

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：12101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25550023

研究課題名(和文) 分裂期細胞の放射線DNA二重鎖切断修復機構解明に向けたブレークスルーを目指して

研究課題名(英文) Analysis of radiation-induced DNA double strand break repair during cell cycle

研究代表者

田内 広 (Tsuchi, 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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分裂期にはDNA二重鎖切断(DSB)修復が起きにくいとされるが、全ての修復経路が機能しないのかどうかは未解明である。そこで精度の高い修復である相同組換えに着目し、独自開発した細胞系を用いてDSBに集まるタンパク質挙動の解析に取り組んだ。タンパク質とDNA相互作用の解析条件設定に手間取ったため、期間中に本格的データの取得を完了するには至らなかったが、同じ実験系を使って付加的に進めたDSBの相同組換え修復タンパク質が修復反応に与える影響の解析によって、変異型の組換え修復タンパク質を導入した細胞において相同組換え効率の有意な低下が誘発される事を明らかにし、この成果を含む学術誌論文を発表した。

研究成果の概要(英文)：DNA double strand break (DSB) is one of the most serious DNA damage which is often induced by ionizing radiation. To clarify whether DSB repair occurs during just before the cell division stage or not, we developed a site- and time-specific DSB induction system. By using the system, we tried to see the DSB-localizing proteins following DNA damage induction. The experiments are still in progress, but a part of our findings has been published in a scientific journal.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷修復 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

私たちの身体を構成する細胞は、常に多様な DNA 損傷の発生に曝されている。DNA 損傷を引き起こす原因には、放射線や紫外線、DNA 損傷剤などの他に、細胞自身の生理的な反応によるものもある。DNA 損傷の中でも、最も重篤とされる損傷が DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand break: DSB) である。DSB がうまく修復できるかどうかは、細胞の生死のみならず、突然変異や発がんなどを防ぐ働き、すなわち遺伝的安定性の維持にとっても非常に重要となる。最近大幅に進展しつつある DNA 損傷や修復に関する分子生物学的な解析結果から、DSB の修復には、非相同末端結合 (canonical non-homologous end joining: c-NHEJ)、相同組換え (homologous recombination: HR)、マイクロホモロジーを利用した再結合 (microhomology-mediated end joining: MMEJ) など、複数の経路が存在することが明らかになっている。また、DSB 修復機構は、放射線被ばくや DNA 複製阻害などのストレスに応答するのみならず、免疫担当細胞の成熟過程で起きる遺伝子再構成や減数分裂などにおいて、生物が自ら DSB 導入したあとに機能する普遍的な生体反応機構でもある。最近の研究から、これらの修復経路には、それぞれ異なるタンパク質が中心的な役割を担っていることや、それらタンパク質の一部は互い競合的に働いていることなどが明らかになってきた。一方で、細胞周期をはじめとする生体側の条件によって、これら複数の DSB 修復経路がどのように使い分けされているかは研究開始当初も現在もまだ十分に解明されないままである。

本課題で取り上げた細胞周期とは、細胞が DNA を複製したのちに分裂増殖する一連の過程を指す。細胞周期の中で、分裂期 (M 期) 細胞が放射線に最も感受性であることは古くから知られており、教科書にも載っている事実である。その理由として、M 期細胞のゲノム DNA は高度に凝縮されており、DNA 損傷修復に関わるタンパク質が DSB にアクセスできず、その結果として修復が困難となっているという説明が良くなされる。しかし、放射線量と生物効果の関係を見てみると、数 Gy レベルの線量 (ガンマ線の場合、2.5Gy では細胞核あたり 100 個程の DSB が生成されている) では M 期細胞が全滅することはない。本当に M 期細胞の修復能力が極端に低いのであれば、細胞あたり 100 個近い DSB を受けて M 期細胞がそれなりに生き残ることはないはずである。実際、本課題の代表者は、M 期に高 LET 放射線に照射された細胞で、その生存率から推定される値をはるかに上回る高頻度で体細胞突然変異が起きること、さらには高 LET 放射線被ばくでは M 期に限って大きな欠失を伴う組換え反応が起きていることを示すデータを報告した (Tsuchi *et al.*, J. Radiat. Res., 2009)。これらを考え合わせると、細胞分裂の M 期にも何らかの修復機構

がそれなりの効率で機能しているとするのが妥当であると考えた。例えば、減数分裂における相同染色体間の組換えには、高度に凝縮した染色体間で DSB の導入と相同組換えによる再結合が必須であり、このことは凝縮した染色体 DNA でも DSB 修復が行えることを明確に示す証拠である。

課題代表者の研究室では、DSB の導入部位と導入のタイミングが 1 時間程度の幅で調節できる細胞系を樹立し、相同組換えによる DSB 修復の細胞周期依存性を調べてきた。その結果、クロマチンが高度に凝縮している M 期細胞においても相同組換えによる DSB 修復が高效率で起きていることを見出した (現時点で未発表)。クロマチンが高度に凝縮している M 期は、DSB 修復が起きにくいとされてきたが、我々が発見した事実から、そうではないことが示された。その一方で、凝縮したクロマチンが、如何にして DNA 間の組換え修復を起こすのかについては、今のところ誰も答えを持っていない。少なくとも顕微鏡下で観察した時に、DSB を生じた染色体が大きく弛緩しているということはないため、DSB のごく近傍のわずかな領域でクロマチン構造変換と修復反応が起きている可能性を考えるのが妥当と思われる。加えて、減数分裂第一分裂で起きる凝縮したクロマチン間での組換え修復を考えると、M 期の DSB 再結合にも減数分裂第一分裂における DSB 再結合機構と共通した反応があることが推測できる。

本課題は、相同組換えによる DSB 修復における M 期と減数分裂の共通点と相違点を明らかにするという切り口から、これまで G1 期から G2 期にかけての分裂間期を中心に調べられてきた DSB 修復反応に対し、M 期におけるクロマチン構造と DSB 修復因子の集積状況の解析を行い、DSB 修復反応過程に関する新たな考え方を組み入れたいと考えたものである。具体的には、クロマチン免疫沈降法を主に用いて、クロマチン構造変換因子や修復因子が DSB 部位にどのようなタイミングでどのくらい集積するのかを解析し、凝縮したクロマチンに生じた DSB が本当に相同組換えで修復できるのか、そうであればどのような機構であるのかを解明する糸口を掴むことを狙った。

2. 研究の目的

課題代表者は、本課題を考えるきっかけとなった DNA 損傷修復の細胞周期依存性に関する研究の途上で、M 期細胞で相同組換え修復が高效率で起きることを示す直接的な証拠を得た (現時点では未発表)。しかし、この事実を証明するには、これまで修復が困難といわれた M 期のクロマチンにおいて、どのようにして DSB 修復が起きているかという分子機構を解明しなくてはならない。高度に凝縮したクロマチン状態で、しかも姉妹染色分体間のコヒーションを保ちながら、修復が進む過程を解析する有効なアプローチは無いば

かりか、本課題の計画時点で、M期の修復機構を扱った解析研究そのものが、代表者が知る限り存在しなかった。

本課題では、M期のDSB修復機構を解明するための新たなアプローチを開発してクロマチンの凝縮・コヒーションと損傷シグナルの関係を解析し、減数分裂における組換え反応との共通点や相違点を明らかにすることで、修復のキーとなるタンパク質を見つけ出して、DSB修復制御機構解明へのブレークスルーを掴むことを目指した。その一方で、本課題にはチャレンジングな要素があるだけに期間内で必ず論文となる成果が得られるという保証はないため、最低でも1報の論文成果につなげることを考え、主要な研究と同じ細胞系を活用して、DSBの相同組換え修復に中心的に関わるタンパク質の構造変化が相同組換え修復にどのように影響するかについての解析にも取り組んだ。

相同組換え修復は、DSBを精度良く修復できる経路とされている一方で、不適切な組換え修復が原因となって相同染色体間の乗り換えや組換えが起きれば、ゲノムの大きな変異やヘテロ接合性の消失(LOH)を誘発し、発がんの原因ともなりうる、いわば「両刃の剣」でもある。高LET放射線による体細胞突然変異で代表者が見出した「M期に大規模な欠失を伴う組換え反応が高頻度で起きている」という観察事実(Tauchi *et al.*, J. Radiat. Res. 2009)は、M期に確かに組換え反応が起きていること裏付ける間接的な証拠の1つでもある。

これまでほとんど解析されていないM期に着目し、他の細胞周期ステージや減数分裂とは異なるDSB修復制御機構を解明することは、放射線影響の詳細な分子機構解明のみならず、発がん過程におけるLOHの主要な生成機構の解明や、組換え中間体の新たな制御因子の解明などにもつながるものと考えた。

3. 研究の方法

本課題の遂行にあたっては、まず損傷したクロマチン部位にどのようなDSB修復因子が集まるのか解明することを主要な実験としつつ、同じ実験系を活用して論文成果につながる相同組換えに関する補助的な研究を並行させた。その項目は下記の2項目である。

(1) 細胞周期非同調細胞ならびにM期細胞を用いたクロマチン免疫沈降による修復タンパク質の挙動解析

M期における相同組換え機構を解析するにあたっては、代表者の研究室で独自に開発してきた特定部位にタイミングを制御しつつDSBが導入できる細胞系を用いた。当初は開発済みの系と開発中の系の両方を利用することも計画していたが、研究期間が限られているため、既に樹立済みでDSB導入の時間タイミングも明らかになっていた、SCneoレポーター(Johnson *et al.* 1999)を導入した細胞にI-SceIヌクレアーゼと核移行制御タ

ンパクの融合タンパク質を発現させた実験系(論文準備中)に絞って研究を進めた。この細胞系では、I-SceIヌクレアーゼがゲノムDNAに組み込んだSCneoレポーター遺伝子の特定部位にDSBを導入する。I-SceIの認識配列は18塩基と長く、哺乳類のゲノムDNA上には存在しないとされていることから、DSBはレポーター遺伝子特異的に導入される。この細胞系は、目的タンパク質の抗体を用いて共沈したDNA試料中にDSB部位あるいはDSB近傍(SCneoレポーターとその前後に付加したDNA配列)が含まれるかどうかをPCRによって容易に解析できる点で、他の細胞系にはないアドバンテージを有している。

実験を進めるにあたり、クロマチン免疫沈降法の条件設定から始める必要があったので、初年度はその条件設定に取り組んだ。薬剤処理によってI-SceI融合タンパク質の核移行を誘発し、その細胞試料に対してタンパク質クロスリンク反応、DSB集積タンパク質の特異抗体を用いた免疫沈降、タンパク質消化、PCRによるDSB誘導配列の検出を行った。クロマチン免疫沈降による実験条件が確定できたら、細胞を細胞周期のM期に同調したうえで、DSBを導入した細胞抽出物を試料に、クロマチン修飾因子および組換え修復反応に関わるタンパク質の抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行う。なお、この細胞系ではM期におけるDSB導入と修復のタイミングも通常と同様に制御可能であることをこれまでの実験で確認しており、DSB誘導処理後に最もDSBが多くなる時間から、数時間にわたって細胞周期を確認しながら細胞サンプルを回収して経時的な解析を実施することとした。

(2) 相同組換え修復に関わるタンパク質と修復反応との関連解析

DSBの相同組換え修復には非常に多くのタンパク質が関わっているが、中でも初期反応であるDSB末端プロセッシングの制御に関わるNBS1タンパク質は、RAD50およびMRE11と複合体(MRN複合体)を形成し、DSBのセンサーに近い機能を有していると考えられている。その機能不全は細胞の相同組換え能力を完全に失わせることがわかっているが(Tauchi *et al.* Nature 2002) そのような状況は細胞の生存すら危うい状態でもある。代表者は、相同組換え修復能を「がん放射線増感」に活用したいと考えており、相同組換えを部分的に低下させる分子標的として、NBS1タンパク質の機能ドメインに着目していた。NBS1タンパク質の機能の一部を失わせた時の相同組換え能力を解析するために、本課題で使用したのと同じSCneoレポーター細胞系を活用したのが本研究項目である。

実験では、まずNBS1タンパク質のアミノ末端側に存在し、MRN複合体の局在制御に深く関わるFHAドメインに変異を入れたNBS1タンパク質を発現するベクターを用意し、正

常な修復能を持つ細胞に導入した。導入した変異 NBS1 タンパク質にはタグ配列がついているので、内在性の NBS1 とはウエスタンブロットで区別ができる。このようにして作成した変異 NBS1 または正常 NBS1 を高発現する細胞を用いて相同組換え修復能力に変化が起きるのかを検証した。修復能力に変化があった場合は、その後、修復能かく乱による放射線感受性の変化と、体細胞突然変異頻度への影響を詳細に解析することとした。

4. 研究成果

クロマチン免疫沈降法は、ここ7、8年あまりの間に生命科学の研究手法として急速に広がった解析方法であるが、実験テーマや対象タンパク質に応じて処理条件を調整する必要がある。そもそもM期におけるDSB修復がどのようなタンパク質の働きで起きているかを明確に解析した例はなく、クロマチン免疫沈降法に関しても少し調整すればよいという状況ではなかった。初年度から細胞の破碎条件等を設定する実験に取り組んできたが、開始当初に予定していた補助者の異動や、機器（細胞破碎装置）を借用していた研究室が他大学に移るなどの事態が起き、途中から別の機種に変更するなど、条件が大きく変わった関係で、免疫沈降の条件設定に手間取ってしまった。そのため条件の詳細決定が2年目となり、この項目に関する当初目標を期間内で完了することはできなかった。しかしその一方で、同じ系を活用して並行して進めた実験では論文発表の一部に使えるデータを得ることができた。以下に、2つの項目ごとの状況ならびに成果を記述する。

(1) クロマチン免疫沈降法によるDSB集積タンパク質の解析

本課題は、相同組換えによるDSB修復がM期細胞でどのようにして起きるのかに着目し、クロマチン構造変換などの解析を通じてM期の凝縮したクロマチンにおいても相同組換えによるDSB修復機構が起きているのかどうかを解明する糸口を掴むことを狙ったものであった。M期における相同組換え機構を解析するにあたっては、独自に開発して樹立した時間および部位特異的にDSBが導入できる細胞系を用い、この細胞をM期に同調した上で、部位特異的にDSBを導入し、DSB部位への各種タンパク質の局在に関する時間変化をクロマチン免疫沈降法により解析するものである。クロマチン免疫沈降で解析対象とするDNAのPCR条件を決定し、免疫沈降の条件設定に取り組んできたが、予定していた実験補助者の異動があったことと、当初に他研究室で借用していた機器が教員の移動とともに使用できなくなったこともあって、クロマチン免疫沈降を安定に行うための条件確定に時間がかかってしまった。クロマチン免疫沈降の条件設定ができたのは2年目に入ってからであり、M期細胞での条件設定については期間の末になって取り組むこと

となった。計画期間の終了時点では、ようやく本格的なデータの取得に取りかかるところであり、本報告書に記載して論文投稿ができるような段階にまでは達していない。

しかし、チャレンジングなテーマの研究は予定どおりには進まないのが常であり、その中で、最終的には本格的なデータ取得の段階にまでたどり着いたことは、当初目的を達成していると考えて差し支えないものと思っている。本研究課題の実施により、M期における相同組換え機構を解析する基本的な実験システムは整ったので、今後も継続してデータを取得し、できるだけ早く論文として公表することを目指したいと考えている。

(2) 相同組換え修復に関わるタンパク質と修復反応との関連解析

クロマチン免疫沈降による解析が最終目標には達することができなかつた一方で、付加的に並行して進めたDSBの相同組換え修復タンパク質と修復反応の解析については、以下のような結果が得られた。（本研究経費による部分のみを記載する）

NBS1タンパク質のFHAドメインにアミノ酸変異を導入したFHA-2D変異型NBS1または全長の正常NBS1タンパク質をSCneoレポーター導入細胞に発現させた。その細胞を用いてI-SceIによるDSBの相同組換え修復効率を解析したところ、FHA-2D変異型NBS1を導入した細胞では、相同組換え効率の有意な低下が認められた。一方で、正常NBS1を高発現させた細胞では、相同組換え効率は有意でないものの若干上昇する傾向が見られた。FHA-2D変異型NBS1の発現による相同組換え効率の低下は、放射線照射後のMRE11フォーカス形成効率の減少と一致した。このことは、我々が以前に報告した、NBS1タンパク質がDNA損傷に応答したRMN複合体のフォーカス形成促進を通じて相同組換えを促進しているという結果をさらに裏付けるものであった。この成果は、並行して行った変異NBS1導入細胞の放射線感受性ならびに突然変異感受性の解析結果とあわせて、NBS1タンパク質の機能ドメインと放射線感受性および突然変異誘発に関する学術誌論文として公表した。

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1件)

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 (doi:
10.1093/jrr/rru011) 査読有

〔学会発表〕(計4件)

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, 2015年5月26日(京都国際会館、京都府京都市) 2015年2月採択決定

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, 2015年2月20日(コープイン京都、京都府京都市)

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、2014年10月1日(かごしま県民交流センター、鹿児島県鹿児島市)

坂本裕貴、深作直子、阿部紘子、田中 彩、戸松静香、大原麻希、高田 穰、小松賢志、立花 章、田内 広: DNA二重鎖切断修復欠損細胞におけるATM阻害の影響。日本放射線影響学会第56回大会、2013年10月18日(ホテル クラウンパレス青森、青森県青森市)

〔その他〕

研究室ホームページ:

<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