

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550025

研究課題名(和文)放射線Saturated Repairモデルのレポーター遺伝子を用いた実験的検証

研究課題名(英文)The experimental verification of saturated repair model by using repair reporter genes.

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・研究員

研究者番号：80124577

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)：本研究の一連の実験により、相同組換え修復が低線量の一定範囲でしか働かず、中高線量では修復能がsaturate(飽和)することが確認できた。一方、非相同末端再結合は放射線量に依らずにほぼ一定の修復能を維持しているため、両修復が機能する低線量では放射線抵抗性、いわゆる擬似しきい値、が存在することになる。このように本研究は、D. LeaやK. H. Chadwick & H. P. Leenhoutsが提唱した物理的損傷ではなく、生物学的な修復能に基づいて、“生存曲線の肩”を説明することに成功した。

研究成果の概要(英文)：Present results confirmed the saturation of DNA repair by using the reporter genes, in which the homologous recombination repair functions within a limited region at a low dose. In contrast, non-homologous end-joining has constant activity irrespective of the radiation dose. As a result, the cells exposed to a low dose can survive due to both functional repair pathways: homologous recombination and non-homologous end-joining, while non-homologous end-joining is sole repair pathway at a higher dose. Thus, biological model based on repair activity of cells became plausible to explain the quasi-threshold of radiation survival curve.

研究分野：放射線生物学

キーワード：相同組換え修復 非相同末端再結合 細胞生存曲線の肩 saturated repair model

1. 研究開始当初の背景

T.T.Puck は 1956 年には乳類細胞のコロニー培養技法を開発した。この手法を用いて放射線照射による細胞生存率を求めると、高線量域では放射線線量に対して生存率が直線的（縦軸を対数表記の場合）に減少する。これに対して、低線量域では放射線致死効果に抵抗性がみられる擬似しきい値がある曲線（いわゆる“生存曲線の肩”）になることが明らかとなった。その後 60 年以上にわたって繰り返し実験が行われたが、すべての正常細胞およびがん細胞が擬似しきい値を示した。この低線量での擬似しきい値は D. Lea による標的理論、そして K. H. Chadwick & H. P. Leenhouts によるモデルなどで説明され、数式化された。これらはいずれも、放射線により誘発される損傷の存在を仮定して構築された物理学的損傷モデルである。このため、標的理論では低線量で実測値と一致せず、またモデルでは高線量域で実測値と一致しない。モデルの基礎になった仮説と実際の生物現象が異なっていることに原因すると考えられる。これに対して E. L. Powers (1962) は細胞の修復能力が放射線線量に依存して低下、高線量ではその修復能力が一定値に飽和する Saturated Repair モデルを提唱した。その後、このモデルは T. Alper (1979) により数式化され、さらに LET 効果や低線量率効果も説明可能であることが D. T. Goodhead により示された。しかし、残念ながら当時の生物実験技術では、放射線線量により変化する DNA 修復能力を定量的に評価することは不可能であった。

2. 研究の目的

我々は、既にレポーター遺伝子を用いて相同組み換え修復 (H. Tauchi, et al., Nature, 2002; H. Yanagihara, et al., Mol Cell, 2011) および非相同末端再結合の定量測定方法 (K. Nakamura, et al., Mol Cell, 2011) を報告した。我が国のがんの放射線治療では 1 回線量として 2Gy 週 5 回の照射を行う施設が多い。従って、60 ~ 78Gy/30 ~ 39 回/6 ~ 8 週が標準的な治療法になっている。また、原発事故での作業員や住民の放射線リスク評価には低線量での放射線感受性を正確に評価することが極めて重要である。このため本研究は、これらのレポーター遺伝子技術を用いた低線量放射線照射時の修復能の測定による Saturated Repair モデルの検証を目的とする。

3. 研究の方法

(1) DNA 修復の定点観測法：放射線照射による DNA 二重鎖切断は細胞ゲノム DNA 上にランダムに発生する。このため、ゲノム情報に基づいた遺伝子レベルの解析が困難であると思われる。本研究では単一コピーのレポーター遺伝子を予め導入した HeLa 細胞を用いて、放射線により発生した多数の DNA 二重鎖切断数（放射線線量に比例）がレポータ

ー遺伝子上の DNA 二重鎖切断にどのように影響するかを調べた。本研究では相同組み換え修復レポーター遺伝子として M. Jasin らによって開発された DR-GFP、そして非相同末端再結合レポーター遺伝子として J. Dahm-Daphi らによって開発された pEJ を用いた。DR-GFP アッセイおよび pEJ アッセイは既に我々が報告した方法に準じて行った。すなわち、HeLa 細胞に DR-GFP および pEJ 遺伝子を導入後、単一コピーであることをサザンブロットで確認した。アッセイは、初めに I-SceI 制限酵素を発現する 50 μg の pCBASce DR-GFP アッセイ；pCBAS 処理なしと処理ありプラスミドをエレクトロポレーション法で HeLa 細胞に transient に導入した。細胞培養を 2 日間続けて、フローサイトメーター (FACS Calibur, BD) で GFP 陽性細胞をカウントした。次に、pCBAS 導入とフローサイトメーターの間に線 0.5-7.0Gy 照射 (Gammacell 140) して、GFP 陽性細胞数から相同組み換え修復能の変化（減少）を定量した。同様の方法により、pEJ 遺伝子を導入した HeLa 細胞についても非相同末端再結合の変化を定量した。また、これと併行して、0.5-10 Gy の線照射した時の HeLa 細胞の生存率曲線をコロニー法により正確に求めた。

(2) 修復タンパク質の動態：HeLa 細胞を 0.5 Gy および 5.0Gy 照射 0.5 時間から 24 時間後、PBS 洗浄、ライシス液溶解、遠心後の溶液を RAD51 抗体および RPA 抗体を用いてウエスタンブロットにより相同組換えタンパクの損傷部位への蓄積を定量した。続いて、HeLa 細胞を 0.5 Gy および 5.0Gy 照射 0.5 時間から 24 時間後に 4%ホルムアルデヒド固定後、それぞれの抗体を用いて免疫染色した RAD51 フォーカスおよび RPA フォーカスを共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus: Fv300) によりカウントした。非相同末端再結合のタンパク質には免疫染色法を使えないので、リン酸化抗体を用いて DNA-PKcs の自己リン酸化能を定量測定した。

4. 研究成果

(1) DNA 修復の定点観測法：レポーター遺伝子を用いた DNA 修復能の測定は優れた方法であるが、人工的に発生させた DNA 二重鎖切断の再結合を比較することで修復タンパクが欠損した細胞などに利用が限られていた。DNA 二重鎖切断が数十個発生、例えば 2Gy 照射では 80 個の DNA 二重鎖切断が生成、したときの修復能は従来測定されることはなかった。我々は、レポーター遺伝子用に一個の DNA 二重鎖切断が発生するように設定した HeLa 細胞に、放射線照射により 20 個 (0.5Gy) から 280 個 (7Gy) の DNA 二重鎖切断を発生する線を照射して、DNA 二重鎖切断一個の場合の修復能と比較した（我々は DNA 修復能の定点観測法と命名した）。始めに相同組み換え修復のレポーター遺伝子 DR-GFP で測定した結果、驚いたことに放射線線量とともに相同

組換え修復が低下した。7Gy 照射では非照射の場合の 1/10 以下になった(学会発表)。その一方で、0.5Gy 照射では相同組換えの顕著な減少は見られなかった。一方、非相同末端再結合のレポーター遺伝子 pEJ を用いて測定した結果は、修復能の低下はわずかであった。7Gy 照射により細胞死が起こることや制限酵素用の pCBAS の発現が低下することを考慮すると、非相同末端再結合能は 0.5Gy から 7.0Gy 照射の範囲でほぼ一定と見なされた。レポーター遺伝子実験の結果から、HeLa 細胞で相同組換え修復と非相同末端再結合のいずれが優勢であるかは判断できない。P Jeggo (サセックス大学) は 2Gy 照射したほ乳類細胞の非相同末端再結合は G2 期で 70% を占めると推定している。我々のレポーター遺伝子の測定では、2Gy 照射により相同組換えが 50% に低下することから、ごく低線量 (0.5Gy) では相同組換え修復と非相同末端再結合はおよそ半分ずつ寄与していると考えられた。

(2) 修復タンパク質の動態: レポーター遺伝子の測定は、相同組換え修復が放射線線量依存性に低下することを示したので、確認のために相同組換え修復タンパクの蓄積をウエスタンブロット法および免疫染色法で試みた。0.5Gy 照射では RAD51 フォーカスが照射直後に DNA 二重鎖切断部位に集合してドット状のフォーカスを形成した。その一方で、7Gy 照射でも RAD51 フォーカスの形成が行われたが、照射後数時間後であった。相同組換えが開始して一重鎖 DNA が生成すると RPA タンパクがこれを取り巻くように蓄積、その後 RAD51 タンパクと交換することが知られている。そこで、RPA タンパクのフォーカス形成を測定した結果、0.5Gy 照射および 7.0Gy 照射でもそれぞれの RAD51 フォーカス形成時期とほぼ同じくフォーカス形成することが確認できた。また、ウエスタンブロットの結果もフォーカス形成実験結果を裏付けるものであった。G Iliakis(エッセン大学)も我々と同じ、放射線線量が高くなると RAD51 フォーカス形成が遅れることを報告している。レポーター遺伝子実験の結果と照合すると、7Gy 照射で遅れて形成される RAD51 フォーカスは相同組換え修復に役割を果たしていないと結論づけられる。

(3) 非相同末端再結合による相同組換え修復の制御: 相同組換え修復が高線量で実効されない理由を調べる目的で非相同末端再結合のタンパク Ku70 のノックダウンならびに薬剤を用いた DNA-PKcs 阻害実験を行った。Ku70 のノックダウンにより、細胞の放射線感受性は著しく上昇して細胞生存率が低下した。その一方で、細胞生存率は 2 相性を示して、高線量での放射線抵抗性が顕著になった。この放射線抵抗性は高線量での相同組換え修復の回復を意味していると思われたので、Ku70 ノックダウン細胞の相同組換え能を DR-GFP レポーター遺伝子を用いて測定した。予想通り、高線量で低下する相同組換え修復

が、Ku70 ノックダウンにより減少幅が著しく小さくなった。次に、DNA-PKcs 阻害剤を用いて、RAD51 および RPA フォーカス形成を調べた。DNA-PKcs 阻害剤で DNA-PKcs のキナーゼ活性が失われると、7.0Gy 照射で遅れて形成される RAD51 および RPA フォーカスが早まって、0.5Gy 照射と同様 ni 照射直後のフォーカス形成が見られた。Ku70 のノックダウンにより相同組換え修復が増加することは既に M. Jasin (ロックフェラー大学) により報告されている。しかし、我々の結果は放射線照射により低下した相同組換え修復が、非相同末端再結合の阻害により回復することを示したものである。M. Jasin の報告とは内容が異なる。

(4) 結論: 本研究の一連の結果は、相同組換え修復が低線量の一定範囲でしか働かず、中高線量では修復能が saturate (飽和) することが確認できた。これは 50 年前に E. L. Powers が予想した Saturated Repair を確認するものである。その一方で、非相同末端再結合は放射線量に依らずにほぼ一定の修復能を維持しているため、両修復が機能する低線量での放射線抵抗性、いわゆる擬似しきい値、を示すことになる。このように本研究は、D. Lea や K. H. Chadwick & H. P. Leenhouts が提唱した物理的損傷ではなく、生物学的な修復能に着目して、“生存曲線の肩”を説明することに成功した。“生存曲線の肩”が発生する原因として、Ku70 ノックダウンおよび DNA-PKcs 阻害実験は非相同末端再結合が関わっていることを強く示唆した。今後 1 年以内に、相同組換え修復を低下させる分子機構を論文として発表予定である。

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 12 件)

Hoa NN, Akagawa R, Yamasaki T, Hirota K, Sasa K, Natsume T, Kobayashi J, Sakuma T, Yamamoto T, Komatsu K, Kanemaki MT, Pommier Y, Takeda S, Sasanuma H. Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes Cells*. 20, 1059-1076, 2015. doi: 10.1111/gtc.12310. 査読有

Saito Y, Komatsu K. Functional role of NBS1 in radiation damage response and translesion DNA synthesis. *Biomolecules*. 5, 1990-2002, 2015. doi: 10.3390/biom5031990. 査読有

Kato A, Komatsu K. RNF20-SNF2H pathway of chromatin relaxation in DNA double-strand break repair. *Genes*, 6,

592-606, 2015. doi: 10.3390/genes6030592. 査読有

加藤晃弘、柳原啓見、小松賢志、Nijmegen breakage syndrome(ナイミーヘン症候群)、「家族性腫瘍学」、日本臨床 73巻増刊号6, pp216-219, 2015年8月. 査読なし

Kobayashi J, Saito Y, Okui M, Miwa N, Komatsu K. Increased oxidative stress in AOA3 cells disturbs ATM-dependent DNA damage responses. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 782, 42-50, 2015. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.03.012. 査読有

Hoa NN, Kobayashi J, Omura M, Hirakawa M, Yang SH, Komatsu K, Paul TT, Takeda S, Sasanuma H. BRCA1 and CtIP Are Both Required to Recruit Dna2 at Double-Strand Breaks in Homologous Recombination. *PLoS One.* 10, e0124495, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0124495. 査読有

Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. DNA damage signaling guards against perturbation of cyclin D1 expression triggered by low-dose long-term fractionated radiation. *Oncogenesis.* 3:e132, 2014. doi: 10.1038/oncsis.2014.48. 査読有

Oji Y1, Tatsumi N, Kobayashi J, Fukuda M, Ueda T, Nakano E, Saito C, Shibata S, Sumikawa M, Fukushima H, Saito A, Hojo N, Suzuki M, Hoshikawa T, Shimura T, Morii E, Oka Y, Hoson N, Komatsu K, Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1 promotes homologous recombination-mediated DNA damage repair. *Mol Carcinog.* 2014 Nov 21. doi: 10.1002/mc.22248. 査読有

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. doi: 10.1242/jcs.135855 査読有

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. doi: 10.4161/cc.27274. 査読有

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.* 55:690-8, 2014. doi: 10.1093/jrr/rru011. 査読有

Yoshida T, Awaya T, Shibata M, Kato T, Numabe H, Kobayashi K, 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.* 164A:1830-4, 2014. doi: 10.1002/ajmg.a.36546. 査読有

〔学会発表〕(計 10件)

Komatsu K. Roles of NBS1 in homologous recombination and translesional DNA synthesis. RBC-CEA Workshop, Fontenay-aux-Roses (France), Apr 9, 2015.

Komatsu K. Cloning of NBS1 and repair genes. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), Kyoto, May 26, 2015. (招待講演)

Komatsu K. Dual Roles of NBS1 in translesion DNA synthesis and response to radiation damage. Zing Conference, Cairns (Australia), Aug 1, 2015. (招待講演)

小松賢志、NBS1物語、日本放射線影響学会・放射線ワークショップ、富山、2015年10月16日。(招待講演)

小松賢志、DNA修復研究から放射線障害をみる、京都大学附置研究所・センターシンポジウム、2015年3月14日、広島市(招待講演)

小松賢志、紫外線損傷乗り越えDNA合成と電離放射線の修復蛋白NBS1、2014年7月25日、光医学・光生物学会、大阪市(招待講演)

小松賢志、加藤晃弘、柳原啓見、斎藤裕一朗、周慧、小林純也：NBS1蛋白C末側ドメインとDNA損傷応答における役割、2014年10月1日、日本放射線影響学会、鹿児島(招待講演)

小松賢志、加藤晃弘、柳原啓見、斎藤裕一朗、周慧、小林純也：相同組換え修復と損傷乗り越えDNA合成におけるNBS1蛋白の役割、2014年11月25日、日本分子生物学会、横浜(招待講演)

Kenshi Komatsu. Roles of NBS1 in radiation responses and initiation of translesional DNA synthesis. 5th US-Japan DNA Repair, 2014年10月29日、Naruto(招待講演)

Saito Y, Ihara M, Hirayama R, Kobayashi J, Komatsu K. Dose-dependent regulation of two rejoining pathways for DNA double-strand breaks. 15th International Congress of Radiation Research (ICRR2015), Kyoto, May 25-29, 2015.

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔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： 8 0 1 2 4 5 7 7

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし