

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 26 日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640066

研究課題名(和文)ゲノム損傷部位輸送機構の解明

研究課題名(英文)Study of the movement of damaged DNA

研究代表者

田代 聡 (Tashiro, Satoshi)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：20243610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ゲノム損傷部位が修復のために動くのか、という仮説の検証に取り組んだ。このために、まず特定の染色体部位にDNA損傷を誘導するとともに損傷DNAをFISH法により可視化する手法を確立した。現在、これらの実験により得られた画像データの統計的解析を進めている。一方、我々は過剰発現されたゲノム修復酵素RAD51が、細胞核内の束状領域に集積されることを見いだしている。損傷DNA結合タンパク質RPAとRAD51の免疫蛍光抗体法を用いた解析により、RPAがRAD51が束状に集積する場所に移動することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the movement of damaged DNA. For this purpose, we have established a method to induce DNA damage at a specific DNA sites and to visualize the region by FISH technique. We are now analyzing the numerous images obtained by these experiments. We also found that over-expressed DNA repair protein RAD51 is accumulated at bundle like nuclear compartments. Immunofluorescence analysis revealed that RPA, a single strand binding protein, moved into the bundle like nuclear zone after induction of DNA damage. We are now preparing a manuscript including these new findings obtained by this project.

研究分野：放射線生物学

キーワード：相同組換え 細胞核構造

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 二本鎖切断(DSBs)の修復エラーは、染色体転座などの形成から発がんにつながる。DSBs の相同組換え修復は、無傷の相同部位を鋳型として修復するため、エラーが起きにくい修復機構と考えられている。しかし、ヒト細胞では相同染色体が別々の染色体領域を形成し近接しておらず、また複製直後の姉妹染色体についても近傍にはあるが接していないため、相同組換え修復のため相同部位を損傷部位に近づける必要がある。しかし、その詳細は未だ不明である。最近、ゲノム損傷部位における non-coding RNA の転写が、ゲノム損傷応答に重要である事が報告された。この報告では、修復関連蛋白質による核内フォーカスの形成に DICER など non-coding RNA の転写機構が必要であるとしているが、相同組換え修復との関連は不明である。一方、酵母の減数分裂期における組換え反応では、特異的な部位の転写反応が相同部位の近接に必要であることが報告されている。

## 2. 研究の目的

本研究では、「相同組換え修復では、相同部位を損傷部位に近づけるために転写反応が必要である。」という仮説を検証するため、1) 損傷部位とその相同部位の位置関係の経時的变化、2) 転写関連因子や DICER や DROSHA など non-coding RNA に関わる因子の発現抑制などによるゲノム損傷部位での相同部位近接への影響、を検討することを目的とした。

本研究は、損傷部位とその相同部位を近接させるメカニズムに転写反応が用いられるという仮説の証明に、FISH 法や Chromosome Conformation Capture Technology を用いて取り組む新しい角度からゲノム修復研究である。相同組換え修復は様々なゲノム損傷の修復に関与しているため、本研究を推進することでその分子機構が解明されることは、細胞がん化やがん細胞の悪性化に関連するゲノム不安定性の分子機構の解明につながる考えた。

## 3. 研究の方法

平成25年度は、TALEN 法や I-SceI などを用いた特定の染色体部位に DNA 損傷を誘導する手法を確立するとともに、FISH 法を用いた相同部位の近接についての評価法を確立する。

1) 染色体 DNA の特定部位へのゲノム損傷誘導法の確立  
染色体 DNA の特定部位へのゲノム損傷誘導法特定の染色体領域にゲノム損傷を誘導す

るために、以下の2つの実験系を確立する。  
(1) 二次性白血病の疾患特異的染色体転座 11q23 の転座切断点集中領域である MLL 遺伝子 BCR 領域に TALEffector Nucleases (TALEN)法を用いて特異的な DNA 二本鎖切断を誘導する。

(2) ヒト細胞には存在しない制限酵素部位 I-SceI site を組み込んだ培養細胞を用いて、I-SceI の発現によりゲノム損傷を誘導する。

2) FISH 法を用いたゲノム損傷誘導後の相同部位近接の検討

TALEN による MLL 遺伝子 BCR 領域への DNA 二本鎖切断誘導後、FISH 法を用いて MLL 遺伝子座間の距離を経時的に解析する。転写関連因子や non-coding RNA に関わる RNase である DICER や DROSHA の siRNA を用いた発現抑制実験を行い、MLL 遺伝子座間の距離への影響を検討する。さらに、相同組換え修復に関わる RAD51 などの因子や、DSBs 修復のもう一つの主要な経路である非相同末端融合に関連する Ku70/80、DNA-PKcs や ligaseIV についても発現抑制実験や欠損細胞などを用いて、損傷部位とその相同部位の距離への影響を検討する。RNase 処理による RNA 欠乏状態の誘導の損傷部位と相同部位との距離に与える影響についても検討する。

平成26年度は、Chromosome Conformation Capture Technology を用いた相同部位の近接についての評価法の確立に取り組む。

3) Chromosome Conformation Capture Technology を用いたゲノム損傷誘導後の相同部位近接の検討

I-SceI や TALEN 法を用いてゲノム損傷を誘導した細胞における相同染色体領域の近接を Chromosome Conformation Capture Technology を用いて解析する。FISH 法による検討と同様に、転写関連因子、DICER や DROSHA、相同組換え修復に関わる RAD51 などの因子や、非相同末端融合に重要な Ku70/80、DNA-PKcs や ligaseIV についての siRNA による発現抑制細胞や欠損細胞などを用いて、あるいは RNase 処理による RNA 欠乏状態の誘導による相同染色体の近接への影響を検討する。さらに、I-SceI の実験系では、相同組換えを GFP の発現により確認できる細胞を用いて、これらの条件の相同組換えへの影響を検討する。

## 4. 研究成果

本研究では、「相同組換え修復では、相同部位を損傷部位に近づけるために転写反応が必要である。」という仮説を検証した。このために、1) 損傷部位とその相同部位の位置関係の経時的变化、2) DICER や DROSHA など non-coding RNA に係わる RNase の発現抑制によるゲノム損傷部位での相同部位近接への影響を検討した。

平成 25 年度には、TALEN 法や I-SceI などを用いた特定の染色体部位に DNA 損傷を誘導する手法を確立した。平成 26 年には、切断された DNA 断片を FISH 法により可視化することで局在の解析を行った。特に、画像解析を効率的に進めるために、画像取得、解析のプロセスの自動化を進めた。現在、これらの実験により得られた画像データの統計的解析を行っている。また、DNA 可視化には、特定の DNA 塩基配列に結合する TALE タンパク質に蛍光タンパク質を融合することで、特定の DNA 領域を蛍光標識する実験系の開発を試みたが、シグナル・ノイズ比が低く、特異的なシグナルを検出することが困難であった。このため、米国 NIH Tom Misteli 博士から、2 カ所の DNA 二本鎖切断部位の両端を蛍光標識が可能な細胞の供与を受け、現在切断された DNA 断片がどのような動態を示すのか、検討を行っている。

一方、我々は過剰発現された RAD51 が、細胞核内の束状の領域に集積されることを見いだしている。興味深いことに、DNA 二本鎖切断の相同組換え修復のために、一本鎖にされた DNA に特異的に結合する RPA タンパク質と相同組換えの組換え酵素である RAD51 の免疫蛍光抗体法を用いた解析により、RPA のシグナルが時間経過とともに RAD51 が束状に集積する場所に移動することが明らかとなり、現在論文の投稿準備中である。

#### 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 10 件)

1. Liu NA, Sun J, Kono K, Horikoshi Y, Ikura T, Tong X, Haraguchi T, Tashiro S. Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. *FASEB J*. 査読有, 2015;29(6):2514-25.

2. Toma A, Takahashi TS, Sato Y, Yamagata A, Goto-Ito S, Nakada S, Fukuto A, Horikoshi Y, Tashiro S, Fukai S. Structural basis for ubiquitin recognition by ubiquitin-binding zinc finger of FAAP20. *PLoS One*. 査読有, 2015;10(3):e0120887.

3. Nishibuchi I, Suzuki H, Kinomura A, Sun J, Liu NA, Horikoshi Y, Shima H, Kusakabe M, Harata M, Fukagawa T, Ikura T, Ishida T, Nagata Y, Tashiro S. Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 査読有, 2014;89(4):736-44.

4. Ishida M, Ishida T, Tashiro S, Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. *PLoS One*. 査読有, 2014;9(8):e103993.

5. Machida S, Takaku M, Ikura M, Sun J, Suzuki H, Kobayashi W, Kinomura A, Osakabe A, Tachiwana H, Horikoshi Y, Fukuto A, Matsuda R, Ura K, Tashiro S, Ikura T, Kurumizaka H. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci Rep*. 査読有, 2014;4:4863.

6. Shima H, Suzuki H, Sun J, Kono K, Shi L, Kinomura A, Horikoshi Y, Ikura T, Ikura M, Kanaar R, Igarashi K, Saitoh H, Kurumizaka H, Tashiro S. Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites of DNA damage. *J Cell Sci*. 査読有, 2013;126(Pt 22):5284-92.

7. Sakogawa K, Aoki Y, Misumi K, Hamai Y, Emi M, Hihara J, Shi L, Kono K, Horikoshi Y, Sun J, Ikura T, Okada M, Tashiro S. Involvement of homologous recombination in the synergism between cisplatin and poly (ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Sci*. 査読有, 2013;104(12):1593-9.

8. Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H, Ikura T, Niida H, Nakanishi M, Okada M, Tashiro S. Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. *Int J Oncol*. 査読有, 2013;42(6):1951-60.

9. Fujita K, Nakamura Y, Oka T, Ito H, Tamura T, Tagawa K, Sasabe T, Katsuta A, Motoki K, Shiwaku H, Sone M, Yoshida C, Katsuno M, Eishi Y, Murata M, Taylor JP, Wanker EE, Kono K, Tashiro S, Sobue G, La Spada AR, Okazawa H. A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA repair in multiple polyglutamine diseases. *Nat Commun*. 査読有, 2013;4:1816.

10. Nakano Y, Chayama K, Ochi H, Toshishige M, Hayashida Y, Miki D, Hayes CN, Suzuki H, Tokuyama T, Oda N, Suenari K, Uchimura-Makita Y, Kajihara K, Sairaku A, Motoda C, Fujiwara M, Watanabe Y, Yoshida Y, Ohkubo K, Watanabe I, Nogami A, Hasegawa K, Watanabe H, Endo N, Aiba T, Shimizu W,

Ohno S, Horie M, Arihiro K, Tashiro S, Makita N, Kihara Y. A nonsynonymous polymorphism in semaphorin 3A as a risk factor for human unexplained cardiac arrest with documented ventricular fibrillation. PLoS Genet. 査読有, 2013;9(4):e1003364.

〔学会発表〕(計 8 件)

1. 田代 聡, 放射線によるゲノム損傷と修復、広島医学会総会シンポジウム, 2014 年 11 月 9 日, 広島市

2. 田代 聡, 染色体ストレス応答の再構成と複合システムとしての理解, 第 87 回日本生化学会総会シンポジウム, 2014 年 10 月 15 日, 京都市

3. 田代 聡, 医療放射線被ばくによるゲノム損傷評価法の確立, 日本放射線影響学会第 57 回大会シンポジウム, 2014 年 10 月 3 日, 鹿児島市

4. 田代 聡, 相同組換え修復における損傷クロマチン動態, 第 52 回日本生物物理学会, 2014 年 9 月 26 日, 札幌

5. Tashiro S, Nuclear topography of homologous recombination repair, Cold Spring Harbor Meeting, 2014 年 8 月 23 日, New York U.S.A.

6. 田代 聡, 損傷クロマチンの細胞核内動態, 日本放射線影響学会第 56 回大会シンポジウム, 2013 年 10 月 19 日, 青森市

7. 田代 聡, SUMO 修飾システムによるゲノム損傷部位への RAD51 集積制御, 第 72 回日本癌学会総会, 2013 年 10 月 4 日, 横浜市

8. 田代 聡, 染色体ストレス応答ネットワーク研究の新基軸, 第 86 回日本生化学会総会シンポジウム, 2013 年 9 月 12 日, 横浜市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://home.hiroshima-u.ac.jp/cellbio/saito/Welcome.html>

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
田代 聡 (TASHIRO SATOSHI)  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授  
研究者番号 : 20243610

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号 :