

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22310036

研究課題名（和文） ゲノム修復関連高次構造体形成の分子メカニズムの解明

研究課題名（英文） Molecular mechanism to construct the DNA repair related higher order nuclear structures

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

研究成果の概要（和文）：

放射線被ばくによるゲノム損傷の適切な修復には細胞核構造変換が重要であると考えられているが、その詳細については未だ不明な点が多い。本研究では、高次構造を構築するために必要な構造関連蛋白質に注目して、ゲノ修復関連高次構造体形成の分子メカニズムの解明に取り組んだ結果、構造関連蛋白質 Matr3 (MATR3) が RAD51 の細胞内局在制御に MATR3 が関与し、組換え修復活性の制御に関与していることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：

Reorganization of higher order nuclear structures has been thought to play an important role in DNA repair after ionizing radiation. However, the precise mechanism of radiation-induced reorganization of nuclear architecture is still unclear. In this study, we studied the molecular mechanisms involved in the formation of radiation induced higher order nuclear structures. We found that Matr3 (MATR3), a nuclear structure-related protein, is involved in the regulation of the intra-nuclear dynamics of DNA repair protein RAD51. We also found that MATR3 plays a role in the regulation of the recombinational repair activity. These findings suggest the involvement of nuclear architecture in the regulation of DNA repair after ionizing radiation.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2010年度 | 5,300,000  | 1,590,000 | 6,890,000  |
| 2011年度 | 4,300,000  | 1,290,000 | 5,590,000  |
| 2012年度 | 4,300,000  | 1,290,000 | 5,590,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 13,900,000 | 4,170,000 | 18,070,000 |

研究分野：放射線生物学

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：放射線被ばく、ゲノム損傷、細胞核構造、RAD51、構造関連蛋白質

## 1. 研究開始当初の背景

放射線による人体影響としての急性障害および晩発障害の発症には、ゲノム損傷、特に細胞にとって致命的な DNA 二本鎖切断が重要な要因とされている。このため、ヒト細胞の

ゲノム修復システム、特に DNA 二本鎖切断の修復機構の理解を深めることは、放射線影響研究の重要な課題としての放射線障害の治療法の確立とともに、次世代の放射線がん治療法の開発にとっても非常に重要である。一

方、DNA 二本鎖切断の修復機構について、多くのゲノム修復関連蛋白質が放射線照射後に細胞核内の特定の場所に集積し高次構造体（放射線誘発核内フォーカス）を形成していることが明らかにされ、さらに損傷領域のクロマチンに含まれるヒストンのリン酸化などの翻訳後修飾が、修復や損傷応答に関連する因子の集積や活性化に重要であることが明らかになってきた。しかし、放射線誘発核内フォーカスがどのようなメカニズムで形成されるか、あるいはその形成が持つ生物学的意義については未だ不明な点が多い。

我々は、主に細胞生物学的手法を用いた細胞核高次構造の解析に取り組み、放射線障害などによるゲノム障害の修復機構の解明を進めてきた。平成 19-21 年度基盤研究 (B) などを受け、2007 年にヒストンアセチル化酵素 TIP60 によるゲノム損傷部位のヒストン H2AX のアセチル化が、H2AX の損傷クロマチンからの放出と RAD51 フォーカス形成に重要であることを報告し、ゲノム損傷部位における RAD51 フォーカス形成の分子機構の一端を明らかにすることができた。

## 2. 研究の目的

放射線被ばくなどによるゲノム損傷の修復機構を解明するためには、損傷部位で行われる細胞核高次構造の変換とその分子基盤を明らかにする必要がある。一般に、細胞内で蛋白質が集積し高次構造体を形成するためには、膜構造やアクチンなどの構造関連蛋白質の重合など、なんらかの構造構築メカニズムが機能している。しかし、細胞内には膜構造は存在せず、どのような構造が骨組みとなって RAD51 などのゲノム修復関連蛋白質を集積させ高次構造体を形成するのか、その分子機構については全く不明である。

そこで、本研究では、RAD51 が形成する蛋白質複合体を精製し、その構成成分の解析から、RAD51 が高次構造体を形成するための足場として機能する可能性がある構造関連蛋白質を同定し、RAD51 フォーカス形成におけるこれらの構造関連蛋白質の役割について検証することにより、ゲノム損傷部位における細胞核高次構造変換の分子メカニズムを明らかにすることを目指す。

## 3. 研究の方法

平成 22 年度には、ゲノム修復関連蛋白質 RAD51 が損傷部位に高次構造体を形成する分子メカニズムを明らかにするために、まず RAD51 が形成する蛋白質複合体を精製し、質量分析などを用いて RAD51 と直接あるいは間接的に相互作用する構造関連蛋白質の同定に取り組む。平成 23 年度以降には、これらの蛋白質に対する特異的抗体を作成し、免疫沈降法や Duolink 法を用いて RAD51 の相互作用について生化学的および細胞生物学的に

検証する。さらに、これらの蛋白質の RNAi 法による発現抑制や RAD51 と相互作用できない変異体発現による機能抑制を行い、RAD51 核内高次構造体形成における役割について紫外線マイクロ照射法などを用いて検証する。

## 4. 研究成果

RAD51 複合体の質量分析装置を用いたプロテオーム解析から、細胞核構造関連蛋白質 Matrin3 (MATR3) が RAD51 蛋白質複合体に含まれていることを見いだした。MATR3 は、ゲノム損傷関連リン酸化酵素である ATM により損傷依存的なリン酸化修飾を受けることが報告されており、ゲノム修復において RAD51 の機能制御に関わっている可能性が示唆された。そこで、内在性の RAD51 と MATR3 の相互作用について免疫沈降法を用いてこれらの因子の相互作用を検証した結果、これらの因子の相互作用が確認された。ついで MATR3 の発現抑制細胞を作成し、RAD51 の核内での動態制御における MATR3 の役割を検証した結果、RAD51 の細胞内局在に MATR3 が関与していることが明らかになった。さらに、MATR3 発現抑制細胞では、組換え修復活性が抑制されていた。これらの知見より、MATR3 は、RAD51 との相互作用により RAD51 フォーカス形成を促進し、ゲノム修復機構の制御に関与していることが示唆された。現在、論文投稿準備中である。

## 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 12 件)

1. Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hmamai 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, (in press).
2. 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, Sishi 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 damage repair in multiple polyglutamine diseases. *Nature commun*, 査読有, (in press).

3. Shi L, Fujioka K, Sun J, Kinomura A, Inaba T, Ikura T, Ohtaki M, Yoshida M, Kodama Y, Livingston GK, Kamiya K, Tashiro S. A Modified System for Analyzing Ionizing Radiation-Induced Chromosome Abnormalities, *Radiat Res.*, 査読有, 177(5), 2012, pp533-538

4. Tonda T, Satoh K, Otani K, Sato Y, Maruyama H, Kawakami H, Tashiro S, Hoshi M, Ohtaki M. Investigation on circular asymmetry of geographical distribution in cancer mortality of Hiroshima atomic bomb survivors based on risk maps: analysis of spatial survival data, *Radiat Environ Biophys*, 査読有, 51(2), 2012, pp133-141.

5. Hosoya N, Okajima M, Kinomura A, Fujii Y, Hiyama T, Sun J, Tashiro S, Miyagawa K. Synaptonemal complex protein SYCP3 impairs mitotic recombination by interfering with BRCA2, *EMBO Rep.*, 査読有, 13(1), 2011, pp44-51.

6. Takaku M, Kainuma T, Ishida-Takaku T, Ishigami S, Suzuki H, Tashiro S, van Soest RW, Nakao Y, Kurumizaka H. Halenaquinone, a chemical compound that specifically inhibits the secondary DNA binding of RAD51, *Genes Cells*, 査読有, 16(4), 2011, pp427-436.

7. Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M, Kera Y, Noda T, Igarashi K. Methionine adenosyltransferase II serves as a transcriptional corepressor of

Maf oncoprotein, *Mol Cell*, 査読有, 41(5), 2011, pp554-66.

8. Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Yanagihara H, Sakamoto S, Oliveira DV, Shimada M, Tauchi H, Suzuki H, Tashiro S, Zou L, Komatsu K, Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination, *Mol Cell*, 査読有, 41(5), 2011, pp515-28.

9. Sun J, Oma Y, Harata M, Kono K, Shima H, Kinomura A, Ikura T, Suzuki H, Mizutani S, Kanaar R, Tashiro S. ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot, *PLoS One*, 査読有, 5(10), 2010, e13554, doi: 10.1371/journal.pone.0013554.

10. Muto A, Ochiai K, Kimura Y, Itoh-Nakadai A, Calame KL, Ikebe D, Tashiro S, Igarashi K. Bach2 represses plasma cell gene regulatory network in B cells to promote antibody class switch, *EMBO J*, 査読有, 29(23), 2010, pp4048-4061.

11. Tazaki T, Sasaki T, Uto K, Yamasaki N, Tashiro S, Sakai R, Tanaka M, Oda H, Honda Z, Honda H. p130Cas, Crk-associated substrate plays essential roles in liver development by regulating sinusoidal endothelial cell fenestration, *Hepatology*, 査読有, 52(3), 2010, pp1089-1099.

12. Saito K, Kagawa W, Suzuki T, Suzuki H, Yokoyama S, Saitoh H, Tashiro S, Dohmae N, Kurumizaka H. The putative nuclear localization signal of the human RAD52 protein is a potential sumoylation site,

[学会発表] (計 36 件)

1. Satoshi Tashiro, Jiyiing Sun, Kazuteru Kono, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura : Mechanism of the radiation-induced repair focus formation. 第 35 回日本分子生物学会, 福岡 2012.12.11.
2. Lin Shi, Kurumi Fujioka, Jiyiing Sun, Tsuyoshi Ikura, Megu Ohtaki, Mitsuaki Yoshida, Yoshiaki Kodama, Gordon K. Livingston, Kenji Kamiya, Satoshi Tashiro : Analysis of ionizing radiation-induced chromosome abnormalities by PNA-FISH. The 10<sup>th</sup> International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA10), Amalfi (イタリア) 2012.10.19.
3. 田代 聡:放射線の健康影響と小児. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡 2012.4.20.
4. 田代 聡:放射線誘発核内フォーカス形成のエピゲノム制御. 日本農芸化学会 2012 年度大会, 京都 2012.3.22.
5. 西淵いくの, 田代 聡, 原田昌彦, 深川竜郎, 井倉毅, 鈴木秀和, 木野村愛子, 孫継英: DNA 損傷応答におけるヒストンバリエント H2A. Z isoform の関与. 第 34 回日本分子生物学会, 横浜 2011.12.13.
6. 時 林, 藤岡来実, 孫 継英, 木野村愛子, 稲葉俊哉, 井倉 毅, 大瀧 慈, 吉田光明, 児玉吉明, Gordon K. Livingston, 神谷研二, 田代 聡: A new system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜 2011.12.13.
7. 青木義朗, 田代 聡 : 5-Fluorouracil 誘導性 DNA 障害における ribonucleotide reductase-1 の役割に関する検討. 第 34 回日本分子生物学会, 横浜, 2011.12.13.
8. 田代 聡 (招待講演・イブニングセミナー) :放射線被ばくによるゲノム損傷と小児の健康影響. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋 2011.11.25.
9. 西淵いくの, 田代 聡, 原田昌彦, 木村智樹, 村上祐司, 権丈雅浩, 兼安祐子, 永田 靖: DNA 損傷応答におけるヒストンバリエント H2A. Z isoform の関与. 日本放射線腫瘍学会第 24 回大会, 神戸 2011.11.17.
10. 時 林, 藤岡来実, 孫 継英, 木野村愛子, 稲葉俊哉, 井倉 毅, 大瀧 慈, 吉田光明, 児玉吉明, Gordon K. Livingston, 神谷研二, 田代 聡: A new system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. 日本放射線影響学会 第 54 回大会, 神戸 2011.11.17.
11. Jiyiing Sun, Yukako Oma, Masahiko Harata, Kazuteru Kono, Hiroki Shima, Aiko Kinomura, Tsuyoshi Ikura, Hidekazu Suzuki, Shuki Mizutani, Roland Kanaar and Satoshi Tashiro : ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot. 第 54 回放射線影響学会, 神戸 2011.11.17.
12. 田代 聡:放射線により誘発される DNA 修復蛋白質による核内高次構造体形成、福島原子力発電所事故における現地での活動報告. 日本薬物動態学会 第 26 回年会, 広島 2011.11.17.
13. Ikuno Nishibuchi, Satoshi Tashiro, Hiroki Shima, Tomoki Kimura, Yuji Murakami, Masahiro Kenjo, Yuko Kaneyasu, Yasushi Nagata: The dynamics of histone variant H2A. Z upon DNA damage. ASTRO's 53<sup>rd</sup> Annual Meeting, Miami, USA, 2011.10.2.
14. 青木義朗, 檜原 淳, 迫川賢士, 恵美学, 浜井洋一, 岡田守人, 田代 聡 : DNA 二重鎖切断に着目した 5-Fluorouracil の作用機序の解明. 第 65 回食道学会学術集会, 仙台, 2011.9.26.
15. 時 林, 藤岡来実, 孫 継英, 木野村愛子, 稲葉俊哉, 井倉 毅, 大瀧 慈, 吉田光明, 児玉吉明, Gordon K. Livingston, 神谷研二, 田代 聡: A new system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. 第 84 回日本生化学会大会, 京都 2011.9.21.
16. Jiyiing Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura, Dipanjan Chowdhury and Satoshi Tashiro:

- Mechanism of 11q23 chromosomal translocation after etoposide treatment. 第84回生化学会大会, 京都 2011. 9. 21.
17. 田代 聡 (招待講演・シンポジウム): 放射線発がん分子メカニズム研究の新展開. 第 28 回 日本医学会総会特別企画, 東京 2011. 9. 17.
  18. 田代 聡 (招待講演・シンポジウム): 原発事故と小児放射線健康影響. 第 114 回 日本小児科学会, 東京 2011. 8. 12.
  19. 青木義朗, 迫川賢士, 檜原 淳, 恵美学, 浜井洋一, 岡田守人, 田代 聡: DNA 二重鎖切断に着目した 5-Fluorouracil の作用機序の解明. 第 66 回日本消化器外科学会総会, 名古屋, 2011. 7. 13.
  20. 田代 聡 (フォーラム): 福島県における小児甲状腺被ばく調査. 日本小児科学会緊急フォーラム, 東京 2011. 4. 17.
  21. 時 林、藤岡来実, 孫 継英, 木野村愛子, 稲葉俊哉, 山内基弘, 鈴木啓司, 山下俊一, 大瀧 慈, 神谷研二, 田代 聡: Comparison of telomere-centromere metaphase FISH with Giemsa staining in analysis of chromosome aberrations. 広島大学原爆放射線医学研究所 第 1 回国際シンポジウム, 広島 2011. 3. 3.
  22. 孫 継英, 木野村愛子, 鈴木秀和, 田代 聡: ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot. 広島大学原爆放射線医学研究所 第 1 回国際シンポジウム, 広島 2011. 3. 3.
  23. 島 弘 季 : Regulation of Radiation-induced focus formation by SUMOylation. International Symposium, Physicochemical Field for Genetic Activities, 淡路 2011. 1. 24.
  24. 孫 継英, 木野村愛子, 鈴木秀和, 田代 聡: ATM modulates the loading of recombination proteins onto MLL BCR 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回生化学会大会 合同大会, 神戸 2010. 12. 7.
  25. 田代 聡 (シンポジウム): Regulation of Radiation-induced focus formation by SUMOylation. 第 33 回分子生物学会, 神戸 2010. 12. 7.
  26. 時 林, 藤岡来実, 孫 継英, 木野村愛子, 稲葉俊哉, 山内基弘, 鈴木啓司, 山下俊一, 井倉 毅, 大瀧 慈, 吉田光明, 児玉喜明, Gordon K. Livingston, 神谷研二, 田代 聡: Comparison of telomere-centromere metaphase FISH with Giemsa staining in analysis of chromosome aberrations. 第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会, 神戸 2010. 12. 7.
  27. 西淵いくの, 島 弘季, 井倉 毅, 井倉正枝, 木村智樹, 村上祐司, 権丈雅浩, 兼安祐子, 永田 靖, 田代 聡: DNA 損傷応答におけるヒストン H2AZ ダイナミクスの in vivo 解析. 日本放射線腫瘍学会 第 23 回, 東京 2010. 11. 18.
  28. 西淵いくの, 島 弘季, 井倉正枝, 井倉毅, 田代 聡: DNA 損傷応答におけるヒストン H2AZ ダイナミクスの in vivo 解析. 日本放射線影響学会第 53 回大会, 京都 2010. 10. 20.
  29. 田代 聡, 鎌田七男, 木村昭郎, 三原圭一朗, 大瀧 慈, 星 正治, 川上秀史, 神谷研二, : 広島原爆 2 世の親の被曝線量について. 日本放射線影響学会第 53 回大会, 京都 2010. 10. 20.
  30. 田代 聡 (シンポジウム): 染色体転座と DNA 損傷応答. 日本放射線影響学会第 53 回大会, 京都 2010. 10. 20.
  31. Satoshi Tashiro (招待講演): Mechanism of the DNA damage-induced focus formation of RAD51. 56th Annual Meeting Radiation Research Society. マウイ, ハワイ, USA, 2010. 9. 25.
  32. 青木義朗, 檜原 淳, 迫川賢士, 恵美学, 浜井洋一, 岡田守人, 田代 聡: 食道癌細胞株における抗癌剤の相乗効果とゲノム損傷修復機構のメカニズムに関する検討. 第 65 回日本消化器外科学会, 下関 2010. 7. 14.
  33. 鎌田七男 (広島大学名誉教授): 広島県内原爆被爆者の子供数. 第 51 回原爆後障害研究会, 長崎, 2010. 6. 6.
  34. 島 弘季, 孫 継英, 鈴木秀和, 胡桃坂仁志, 齊藤寿仁, 田代 聡: SUMO 修飾システムによる RAD51 核内ドメイン形成の制御. 第 9 回細胞核ダイナミクス研究会, 伊豆, 2010. 5. 29
  35. Sun J, Kono K, Shima H, Kinomura A, Ikura T, Mizutani S, Kanaar R, Tashiro S: ATM modulates the loading of

recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot. Ataxia-Telangiectasia Workshop 2010. Los Angeles, USA, 2010. 4. 11.

36. 青木義朗, 檜原 淳, 迫川賢士, 恵美学, 浜井洋一, 岡田守人, 田代 聡: 食道癌細胞株における抗癌剤感受性と DNA 二重鎖切断の修復に関する検討. 第 110 回日本外科学会, 名古屋, 2010. 4. 8.

[その他]

ホームページ等

[http://home.hiroshima-u.ac.jp/cellbio/cell\\_biology/Welcome\\_%28youkoso%29.html](http://home.hiroshima-u.ac.jp/cellbio/cell_biology/Welcome_%28youkoso%29.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

孫 継英 (SUN JIYING)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：80397926

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：