

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2013

課題番号：25550025

研究課題名(和文) 損傷乗り越えDNA合成における細胞分化と紫外線線量率効果

研究課題名(英文) Contribution of translesional DNA synthesis to UV-induced damage during embryogenesis and at low dose-rate.

研究代表者

小松 賢志 (Komatsu, Kenshi)

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：80124577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：損傷乗り越えDNA合成(以下TLS)は、ヌクレオチド除去修復とともに、紫外線損傷の重要な修復機構である。しかし、これら二種類の修復機構のヒト細胞の分化発生ならびに太陽紫外線程度の緩照射での役割は不明であった。本研究では、紫外線の緩照射装置の開発とTLS欠損細胞株の樹立を行った。実験結果は太陽紫外線程度の緩照射ではTLSが主要な役割を果たしていることを示した。また、Nbs1欠損マウスES細胞と同マウス繊維芽細胞を用いて紫外線感受性を検討した結果、TLSの機能が成体と胚で異なることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Translesional DNA synthesis (TLS) and nucleotide excision repair (NER) are two major pathways to repair UV-induced DNA damage, although their contributions under the sun-light or during the embryogenesis remain elusive. We developed here the UV-exposure apparatus at low dose rate, like sun-light, and also established the TLS-defective cell line. Present results showed that TLS is a critical repair pathway under low dose-rate of UV exposure, in comparison with that of NER, and both pathways have a differential role in the embryogenesis.

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：環境解析学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：損傷乗り越えDNA合成 NBS1

### 1. 研究開始当初の背景

損傷乗り越え DNA 合成 (Translesional DNA synthesis: TLS) は紫外線損傷の重要な防御機構であり、その欠失は色素性乾皮症バリエーション患者に見られるように紫外線高感受性および皮膚がんを高頻度に誘発する。TLS では複製型ポリメラーゼ I から TLS 型ポリメラーゼ II へのスイッチが起こるが、その開始機構は長い間不明であった。申請者のグループは、放射線感受性遺伝病として知られナイミーヘン症候群の蛋白 NBS1 がユビキチン・リガーゼ RAD18 を損傷部位にリクルートすることにより TLS を開始することを報告した (Yanagihara H, Mol Cell 2011)。実際、NBS1 欠損のマウス皮膚線維芽細胞では紫外線高感受性となる。しかし、興味あることに、NBS1 欠損のマウス ES 細胞では紫外線高感受性が見られず (Brugmans L, DNA Repair 2009)、細胞の分化程度により TLS の寄与が異なる可能性がある。実際、線虫のヌクレオチド除去修復 (NER) では、転写に共役した経路 (TC-NER) が発生後期で、ゲノム全体で働く経路 (GG-NER) が発生初期で優勢であり、発生ステージにより修復経路が異なることが知られている (Lans H, Plos Genet 2010)。一方、岩崎 (菱田) のグループは酵母の TLS 欠損株を用いて、実験室で用いる高線量率照射と比較して、環境中の太陽紫外線レベルの線量率では、TLS が NER に比較して大きな役割を果たすことを報告した (Hishida T, Nature 2009)。しかし、ほ乳類細胞でも同じなのか現在までに確認できていないので、ヒトやマウス細胞を用いた TLS の線量率効果の実証実験が必要である。

### 2. 研究の目的

夏の太陽に曝されると、チミン二量体のような紫外線損傷が皮膚細胞一個に 1 日あたり約 10 万個発生する。この DNA 損傷は基底組織の幹細胞とその分化細胞の両方に誘発されるが、特に幹細胞の紫外線感受性が皮膚障害の重篤度と密接に関連する。損傷乗り越え DNA 合成 (以下 TLS) は、ヌクレオチド除去修復とともに、紫外線感受性の重要因子である。従来の TLS 生物実験では皮膚線維芽細胞のような分化細胞を用い、また太陽紫外線の数百倍の線量率で照射されるなど実体が環境中とかけ離れた条件で研究されてきた。本研究では、TLS を開始させる蛋白 NBS1 を欠損したモデルマウスの ES 細胞と成体マウス線維芽細胞、およびそれぞれの野生型細胞を、太陽紫外線レベルの低線量率で照射して、環境中における TLS の防御的役割とその分子機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

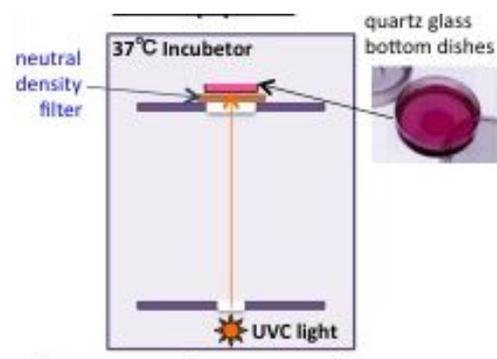
実験室で通常使用される紫外線殺菌灯は例え 4W 程度でも  $8.6 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (at 1m) の出力がある。CO<sub>2</sub> インキュベーターに設置する場合に、光源と細胞皿間の距離はせいぜい 40cm しか取れないので、そのときの紫外線強

度は  $53 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  (at 40cm) ( $=32 \text{ J}/\text{m}^2/\text{min}$  at 40cm) となる。これは、地球表面での晴天時の 254nm 紫外線線量率  $0.1 \text{ J}/\text{m}^2/\text{min}$  の約 300 倍の強度である。このため、減光フィルター (ND フィルター: オプトライン社特注) を用いて紫外線強度を減少させる紫外線の低線量率照射装置を開発する。また、この紫外線照射は数時間におよぶので、通常の紫外線照射のように一時的に培養液を除去して細胞上面から照射出来ない。このため、37 恒温 CO<sub>2</sub> インキュベーター内で石英ボトム培養皿を用いて下面から照射する。紫外線は、炭酸ガスならびに水分により吸収されるので、紫外線強度が減弱、また紫外線殺菌灯のスペクトルも低波長側にシフトすると予想される。はじめに実際に細胞が受ける線量率をにおいて正確に実測する。

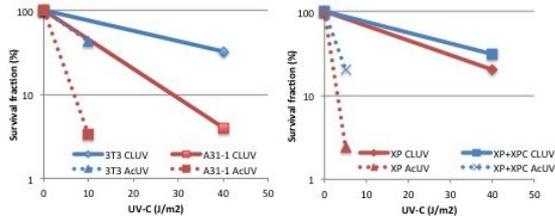
哺乳類細胞における低線量紫外線照射の効果: 酵母細胞を用いた実験系では、TLS 欠損細胞において観測される紫外線感受性が環境レベルの線量率で顕著に増感される (Hishida T, Nature 2009)。そこで、野性型マウス 3T3 繊維芽細胞および Nbs1 欠損マウスの皮膚線維芽細胞由来の A31-1 細胞 (Yanagihara, Mo. Cell, 2011)、ヌクレオチド除去修復欠損 XP 細胞に紫外線を、急照射 (約  $20 \text{ J}/\text{m}^2/\text{min}$ ) および緩照射 (約  $0.1 \text{ J}/\text{m}^2/\text{min}$ ) したときのコロニー法による細胞生存率を定量評価する。また、ヌクレオチド除去修復で修復されやすい 6.4 光産物と TLS により修復されるシクロブタン型チミン二量体を個別に Eliza 法で定量する。次に、Nbs1 欠損マウスの ES 細胞、の B/ B 細胞 (Brugmans L から入手済み、Yanagihara, Mo. Cell, 2011) を用いて、紫外線照射に対する細胞生存率と細胞増殖への影響を検証する。

### 4. 研究成果

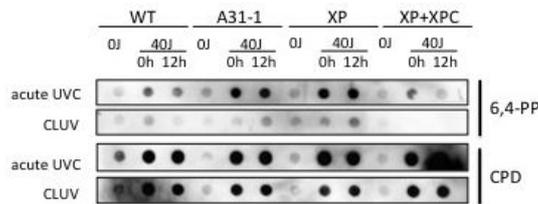
始めに、太陽紫外線と同じ強度の照射装置を通常の 37 度の CO<sub>2</sub> インキュベーター内に設計した。太陽紫外線の UVB 強度は  $15.2 \text{ kJ}/\text{m}^2/\text{日}$  として、この紫外線照射により同等の DNA 損傷 ( $0.6 \text{ CPD}/\text{kbp}$ ) を誘発する UVC 強度を  $40 \text{ J}/\text{m}^2$  と計算した。続いて、紫外線源と石英製の培養皿の距離と neutral density filter (ND フィルター) を用いて太陽紫外線と同程度の  $0.1 \text{ J}/\text{m}^2/\text{分}$  の紫外線線量率の照射装置を作製した (下図)。



この装置を用いて、NBS1 欠損 A31-1 細胞と XPC 欠損細胞に各線量の UV を照射してコロニー法による線量-生存率曲線を求めた。その結果、野生型の細胞では紫外線急照射 AcUV に比較して緩照射 (0.1J/m<sup>2</sup>/分:CLUV) では生存率が大きく回復した。それに対して NBS1 欠損細胞では、緩照射による生存率回復は部分的であった。一方、XPC 欠損細胞では、野生型細胞と同程度の回復が緩照射により得られた。



紫外線照射により二種類の DNA 損傷が誘発することが知られている。すなわち、TLS が関わるシクロブタン型チミン二量体とヌクレオチド除去修復が関わる 6-4 光産物である。Elisa 法を用いて紫外線照射後のそれぞれの DNA 損傷を定量した結果、6-4 光産物はいずれの細胞でも緩照射により除去されていた。これに対してシクロブタン型チミン二量体は緩照射でも細胞内に DNA 損傷として残存していた。



このことから、緩照射ではシクロブタン型チミン二量体の DNA 損傷の除去能力が細胞生存率に直接影響しており、同損傷を除去する能力が欠失した NBS1 欠損細胞が緩照射でも高感受性であることの原因と思われる。このことは、先行する酵母を用いた研究で (Nature, 2009)、TLS 欠損細胞が緩照射に対して高感受性であることと一致する。

続いて、Nbs1 欠損マウス ES 細胞と同マウス繊維芽細胞を用いて紫外線感受性を検討した。Nbs1 ノックアウトマウスは胎生致死である事が知られているので、通常は ES 細胞のみが入手可能である。我々は、偶然得られたキメラマウスの成体から繊維芽細胞を樹立して実験に用いた。その結果、Nbs1 欠損マウス ES 細胞の紫外線感受性はわずかであるが、Nbs1 欠損マウス成体繊維芽細胞は顕著な紫外線高感受性を示した。ヌクレオチド除去修復では胚発生ではゲノム全体で働く経路、そして成体では転写に共役した経路が使われることが知られているので Plos Genet.

2010)、我々の結果は TLS の機能が成体と胚で異なることを示唆している。

## 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 7 件)

Oliveira DV, 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. *J Cell Sci*, 127: 763-772, 2014. 査読あり doi: 10.1242/jcs.135855

Iwahori S, Kohmon D, Kobayashi J, Tani Y, Yugawa T, Komatsu K, Kiyono T, Sugimoto N, Fujita M. ATM regulates Cdt1 stability during the unperturbed S phase to prevent re-replication. *Cell Cycle*, 13:471-481, 2014. 査読あり doi: 10.4161/cc.27274.

Maki Ohara, Yumi Funyu, Shunsuke Ebara, Yuki Sakamoto, Ryota Seki, Kenta Iijima, Akiko Ohishi, Junya Kobayashi, Kenshi Komatsu, Akira Tachibana, and Hiroshi Tauchi. 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. *J. Radiat. Res.* 2014, in press 査読あり <http://jrr.oxfordjournals.org/>

Yoshida T, Awaya T, Shibata M, Kato T, Numabe H, Kobayashi J, Komatsu K, Heike T. Hypergonadotropic Hypogonadism and Hypersegmented Neutrophils in a Patient with Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder: Potential Diagnostic Clues? *Am J Med Genet A*, in press, 2014 査読あり doi: 10.1002/ajmg.a.36546

Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:2969-74, 2013. 査読あり doi: 10.1073/pnas.1222694110.

Saito Y, Takeda J, Okada M, Kobayashi J, Kato A, Hirota K, Taoka M, Matsumoto T, Komatsu K, Isobe T. The proteasome factor Bag101 binds to Rad22 and suppresses homologous recombination. *Sci Rep*, 3:2022, 2013. 査読あり

Shimada M, Hirayama R, Komatsu K. High LET radiation amplifies centrosome overduplication through a pathway of -tubulin monoubiquitination. *International Journal of Radiation*

Oncology · Biology · Physics. 86:358-365,  
2013 査 読 あ り doi:  
10.1016/j.ijrobp.2013.01.010.

〔学会発表〕(計 13 件)

小松賢志: 若年期マウスの DNA 修復能力と放射線感受性、環境研セミナー、2013 年 8 月 30 日、六ヶ所村(招待講演)

小松賢志: 低線量影響と DNA 修復 -良い修復と悪い修復-、保物セミナー、2013 年 12 月 5 日、大阪市(招待講演)

小松賢志、加藤晃弘: 放射線/制がん剤の細胞感受性における NBS1 の役割と阻害剤スクリーニング、第 16 回癌治療増感研究シンポジウム、2014 年 2 月 8 日、奈良市(招待講演)

Junya Kobayashi, Hiroko Fujimoto, Yuichiro Saito, Ikue Hayashi, David J Chen, Kenshi Komatsu. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. 3rd Asian Congress of Radiation Research (ACRR2013), 2013 年 5 月, Beijing, China.

Junya Kobayashi, Taro Kawai, Hiroko Fujimoto, Takeo Kato, Shinya Matsuura, Shizuo Akira, Kenshi Komatsu. The role of cytoplasmic MRE11 and its relationship with ATM. 15th International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (ATW2013), 2013 年 7 月, Birmingham, UK.

小林純也、藤本浩子、奥井理予、加藤竹雄、Martin Lavin、松浦伸也、小松賢志。酸化ストレスによる ATM キナーゼの活性制御ワークショップ「放射線生物学と活性酸素(酸化ストレス)その 3. ゲノム損傷応答と細胞質酸化ストレス応答のクロストーク」・日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月、青森。

柳原啓見、加藤晃弘、小林純也、齋藤裕一朗、前川貴則、谷崎美智、小松賢志。NBS1 による損傷乗り越え DNA 合成開始機構とモデルマウスの開発、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月、青森

小林純也、藤本浩子、齋藤裕一朗、真下知士、武田俊一、小松賢志。DNA 二重鎖切断端の resection 制御を通じた DSB 修復機構の選択 ワークショップ「DNA 二重鎖切断の end-resection と修復機構の選択・制御」・第 36 回日本分子生物学会年会 2013 年 12 月、神戸

A Kato, H Yanagihara, K Komatsu. Distinct domains of NBS1 separately function in IR- and UV-damage response. The DNA damage response in cell physiology and disease, 2013 年 10 月、Cape Sounio(ギリシャ)

加藤晃弘、柳原啓見、本田浩章、柿沼志津子、島田義也、西村まゆみ、品川まゆみ、中村恭介、藤本浩子、小林純也、小松賢志。マウスを用いた小児期被ばくの放射線感受性

と DNA 修復能の解析、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月、青森

齋藤裕一朗、井原誠、平山亮一、加藤晃弘、小林純也、小松賢志。レポーター遺伝子を用いた生存率曲線定量モデル“Saturable Repair Model”の生物学的検証、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月、青森

前川貴則、柳原啓見、小林純也、加藤晃弘、安井明、小松賢志: アルキル化損傷 DNA のミスマッチ修復における NBS1 の役割、日本放射線影響学会第 56 回大会、2013 年 10 月、青森

A Kato, H Yanagihara, J Kobayashi, Y Saito, D Oliveira, C Weemaes, and K Komatsu. NBS1 plays a role in UV damage response through physical interaction with RAD18. International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases: Disorders of DNA Damage Response -Bench to Bedside-, 2014 年、3 月、神戸

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/Genome/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小松 賢志 (Komatsu Kenshi)

京都大学/放射線生物研究センター 教授

研究者番号: 80124577

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号: