

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23501259

研究課題名(和文)染色体転座形成におけるDNA組換え修復関連タンパク質の関与

研究課題名(英文) Involvement of DNA recombination repair proteins in chromosomal translocations

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：放射線や化学物質により形成される染色体転座は、がんや白血病など悪性腫瘍の発症に繋がるとされているが、染色体転座形成の分子機構の詳細は不明である。抗がん剤エトポシドによる治療関連性白血病では、11q23転座が疾患特異的染色体異常として知られている。我々は、DNA損傷シグナル伝達調節因子ATMキナーゼが、エトポシド処理による11q23転座切断点集中領域へのDNA組換え酵素RAD51の過剰集積を抑制し、転座形成の抑制に関わることを明らかにした。本研究では、ATMが組換え修復因子RPA2をリン酸化することでRAD51の11q23転座切断点集中領域への集積を抑制し、転座形成を防ぐことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chromosome translocations induced by ionizing radiation and chemotherapeutic agents, has been shown to lead to malignant transformation. However, the mechanism of chromosome translocations is still unclear. Chromosome translocations involving the MLL gene on 11q23 are the most frequent chromosome abnormalities in secondary leukemias associated with chemotherapy employing etoposide. Dysfunction of ATM, a DNA damage signaling regulator, increases the incidence of 11q23 chromosome translocations. We showed that ATM deficiency results in the excessive binding of the DNA recombinase RAD51 at the translocation breakpoint cluster region (BCR) of MLL gene after etoposide exposure. In this study, we showed that phosphorylation of RPA2 by ATM plays an important role in the regulation of RAD51 binding to the BCR of MLL gene after etoposide exposure.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：染色体転座 ATM 組換え修復 RAD51 RPA

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA は、放射線などさまざまな外因による損傷を受けているが、通常は損傷の種類に応じた DNA 修復機構により適切に修復され染色体の安定性が維持される。放射線や一部の抗がん剤は染色体 DNA の二本鎖切断 (DNA double strand breaks: DSBs) を誘導することが知られている。ヒト細胞での DSBs 修復機構には、主に損傷部位と相同的配列を持つ染色体 DNA を鋳型として用いて DSBs を正確に修復する相同組換え修復機構 (homologous recombinational repair: HR) と、断端を直接融合して修復する非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) が存在することが知られている。一般に、染色体転座形成には、遺伝子塩基配列を確認しないため修復エラーが多い NHEJ 経路が関与しているとされている。一方、HR 経路で最も重要な DNA 組換え反応に関与する RAD51 の過剰発現が一部のがん細胞で認められており、さらに染色体不安定性を増悪させる可能性も示唆されている。しかし、HR 経路がどのように染色体転座の形成に関与するのかについては、未だ不明な点が多い。

抗がん剤エトポシドなどを用いた化学療法後に発症する治療関連性白血病では、11q23 に切断点を持つ染色体転座が最も多く認められる。我々は、エトポシドによる 11q23 転座形成をモデルシステムとして、染色体転座形成の分子機構の解明に取り込んできた。DNA 損傷シグナル伝達調節因子 ATM 変異の患者は白血病を含む悪性腫瘍の発症が高頻度であることが認められる。ATM の欠失細胞を用いた解析で、エトポシドによる 11q23 転座形成の増加と BCR への RAD51、一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA など HR 経路に関連する因子の過剰な結合を見出した。これらの知見は、ATM が HR 関連因子の BCR への結合を制御することにより転座形成を抑制している可能性を示唆している。

2. 研究の目的

我々は、ATM による RPA のリン酸化がエトポシド処理後の RAD51 の BCR への結合を抑制し、11q23 転座形成の阻止に重要な働きをしているのではないかと仮説を立て、

1) エトポシド処理による RPA のリン酸化機構、

2) RPA リン酸化による 11q23 染色体転座形成への影響、

3) RPA リン酸化による RAD51 の MLL 遺伝子 BCR への結合制御

を検討することにより、染色体転座形成の分子機構を解明に取り組む。

3. 研究の方法

(1) RPA 2 の非リン酸化及びリン酸化模倣変異体 RPA2 発現ベクターの作製。

(2) エトポシド処理後の RPA2 リン酸化につい

て、イムノプロット法や最近開発されたリン酸化タンパク質を検出する Phos-tag 技術などを用いてエトポシド処理によるリン酸化部位の確認を行う。

(3) FISH 法を用いて RPA2 のリン酸化と 11q23 染色体転座の関連について解析する。

(4) I-SceI DRGFP リポターシステムを用いて、RPA2 のリン酸化の相同組換え修復効率への影響を調べる。

(5) 各細胞分画における内在性の RAD51 と RPA 野生型およびリン酸化変異体との相互作用を検討する。

(6) クロマチン免疫沈降法を用いて、リン酸化変異体 RPA2 の発現細胞における RAD51 の BCR への集積での RPA リン酸化の役割を検討する。

4. 研究成果

(1) RPA2 の N 末端に 9 カ所のリン酸化部位があるため、まずエトポシド処理によるリン酸化機構と部位の確認を行った。RPA 2 の非リン酸化及びリン酸化模倣変異体 RPA2 発現ベクターを発現した細胞を用いた解析で、エトポシドによる RPA のリン酸化は主に ATM に依存したものが分かった。また、RPA2 の Ser33、Ser8 がエトポシド処理によって誘導されるリン酸化部位であることを明らかにした (図 1)。

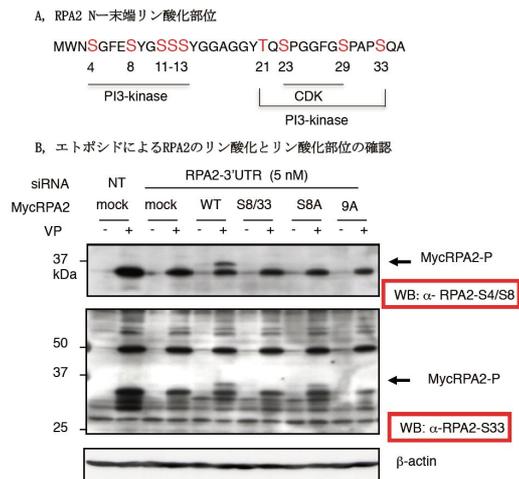


図 1. エトポシドによる RPA2 のリン酸化とリン酸化部位の確認

(2) FISH 法を用いて 11q23 転座を解析した結果、非リン酸化 RPA 2 の安定発現した細胞において 11q23 転座頻度が上昇した。一方、リン酸化模倣変異体 RPA2 を安定発現した ATM 欠損細胞において 11q23 転座頻度を抑制された。この結果から、リン酸化された RPA 2 がエトポシド処理による 11q23 染色体転座の形成を抑制することが明らかになった。(図 2)

(3) 各細胞分画のタンパク質を用いてイムノプロット法を解析した結果、非リン酸化 RPA2

安定発現細胞におけるエトポシド処理後にクロマチンと結合するRAD51は、野生型RPA2安定発現細胞より多いことが明らかになった。一方、リン酸化模倣変異体RPA2を安定発現したATM欠損細胞の場合では、クロマチンに結合するRAD51の量が減少した。この結果から、RPA2のリン酸化がRAD51のクロマチンへの結合を制御することが示唆された。

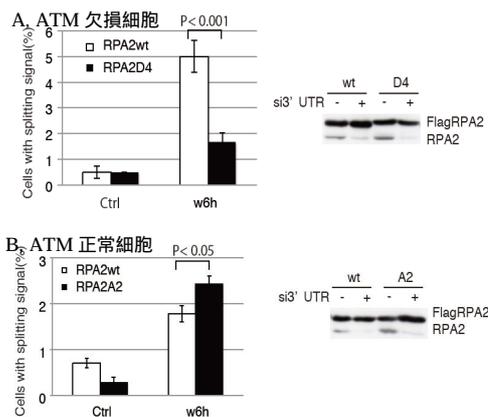


図2、FISH法による11q23転座の解析

(4)クロマチン免疫沈降法による解析で、ATM欠損細胞では、リン酸化模倣変異体RPA2の発現により、エトポシド処理後のMLL BCR領域へのRAD51の集積が抑制された。

以上の研究結果から、ATMは、RPAのリン酸化を介してRAD51の染色体転座切断点集中領域への集積を制御することにより、相同組換え活性を抑制し、染色体転座形成を防ぐことが明らかになった。(図3)

DNA損傷により誘導されるRPA2のリン酸化については、その生物学的意義は不明な点が多い。今回の我々の研究結果から、RPA2のリン酸化がRAD51のDNA損傷部位への集積の制御に関わっていることと明らかになり、RPAリン酸化のDNA損傷修復機構における役割の一端が明らかになった。本研究により得られたRPAリン酸化の染色体転座形成分子機構への関与の解明は、がん治療によるゲノム障害の評価システムの確立やゲノム修復機構を標的とした新しいがん治療法の開発につながることを期待される。

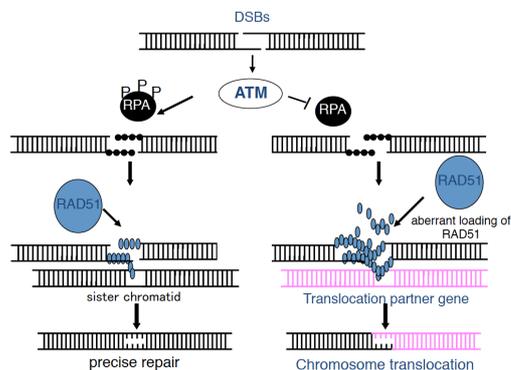


図3、組換え修復エラーによる染色体転座の模式図

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 8 件)

Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites containing DNA damage. 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. *J Cell Sci*. 15;126(Pt 22):5284-92. 2013. 査読有

doi: 10.1242/jcs.133744

Involvement of homologous recombination in the synergism between cisplatin and poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. 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. *Cancer Sci*. 104(12):1593-9. 2013. 査読有

doi: 10.1111/cas.12281.

Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. 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. *Int J Oncol*. 42(6):1951-60. 2013. 査読有

doi: 10.3892/ijo.2013.1899

A Modified System for Analyzing Ionizing Radiation-Induced Chromosome Abnormalities. Shi L, Fujioka K, Sun J, Kinomura A, Inaba T, Ikura T, Ohtaki M, Yoshida M, Kodama Y, Livingston GK, Kamiya K, Tashiro S. 査読有 *Radiat Res*. 2012; 177(5):533-8

http://jrr.oxfordjournals.org

白血病のゲノム不安定性 田代 聡、孫 継英
日本臨床 70巻, 383-387, 2012. 査読無
http://www.nippon-rinsho.co.jp

放射線によるDNA損傷と修復機構 田代 聡、孫 継英
日本臨床 70巻 383-7, 2012. 査読無
http://www.nippon-rinsho.co.jp

構造関連蛋白質による放射線誘発核内フォーカス形成を介した組換え修復の制御機構 時林、孫 継英、木野村 愛子、沖本 聡志、田代 聡
長崎医学会雑誌 : 87, 199-201, 2012. 査読無

Synaptonemal complex protein SYCP3 impairs mitotic recombination by interfering with BRCA2. Hosoya N, Okajima M, Kinomura A, Fujii Y, Hiyama T, Sun J,

Tashiro S, Miyagawa K. *EMBO Rep.* 23;13(1):44-51, 2011 査読有
doi: 10.1038/embor.

〔学会発表〕(計 12 件)

Jiying Sun, Aiko Kinomura, Masayuki Harata, Tsuyoshi Ikura, and Satoshi Tashiro,

Involvement of chromatin remodeling factor in chromosomal translocation 4th RIRBM International Symposium, Hiroshima, 2014,2,12-13

Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura² and Satoshi Tashiro Molecular mechanism of etoposide induced 11q23 chromosome translocation 第 36 回日本分子生物学会年会 2013,12,3 神戸

Jiying Sun, Tsuyoshi Ikura, Satoshi Tashiro Involvement of recombination repair proteins in 11q23 chromosome translocation 第 72 回日本癌学会学術総会 2013,10,3 横浜

孫継英、木野村愛子、鈴木秀和、田代聡 染色体転座形成におけるクロマチン再構成因子の関与 第 9 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス・広島, 2013,6,1

Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura, Satoshi Tashiro Involvement of recombination repair proteins in 11q23 chromosome translocation 3rd RIRBM International Symposium, Hiroshima, 2013,2,12-13

Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura, Dipanjan Chowdhury, Satoshi Tashiro Involvement of recombination repair proteins in 11q23 chromosome translocation 第 35 回分子生物学会 2012, 12,11 福岡

Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura, Dipanjan Chowdhury and Satoshi Tashiro Mechanism of 11q23 chromosomal translocation after etoposide treatment. 第 5 5 回放射線影響学会 2012,9,6-8 仙台

孫継英、木野村愛子、鈴木秀和、田代聡 染色体転座形成の分子機構の解明 第 8 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス・2012,6,2 長崎

Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Dipanjan Chowdhury and Satoshi Tashiro

ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot. 2nd RIRBM International Symposium 2012,2,20-21 Hiroshima

Jiying 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 5 4 回放射線影響学会 神戸 2011,11,17-19

Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura, Dipanjan Chowdhury and Satoshi Tashiro Mechanism of 11q23 chromosomal translocation after etoposide treatment 第 8 4 回生化学会大会 京都 2011,9,21

孫継英、木野村愛子、鈴木秀和、田代聡 染色体転座形成における組換え修復タンパク質の役割 第 7 回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファランス・広島, 2011,6,4

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

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