

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550027

研究課題名(和文) 有糸分裂期のDNA損傷の影響と応答

研究課題名(英文) Impact and response to DNA damage in mitosis

研究代表者

松本 智裕 (Matsumoto, Tomohiro)

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：80212223

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)：有糸分裂期は放射線感受性が最も高い細胞周期ステージであるが、その理由は明らかでない。本研究で用いたモデル系である分裂酵母のテロメア近傍には、DNA損傷応答遺伝子を含む、種々のストレス応答遺伝子がコードされているが、通常は、その発現が抑制(サイレンシング)されている。このサイレンシングには、染色体凝縮因子と、これをリン酸化する酵素が関与することを見いだした。この領域のDNA損傷応答遺伝子のサイレンシングにより有糸分裂期の損傷応答活性が低下するという新たな分子機構を見いだすことができた。

研究成果の概要(英文)：Mitosis is a cell cycle stage in which the radiation sensitivity is higher than any other stages, but the underlying mechanisms are still unclear. In this research project, we used the fission yeast model system and found the followings:

1) Some of the stress response genes, including DNA repair gene around telomere are normally silenced. 2) This silencing requires a chromosome-condensing factor and a kinase that phosphorylates the condensing factor in mitosis. We therefore found a novel mechanism of gene silencing that likely accounts for a low activity of DNA repair in mitosis.

研究分野：放射線生物学

キーワード：有糸分裂期 テロメア 染色体凝縮

1. 研究開始当初の背景

有糸分裂期は放射線感受性が最も高い細胞周期ステージであるが、その理由は明らかでない。凝縮した染色体が修復タンパク質の損傷部位へのアクセスを妨げる、あるいは染色体運動のため、二重鎖切断部位が互いに離れてしまい、修復不能であるといった理由が考えられる。また、有糸分裂期には、DNA 損傷チェックポイントが機能しないとも考えられている。これらの予想は互いに排他的ではなく、有糸分裂期の高い放射線感受性は、これらの要因の総和の結果かもしれない。しかしながら、最近の結果は、上記の予想の一部が必ずしも正しくない可能性を示唆する。

複製後の姉妹染色分体は、有糸分裂後期の開始まで、コヒーシン複合体により対合しているので、たとえ放射線により DNA 二重鎖が切断されようと、切断部位が離れてしまう可能性は低い。また、有糸分裂期においても転写される遺伝子が多数同定されており、凝縮した染色体に修復タンパク質がアクセスできないとは断言できない。むしろ、潜在的な修復能はあるものの、修復を全うするための時間が不足しているとも考えられる。

DNA 損傷をうけた間期の細胞では、DNA 損傷チェックポイントの機能により細胞周期の進行が停止し、その間に損傷が修復される。細胞周期の進行を停止するため、Cdk/Cyclin の活性を直接、あるいは間接的に抑制することが、DNA 損傷チェックポイントの基本メカニズムであることが示されている(文献 1、2)。よって、Cdk/Cyclin の活性化により一旦、有糸分裂期に進入した細胞では、DNA 損傷チェックポイントの機能は作用しないと考えられる。これに対して、Rieder らは、哺乳類の有糸分裂期の培養細胞では、DNA 損傷に対してスピンドルチェックポイントが応

答し、細胞周期の進行が遅延することを報告した(文献 3)。その骨子は、1: このチェックポイントのシグナル伝達系の中樞をになうタンパク質、Mad2、が、DNA 損傷をうけて有糸分裂期で細胞周期進行を停止した細胞の動原体に蓄積すること、2: Mad2 を失活させると細胞周期の停止が解除される、ことであった。この報告を機に、DNA 損傷に対するスピンドルチェックポイントによる応答が相次いで報告されている(文献 4~7)。しかしながら、スピンドルチェックポイントが如何にして DNA 損傷を察知するのかは、依然として不明である。

文献)

1: Regulation of DNA replication by the S-phase DNA damage checkpoint. Willis N, Rhind N. Cell Div. 2009 4:13

2: Kinases that control the cell cycle in response to DNA damage: Chk1, Chk2, and MK2. Reinhardt HC, Yaffe MB. Curr Opin Cell Biol. 2009 21:245-55.

3: DNA damage during mitosis in human cells delays the metaphase/anaphase transition via the spindle-assembly checkpoint. Mikhailov A, Cole RW, Rieder CL. Curr Biol. 2002 12:1797-806.

4: DNA damage activates the SAC in an ATM/ATR-dependent manner, independently of the kinetochore. Kim EM, Burke DJ. PLoS Genet. 2008 4:e1000015.

5: Mad2 prolongs DNA damage checkpoint arrest caused by a double-strand break via a centromere-dependent mechanism. Dotiwala F et al., Curr Biol. 2010 20:328-32.

6: Chk1-Mad2 interaction: a crosslink

between the DNA damage checkpoint and the mitotic spindle checkpoint. Chilà R et al., Cell Cycle. 2013 12:1083-90.

7 : UV-C irradiation delays mitotic progression by recruiting Mps1 to kinetochores.

Zhang X et al., Cell Cycle. 2013 12:1292-302.

## 2 . 研究の目的

本研究の目的は、分裂酵母とヒト培養細胞それぞれの利点を活かし、1) 有糸分裂期の損傷部位への損傷修復タンパク質の集積能の検定、2) 有糸分裂期における損傷修復能の検定、3) 有糸分裂期において損傷を受けた染色体の動態を解析し、そして、4) 有糸分裂期の放射線応答に対するスピンドルチェックポイントの作用機序(特に損傷察知)を解析することにある。本研究の成果により、放射線に対する損傷応答と、そこに関連するスピンドルチェックポイントの新規の機能が解明できれば、国際的にも関心の高いDNA損傷チェックポイントの研究分野において新たな研究指針を示すことになる。有糸分裂期の高い放射線感受性について、その要因を探り、スピンドルチェックポイントとDNA損傷チェックポイントとの相互作用について基礎的データを蓄積し、今後の研究の方向性を見極める為に必須のものである。

## 3 . 研究の方法

1) 有糸分裂期の細胞の損傷修復能を検定するため以下の3つの実験を行なう；

損傷修復タンパク質(分裂酵母 Rad22、ヒト NBS1 と PARP) に蛍光標識を施し、損傷部位への集積を有糸分裂期の細胞で観察する。人為的にチェックポイント様の細胞周期停止を誘導し、修復活性を生存率と変異出現頻度を用いて評価する。また、有糸分裂

期に損傷を被った染色体の動態を解析する。

2) スピンドルチェックポイントとDNA損傷チェックポイントとは相互作用するのか？この問いに答えるため、有糸分裂初期、あるいは中期で細胞周期を停止させた分裂酵母に放射線を照射し、DNA損傷チェックポイントの活性化を検定する。また、DNA損傷チェックポイントの機能によるスピンドルチェックポイントの活性化を検定する。

## 4 . 研究成果

26年度の成果：本研究の開始直後、ヒト培養細胞系では、有糸分裂期の損傷修復能が低下することで、テロメア同士の融合が防止されることが報告された(Science Vol. 344, 11, April 2014)。このため、分裂酵母をモデル系とした研究を優先して推進した。特に、テロメア近傍におこるDNA損傷等のストレスに対する細胞応答に注目した。この結果、テロメア近傍に存在するストレス応答遺伝子(損傷修復遺伝子を含む)の発現を抑制(サイレンシング)するタンパク質として Bdc1 を同定した。また、スピンドルチェックポイントの活性化の指標として、セキュリンの翻訳後修飾を見いだした。この修飾を指標として、DNA損傷時のスピンドルチェックポイントの活性を簡便に測定することが可能となった。

27年度の成果：前年度に同定したタンパク質 Bdc1 が、染色体の凝縮に参与することを示唆する結果を得た。おそらく染色体凝縮により遺伝子発現を抑制するものと推測できる。これまでは、有糸分裂期の細胞の放射線に対する高い感受性の理由として「凝縮した染色体が損傷修復因子のアクセスを阻害する」と考えられていたが、本研究の結果は「染色体の凝縮により、損傷応答遺伝子の発現が抑制される」という新たな概念を提示するものである。

28年度の成果: Bdc1 タンパク質による遺伝子サイレンシング(特にテロメア近傍)のメカニズムを解明した。Bdc1 は有糸分裂期に活性のピークを示すキナーゼの活性化因子であること、さらに、このキナーゼの基質が、染色体の凝縮促進因子であることを見いだした。

これらの結果は、有糸分裂期には、テロメア近傍のクロマチンが凝縮することにより、遺伝子発現がサイレンシングされることを示唆する。この領域に DNA 損傷応答遺伝子もコードされているので、このサイレンシングのメカニズムにより有糸分裂期の損傷応答活性が低下することも示唆する。テロメア領域のクロマチンが緩んだ状態であると、テロメア同士、あるいはテロメアと核膜との相互作用により、有糸分裂期における染色体分配に悪影響を及ぼすことが考えられる。本研究で見いだしたサイレンシング機構は、この悪影響を回避するために重要であると考えられる。

#### 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 0 件)  
現在、投稿準備中

〔学会発表〕(計 1 件)  
Masahiro Takado, Tatsuki Kunoh, Yuji Chikashige, Tomohiro Matsumoto,  
Involvement of *S. pombe* Aurora kinase in the regulation of heterochromatic imprint at the subtelomere. 日本分子生物学会、2014年、11月25~27日、パシフィコ横浜

〔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

本研究の意義と成果に加え、染色体・細胞周期等の基礎研究の意義と重要性を平易に解説するため、中高生対象の特別講義、実習、出前授業等を積極的に開催した(各年度につき、100~150名に対して実施)。

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

松本 智裕 (MATSUMOTO Tomohiro)  
京都大学 放射線生物研究センター  
教授  
研究者番号：80212223

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4) 研究協力者

( )