enhanced DNA end resection and subsequent responses during the processing of complex DNA double strand breaks induced by heavy ion beams」The 15th International Congress of Radiation Research. 2015. 5. 25~29 国立京都国際会館 (京都府・京都市)

6) 中島 菜花子、劉 翠華、矢島 浩彦「膜表面蛋白 NKG2D リガンド発現のがん種による放射線応答多様性と HDAC 阻害剤による発現増強効果」第 17 回癌治療増感研究シンポ

ジウム. 2015. 2. 6~7 奈良文化会館 (奈良県・奈良市)

7) Hirohiko Yajima, Lian Xue, Cuihua Liu, Hiroshi Fujisawa, Nakako Izumi Nakajima 「DNA repair and checkpoint pathways in human cells exposed to heavy ion radiation」 HIMAC International Symposium 2015 -20th Year Anniversary Event-. 2015. 1. 19~20 アキバホール (東京都・千代田区) 招待講演

8) 藤澤 寛、藤森 亮、岡安 隆一、上坂 充、矢島 浩彦 「DNA 二本鎖切断部位において CtIP は end resection 始動後に興味深い挙動を示す」第 37 回日本分子生物学会年会. 2014. 11. 25~27 パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

9) 藤澤 寛、藤森 亮、岡安 隆一、上坂 充、矢島 浩彦 「DNA 相同組換え修復の末端リセクションにおける CtIP タンパク質フォーカスに関する研究」日本放射線影響学会第 57 回大会. 2014. 10. 1~3 かがしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)

10) 矢島 浩彦、劉 翠華、中島 菜花子 「DNA 二本鎖切断の修復過程における DNA 末端の削り込みと細胞応答」日本放射線影響学会 第 57 回大会. 2014. 10. 1~3 かがしま県民交流センター (鹿児島県・鹿児島市)

11) 矢島 浩彦、藤澤 寛、中島 菜花子、平川 博一、Penelope A. Jeggo、岡安 隆一、藤森 亮. 「CtIP 依存的な DNA 二本鎖切断修復反応の解析」第 36 回日本分子生物学会年会. 2013. 12. 3~6 (兵庫県・神戸市)

12) Hirohiko Yajima, Hiroshi Fujisawa, Nakako Izumi Nakajima, Hirokazu Hirakawa, Penelope A. Jeggo, Ryuichi Okayasu and Akira Fujimori. Responses of CtIP to complex DNA double strand breaks. 29th RBC-NIRS International Symposium. 2013.11.28-29 コープリン京都 (京都府・京都市) 招待講演

13) 藤澤 寛、平川 博一、上坂 充、岡安 隆一、藤森 亮、矢島 浩彦 「DNA 二本鎖切断応答における末端リセクション機構に関する研究」日本放射線影響学会 第 56 回大会. 2013.10.18~20 ホテルクラウンパレス青森 (青森県・青森市)

14) 矢島 浩彦、藤澤 寛、中島 菜花子、平川 博一、Penelope A. Jeggo、岡安 隆一、藤森 亮 「複雑な構造を持つ DNA 二本鎖切断は DNA 末端リセクション反応を促進する」(2013 年) 日本放射線影響学会 第 56 回大会. 2013.10.18~20 ホテルクラウンパレス青森 (青森県・青森市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

矢島 浩彦 (YAJIMA, Hirohiko)

量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 人材育成センター・主任研究員

研究者番号： 30261895