

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02816

研究課題名(和文)染色体転座生成を導く二つのDNA二本鎖切断シグナル間の相互干渉の証明

研究課題名(英文) Proof of mutual interference between two DNA double strand break sites leading to chromosomal translocation

研究代表者

新美 敦子(Niimi, Atsuko)

群馬大学・未来先端研究機構・助教

研究者番号：50508984

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：染色体転座メカニズムの解明を目的とし、LacO-I-SceI-TetO細胞株を樹立して新規転座アッセイ系の構築を試みたが、技術的な問題点により、最終的に作製はできなかった。一方で重粒子線ではX線照射に比べ高い頻度で染色体転座が引き起こされる点に注目し、重粒子線照射後の転座発生メカニズムの解析を試みた。染色体領域とDSB部位をそれぞれFISHと蛍光抗体法により可視化して解析し、重粒子線照射細胞では複数の染色体にまたがった形状の特徴的なDNA損傷形態が観察されることを明らかにした。この特徴的なDNA損傷では、染色体転座の初期段階であるDNA末端の削りこみがおこなわれていることが示された。

研究成果の概要(英文)：We established LacO-I-SceI-TetO cell line and tried to set up a new system for monitoring chromosomal translocation, however unfortunately, it was not working well because of technical problems. It is well known that the particle irradiation more frequently causes chromosomal translocation compared with X-ray irradiation. Therefore we simultaneously visualized the site of IR-induced DSBs and chromosome position by combining Immunofluorescence and FISH after C-ion or X-rays irradiation. We found that the frequency of gH2AX foci at the chromosome boundary of chromosome 1 after C-ion irradiation was >4-fold higher than that after X-ray irradiation, and gH2AX foci at chromosome boundaries after C-ion irradiation contain DSBs undergoing DNA-end resection, which promotes repair utilizing microhomology mediated end-joining during translocation. These data suggest that the spatial proximity between breaks is an important factor in translocation formation.

研究分野：DNA損傷応答

キーワード：染色体転座 DNA修復 53BP1 DNA二本鎖切断 重粒子線

### 1. 研究開始当初の背景

染色体転座は最も重篤な染色体異常に位置づけられ、高頻度のがん化を導くと考えられている。特にフィラデルフィア染色体等に代表される血液腫瘍では、多くの転座が観察される。転座の発生は DNA 二本鎖切断 (DSB:DNA double strand break) に起因する。染色体転座形成は大きく3つの行程に分類される。1) DSB 発生後の DSB 末端の削りこみ (DSB end resection)、2) 異なる染色体に生じた二つの DSB 切断対の探索と会合、3) DSB の連結。研究開始当初の知見として、DSB end resection のメカニズムについては CtIP/MRE11 の関与が明らかになっていた (Zhang Y, NSMB, 2011)。また、染色体転座時の連結反応に関しても、DSB 修復の主要経路の一つである NHEJ によって引き起こされることが報告されている (Ghezraoui H, Mol Cell, 2014)。しかしながら、どちらの点においてもそのメカニズムの詳細に関しては未だ不明な点が多かった。更に、3つある行程中の「DSB 末端の探索と会合」についてはほとんど明らかとなっていなかった。その理由として DSB 末端の会合を解析する適切なアッセイ系が無いことが考えられた。群馬大学では、平成 26 年 11 月に次世代 3D 超解像度顕微鏡 Deltavision OMX が導入された。OMX は xy 軸解像度の改善だけでなく、z 軸の解像度を飛躍的に向上させており、現在世界で最も高い空間解像度を有する蛍光顕微鏡の1つである。OMX を用い、染色体転座部位の可視化を含めた独自の新規アッセイ系を構築することで、特に未解明な部分が多い「DSB 末端の探索と会合」に焦点をあて、染色体転座発生の分子メカニズムの一端を解明できるのではないかと考えた。本研究の推進により、転座に関する基礎研究を前進させるだけでなく、染色体転座が好発する血液腫瘍の原因究明にもつながるのではないかと考え、発案した。

### 2. 研究の目的

染色体転座発生の分子メカニズム解明のため、群馬大学が新たに導入した次世代 3D 超解像度顕微鏡 OMX を用いて新規転座アッセイ系を開発する。開発したアッセイ系を用い、染色体転座発生の分子メカニズムの解明を目指す。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新規転座アッセイ系の構築

Lac0-I-SceI-Lac0 配列を持つベクターを構築し、U2OS 細胞に導入した。同様に Tet0-I-SceI-Tet0 配列及び Lac0-I-SceI-Tet0 配列を持つベクターも構築し、U2OS 細胞に導入してクローンを取得した。それら細胞株に 40HT 誘導型の I-SceI 発現ベクターを導入した。培地への 40HT 添加後、固定した細胞に対して gH2AX の蛍光抗体法を行うことで DSB を可視化し、同じく細胞

に導入した LacR-EGFP 及び TetR-mCherry シグナルとの共局在を確認することで、目的部位に DSB が生成されていることを確認した。染色体転座に際しての 53BP1 の影響を解析する目的で、53BP1 野生型及び BRCT ドメイン欠損、S28A (非リン酸化) Tudor ドメイン欠損等の様々な変異体 cDNA を作製し、TetR 発現ベクターにサブクローニングした。

#### (2) IF-FISH 法を用いた重粒子線誘発転座メカニズムの解明

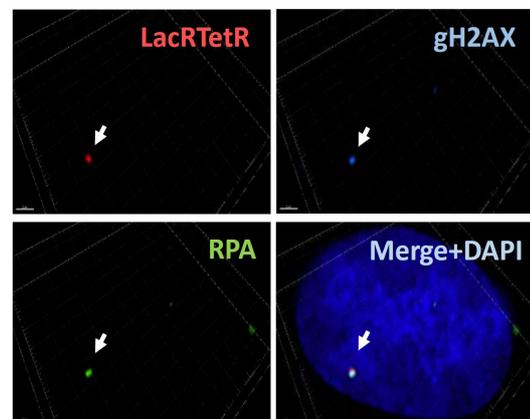
実験にはヒト正常繊維芽細胞 1BR hTERT を用い、細胞を播種して 5 日後に接触阻害により細胞周期が G0 期に停止した細胞により実験を行った。1 Gy の X 線 (100kV) または炭素線 (LET:70keV/μm) 照射を行った。炭素線の照射時は炭素粒子の軌跡に沿った DNA 損傷を検出するために、炭素線照射方向と細胞接着面の傾斜が 5 度となるスライドホルダーを使用した。照射後 15 分、2 時間、24 時間後に細胞を冷メタノール固定し、gH2AX の蛍光抗体法を行って DSB 部位を可視化及び RPA T21 リン酸化抗体により一本鎖 DNA の可視化を行った後、再びメタノール酢酸固定を行い、1 番染色体に対するプローブを用いて FISH を行った。画像取得には Deltavision OMX を用い、DNA 損傷部位と染色体との位置関係の画像解析には Imaris を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) 新規転座アッセイ系の構築

40HT 誘導 I-SceI 発現ベクターを導入した Lac0-I-SceI-Lac0 及び Lac0-I-SceI-Tet0 U2OS 細胞の DSB 部位の可視化を gH2AX 蛍光抗体法により行ったところ、高い頻度で LacR, TetR シグナルとの共局在が観察され、40HT 添加により DSB が誘導されていることが示された。更に、一本鎖 DNA を認識する RPA に対する蛍光抗体法を行い、得られた画像を OMX によりデコンボリューション処理したところ、LacR/TetR シグナルと RPA シグナルの共局在がしばしば観察されたことから、この DSB 領域で末端の削りこみが起きていることが確認された (図 1)。一方で、転座頻度の

図1 I-SceI部位におけるDSB末端の削り込み



定量のため、Lac0, Tet0 配列近辺にプライ

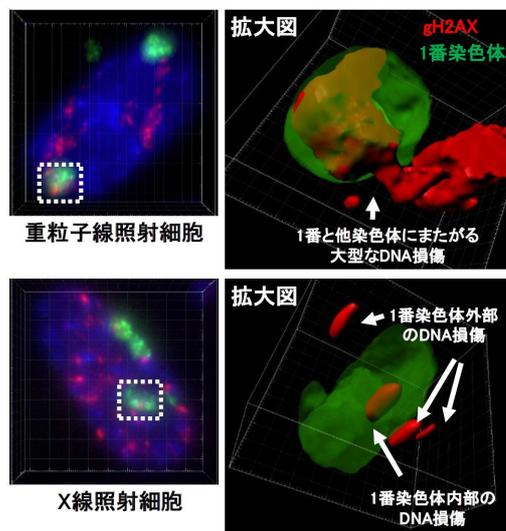
マーを設定し、qPCR による測定を試みたが、おそらく Lac0, Tet0 配列は多数のリピート配列より成ることが原因で、PCR がうまくかからないことが明らかとなった。そこで I-SceI とリピート配列の間に 500bp のスペーサーを挿入したベクターを作製した。また、切断効率を更に上昇させるために I-SceI を I-PpoI に置換した 40HT 誘導発現ベクターも構築した。これらを用いて、同様に細胞株を樹立し、様々な条件検討を行ったが、やはり定量測定系を構築することはできなかった。本研究の新規転座アッセイ系には、転座頻度定量が不可欠であったため、系の構築を断念することとなった。

最終的に、qPCR による染色体転座頻度定量のシステムは構築できなかったが、染色体転座の可視化という面では、複数の Lac0/Tet0 細胞のみならず、本実験系で使用予定であった種々の 53BP1 変異体や DSB 近傍のクロマチン構造に影響を及ぼす関連タンパク質変異体等の発現ベクターの作製を行った。今後、これらを使用し、主に可視化によるアプローチを用いて染色体転座メカニズムの解析を進めていきたいと考えている。

(2) IF-FISH 法を用いた重粒子線誘発転座メカニズムの解析

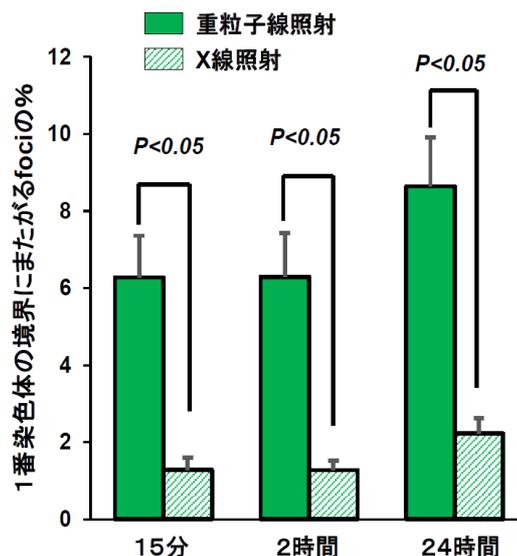
重粒子線照射細胞では、X 線照射に比べて高い頻度で染色体転座がおきることが知られている。染色体転座の分子メカニズムの一端を解明する目的で、重粒子線の照射により、なぜ細胞内の転座頻度が高まるのかについて解析を行った。特異的プローブを用いた FISH を行うことで間期細胞核内における 1 番染色体領域の可視化を行い、gH2AX による DSB 損傷部位の可視化と合わせて位置関係の比較解析を行った。X 線照射細胞では、gH2AX foci の大部分は 1 番染色体の内部、もしくは外部に存在したが、重粒子線照射細胞では同様のシグナルに加え、更に 1 番染色体領域の境界線に重なる大型の gH2AX foci がしばしば観察された(図 2)。これは、重粒子線照

図2 重粒子線に特徴的なDNA損傷形態



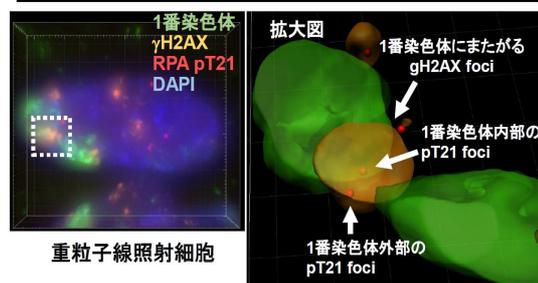
射により、複数の染色体にまたがる形で密集した DSB (クラスターDSB) が形成されていることを示唆している。放射線照射後 15 分、2 時間、24 時間後に細胞を固定し、更に解析を行ったところ、どの時間のサンプルにおいても、重粒子線照射細胞では複数の染色体にまたがる形での gH2AX foci の割合が有意に上

図3 1番染色体にまたがるfoci



昇していることが明らかとなった(図 3)。これらの結果から、このタイプの損傷が重粒子線に特徴的であることが示唆された。更に、この特徴的損傷形態が染色体転座に参与しているのかを調べるため、RPA T21 リン酸化シグナルの検出を行った。染色体の転座には DSB 末端の削りこみが行われる必要があるが RPA T21 リン酸化は削り込みによって露出した一本鎖 DNA のマーカーとなることが知られている。重粒子線照射後 24 時間の細胞を用いて解析を行ったところ、複数の染色体にまたがる特徴的な損傷の内部にしばしば RPA T21 リン酸化シグナルが検出されることが明らかとなった(図 4)。これらの結果から、重

図4 重粒子線特徴的DSB末端の削り込み



粒子線照射細胞では、染色体領域の境界面にまたがる形でクラスターDSB が形成され、さらにクラスターDSB の末端のいくつかでは、しばしば削りこみがおきるため、染色体転座頻度が高まっているのではないかと考えられた。転座生成において、二つの異なる染色体上にある DSB の会合は近接した染色体テリ

トリーで行われるとされる「contact first model」が最も有力なモデルとして提唱されているが (Soutoglou, NCB, 2008) 本研究においてもこのモデルが支持される結果となった。

#### 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 5件)

1. Hagiwara Y\*, Niimi A\*, Isono M, Yamauchi M, Yasuhara T, Limsirichaikul S, Oike T, Sato H, Held KD, Nakano T, Shibata A. 3D-structured illumination microscopy reveals clustered DNA double-strand break formation in widespread H2AX foci after high LET heavy-ion particle radiation. *Oncotarget*. 8;109370-109381, 2017. 査読有  
doi: 10.18632/oncotarget.22679.
2. Yamauchi M, Shibata A, Suzuki K, Suzuki M, Niimi A, Kondo H, Miura M, Hirakawa M, Tsujita K, Yamashita S, Matsuda N. Regulation of pairing between broken DNA-containing chromatin regions by Ku80, DNA-PKcs, ATM, and 53BP1. *Sci Rep*. 7;41812, 2017. 査読有  
doi: 10.1038/srep41812.
3. Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe SY, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, Shibata A. BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation. *Cell Rep*. 18;520-532, 2017. 査読有  
doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.042.
4. Niimi A, Yamauchi M, Limsirichaikul S, Sekine R, Oike T, Sato H, Suzuki K, Held KD, Nakano T, Shibata A. Identification of DNA double strand breaks at chromosome boundaries along the track of particle irradiation. *Genes Chromosomes Cancer*. 55;650-660, 2016. 査読有  
doi: 10.1002/gcc.22367.
5. Oike T\*, Niimi A\*, Okonogi N, Murata K, Matsumura A, Noda SE, Kobayashi D, Iwanaga M, Tsuchida K, Kanai T, Ohno T, Shibata A, Nakano T. Visualization of complex DNA double-strand breaks in a tumor treated with carbon ion radiotherapy. *Sci Rep*. 6;22275, 2016. 査読有  
doi: 10.1038/srep22275.

(\* equal first author)

[学会発表](計 8件)

1. 新美敦子, 萩原慶彦, シリパンリムシリチャイクル, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 中野隆史, 柴田淳史, 重粒子線に特徴的なDNA損傷の可視化と細胞運命決定に与える影響の解析, 2017年度生命科学系学会合同年次大会, 神戸, 2017年12月6-9日
2. 新美敦子, 萩原慶彦, シリパンリムシリチャイクル, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 中野隆史, 柴田淳史, 超解像度顕微鏡による重粒子線誘発クラスターDNA二本鎖切断の空間分布解析, 日本放射線影響学会第60回大会, 千葉, 2017年10月25-28日
3. 新美敦子, 萩原慶彦, シリパンリムシリチャイクル, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 中野隆史, 柴田淳史, 超解像度顕微鏡による重粒子線誘発クラスターDNA二本鎖切断の空間的分布の解析, 第89回日本遺伝学会, 岡山, 2017年9月13-16日
4. 新美敦子, 山内基弘, シリパンリムシリチャイクル, 関根峻太, 磯野真由, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 鈴木啓司, 中野隆史, 柴田淳史, 重粒子線照射により誘発される特異なDNA損傷形状の可視化, 第39回日本分子生物学会, 横浜, 2016年11月30日-12月2日
5. Niimi A, Limsirichaikul S, Nakano T, Shibata A, Analysis of DNA synthesis during homologous recombination in G2 cells after ionizing irradiation, The 10th 3R Symposium, Matsue, Japan, 13-17th Nov. 2016
6. Niimi A, Nakako NI, Yamauchi M, Limsirichaikul S, Oike T, Sato H, Jeggo PA, Held KD, Nakano T, Shibata A, Analysis of cluster DNA double strand break formation using high-resolution microscopy. 10th Quinquennial Conference on Responses to DNA damage: from molecule to disease, Egmond aan Zee, The Netherlands, 17-22nd Apr. 2016
7. 新美敦子, 山内基弘, シリパンリムシリチャイクル, 関根峻太, 磯野真由, 尾池貴洋, 佐藤浩央, 鈴木啓司, 中野隆史, 柴田淳史, 高LET重粒子線照射により誘発される2つの異なる染色体間にまたがるクラスターDNA損傷の同定, 第38回日本分子生物学会年会 第88回日本生化学会大会 合同大会, 神戸, 2015年12月1-4日
8. Niimi A, Oike T, Isono M, Hagiwara Y, Yoshida Y, Takahashi A, Nakano T, Shibata A. Visualization of heavy ion induced cluster DNA double strand breaks formation using the super-resolution microscopy. 15th International Congress of Radiation Research. Kyoto, Japan. 25-29th May.

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://www.giar.gunma-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新美 敦子 (NIIMI Atsuko)  
群馬大学・未来先端研究機構・助教  
研究者番号：50508984

(2) 研究分担者 該当なし  
( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 該当なし  
( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

柴田 淳史 (SHIBATA Atsushi)  
群馬大学・大学院医学系研究科・研究講師  
研究者番号：30707633

山内 基弘 (YAMAUCHI Motohiro)  
長崎大学・学内共同利用施設等・助教  
研究者番号：60437910