

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02819

研究課題名(和文) クロマチンリモデリングを介した放射線誘発DNA損傷の修復制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of radiation-induced DNA damage repair through chromatin remodeling

研究代表者

小林 純也 (Kobayashi, Junya)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：30301302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：放射線暴露などで生じるDNA二本鎖切断(DSB)損傷の修復の一連の過程において、近年クロマチンリモデリングの重要性が報告されてきたことから、放射線誘発DSB損傷修復機構過程の進行・完了に関わるクロマチンリモデリング因子を免疫沈降/プロテオミクス解析で同定し、クロマチンリモデリングを通じたDSB修復機構制御の全容を明らかにすることを目的とし、本研究を行った。その結果MRE11, KU, RPAと相互作用するクロマチンリモデリング関連因子を複数同定し、その一つ、nucleolinは複製ストレスによるDNA損傷発生時に、ATRの活性化及び相同組換え修復に機能する因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：As the importance of chromatin remodeling factors has been reported in radiation-induced DNA double-strand breaks (DSBs) damage responses, we investigated to identify chromatin remodeling factors, which could function in DSB damage responses, using immunoprecipitation/proteomics analysis. As a results, we identified several candidates of chromatin remodeling-related factors. Among of them, we found that nucleolin could function in ATR activation and homologous recombination, which suggests that nucleolin might be an important factor for replication stress-related cellular responses.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷 放射線 DNA修復 クロマチン クロマチンリモデリング 複製ストレス

1. 研究開始当初の背景

生物の遺伝情報が納められているゲノム DNA は電離放射線に被ばくすると二本鎖切断 (Double-strand break: DSB) 損傷が生じる。このような DSB 損傷は DNA 複製期 (細胞周期の S 期) に紫外線、活性酸素にさらされた場合にも生じることが知られる。このような DSB 損傷は遺伝情報の消失、染色体異常、ゲノム不安定化を経てがん化や細胞死に至りうるため、DSB 損傷の発生は直ちに検知され、非相同末端結合 (non-homologous end-joining: NHEJ) と相同組換え (homologous recombination: HR) の二つの主要な機構から適切な修復機構を選択的に活性化して損傷 DNA を修復する。しかし、高等真核生物のゲノム DNA はヒストンタンパク質と安定なクロマチン構造をとっており、DSB 修復タンパク質の集結を可能にするために DNA 修復開始に先立って、ヒストン修飾及びクロマチンリモデリングによってクロマチン構造を弛緩することが必要となる。とりわけ、HR 修復では DSB 損傷応答因子 MRE11/NBS1/Rad50 複合体による DSB 損傷検知に続き、複数種の DNAヌクレアーゼによる DSB 末端の resection が必要である。この resection が損傷部位から遠方へと進行して行くには、その進行に伴ったクロマチン構造の転換が起こっていると考えられる。このようなクロマチン構造の経時的転換は、DSB 修復の各段階で適切な修復因子が修復の場に集結・機能して DSB 修復を正常に完了させて、ゲノム安定性を維持する上で重要であると考えられる。一方で近年、INO80, SMARCAD1, ACF1 など、複数のクロマチンリモデリング因子が DSB 修復に関与することが報告されてきている。我々も、最近 DSB 損傷発生に伴いクロマチンリモデリング関連因子 FACT 依存して DSB 損傷発生部位にリクルートされる RNF20 (ユビキチン E3 リガーゼ) がヒストン H2B のユビキチン化を通して、クロマチンリモデリング因子 SNF2h の DSB 損傷部位への集結を促進し、HR 修復の開始に機能することを明らかにした。またさらに FACT 自体も RNF20 と物理的/機能的に相互作用することにより、HR 修復に機能することも明らかとした。このような我々の研究成果および他のグループの様々な報告から DSB 損傷応答におけるクロマチンリモデリング因子の役割は強く示唆されてきているが、一連の放射線誘発 DSB 損傷修復機構、DSB 損傷検知、修復機構の選択、修復の進行及び完了の各段階において機能するクロマチンリモデリング因子の同定、因子間の相互作用など、因子が機能することに夜クロマチン構造転換 (弛緩) が一連の DSB 損傷応答機構の進行にどのように貢献しているのか、について本研究課題を開始する前にはほとんど明らかとされていなかった。

2. 研究の目的

電離放射線被ばくで DNA 二本鎖切断損傷が生じるとすみやかに検知され、修復される。この一連の DNA 修復過程に機能する様々な因子が DNA 損傷発生部位に集結して機能できるように活性化するためには、ゲノム DNA が形成するクロマチン構造がクロマチンリモデリング因子によって弛緩される必要がある。DSB 修復過程では、非相同末端結合と相同組換えの主要な二機構から、適切な一方が選択的に開始され、修復の完了に至るが、この一連の過程におけるクロマチンリモデリングの役割は不明であることから、放射線誘発 DSB 損傷修復機構において、DSB 損傷検知、修復機構の選択、修復の進行および完了の各段階におけるクロマチンリモデリングの役割を明らかにするために、DSB 損傷初期応答の代表制御因子 MRE11, NHEJ 修復経路の代表的因子 KU, HR 修復経路の代表的因子 RPA (Replication Protein A) のそれぞれと相互作用するクロマチンリモデリング因子をプロテオミクス法で同定し、同定因子の kinetics・機能解析することにより、クロマチンリモデリングを通じた放射線誘発 DNA 損傷応答・修復機構制御機構を明らかにする。さらに放射線誘発 DNA 損傷応答と関わりの深い複製ストレス誘発 DNA 損傷応答への関連も合わせて検討する。

3. 研究の方法

(1) クロマチンリモデリング因子の放射線誘発 DNA 損傷依存的なクロマチン蓄積の解析

DSB 損傷の修復に機能する DNA 修復因子は DSB 損傷が存在するクロマチンに集積する性質があることから、線照射したヒト培養細胞を経時的に回収した後、クロマチン画分を調製し、ターゲットとするクロマチンリモデリング因子に対する抗体を用いたウェスタンブロット法を解析し、DNA 修復関連因子と同様に、DSB 損傷依存的なクロマチン蓄積を検出する。

(2) 免疫沈降 / プロテオミクス解析による DSB 損傷修復制御に機能しうるクロマチンリモデリング因子の同定

DSB 損傷修復応答での代表的な因子 MRE11, KU, RPA それぞれに対する抗体、あるいはこれらに免疫沈降できるタグを融合させたタンパク質を強制発現させた細胞で、線照射した後、細胞核抽出液を調製し、免疫沈降を行ってターゲットが形成する複合体を回収、電気泳動でタンパク質それぞれのバンドに分離する。銀染色で検出されたバンドを分離し、バンド内に含まれるタンパク質をトリプシン処理後、液体クロマトグラフィ質量分析装置 (AB SCIEX 社 TripleTOF 5600+) でタンパク質群を同定する。同定した中でクロマチンリモデリング関連因子が真に複合体に含まれるかを免疫沈降 / ウエ

スタンプロット法で確認する。

(3) 候補クロマチンリモデリング因子の DSB 損傷修復における役割の解明

同定クロマチンリモデリング因子の kinetics 解析

上記(1)で確立された方法で DSB 損傷発生にともなうクロマチン蓄積を検討する。また、特異的抗体を用いて免疫蛍光染色を行うことにより、DSB 損傷発生部位への集積・フォーカス形成を検討する。さらに、GFP との融合タンパク質を強制発現させた細胞を用いて、共焦点レーザー顕微鏡による laser micro-irradiation 法により同定因子の DSB 損傷部位への局在をライブ観察して、検討する。

ノックダウンによる DSB 損傷応答への影響の解明

DSB 損傷修復進行のマーカーである H2AX, NBS1, RPA, RAD51, 53BP1 等へのフォーカス形成について、同定因子を siRNA ノックダウンした後に上記マーカー因子の特異的抗体を用いた免疫蛍光染色法で検討する。さらに、HR, NHEJ 活性化に対する影響を検討するために、これら修復機構がそれぞれ活性化すると GFP が発現する、GFP 配列を含む特殊なコンストラクト DNA (DRGFP, pEJ)を含む細胞を用いて、同定因子をノックダウンした後に HR, NHEJ 活性に影響が現れるかを検討する。

4. 研究成果

(1) クロマチンリモデリング因子の放射線誘発 DNA 損傷依存的なクロマチン蓄積の解析

代表的な培養細胞である HeLa, U2OS 細胞でガンマ線照射及び複製ストレスを誘発するカンプトテシン処理を行った後に、全細胞抽出液とクロマチン画分由来抽出液を調製し、特異的抗体を用いたウェスタンブロット法で DNA 損傷依存的なクロマチン蓄積を検討すると、従来報告される HR 因子である RPA, RAD51 や NBS1 のクロマチン画分での増加が検出されるとともに、代表的クロマチンリモデリング関連因子 SNF2h, FACT の増加も確認でき、DNA 損傷依存的なクロマチン蓄積応答の検出系を確立することができた。

(2) 免疫沈降 / プロテオミクス解析による DSB 損傷修復制御に機能しうるクロマチンリモデリング因子の同定

27年度研究において MRE11, KU80, KU70 をターゲットとし、これら抗体で免疫沈降後、沈降物を質量分析計で解析し、ターゲット因子と DSB 損傷発生時に結合しうる候補因子の同定を試みた。その結果、MRE11 とはヒストンシャペロンタンパク質、RNA metabolism、酸化ストレス応答に関わる候補因子が単離された。抗 KU70 抗体では同定で

きなかったが、KU80 の場合には nucleolin, FACT 等クロマチンリモデリングに関わる因子、RNA metabolism に関わる候補タンパク質を同定できた。さらに 28 年度と同様な検討で、抗 RAD51 抗体では RNA 結合能を持つもの、DNA 損傷応答因子との相互作用が報告される因子を同定できた。一方、抗 Ligase IV 抗体を用いた場合、結合因子の同定はできなかった。

(3) 候補クロマチンリモデリング因子の DSB 損傷修復における役割の解明

nucleolin の複製ストレス依存性 DNA 損傷応答における役割

28 年度までの研究で同定されたクロマチン関連因子について、特に DSB 損傷応答・修復経路における役割、特に MRE11 複合体及び KU 複合体との結合から確認された nucleolin に注目し DSB 損傷修復における役割を検討した。nucleolin について、我々は DSB 損傷初期応答因子ヒストン H2AX と結合する因子として以前見だし、放射線誘発 DNA 損傷発生時にヒストン eviction 機能を通して MDC1 依存的に ATM 依存性細胞周期チェックポイントと HR 修復を制御することを報告していた。本研究では複製ストレス発生時の損傷応答における役割に焦点を当て検討した。nucleolin を siRNA で発現抑制すると、カンプトテシン処理による複製ストレス発生時の RPA, RAD51 の HR 因子のフォーカス形成が低下し、resection による一本鎖 DNA 末端の生成も低下を示し、nucleolin が複製ストレス時の HR 修復に機能することが示唆された。複製ストレス時には RPA 依存的な ATR キナーゼの活性化も起こることが知られるが、ATR の活性化及び ATR による基質リン酸化は nucleolin ノックダウンにより低下した。一方、nucleolin 過剰発現細胞では、ATR の活性化や RPA の複製ストレス依存的なクロマチン結合が増加した。さらに、nucleolin は RPA とも結合したことから、nucleolin は RPA との結合を介し、複製ストレス発生時の HR 修復及び ATR 依存的な細胞周期チェックポイントに対して、初期制御因子として機能することを明らかとした。

GRWD1 の DSB 損傷応答における役割

28 年度までの研究で MRE11 複合体と結合する因子として同定したクロマチンリモデリング関連因子 GRWD1 の DSB 損傷応答における役割についても検討を行った。GRWD1 は SNF2h と結合すること、ヌクレオソームスライディング活性を持つことが既に知られていたが、GRWD1 の DNA 損傷部位への蓄積は特異抗体によるフォーカス検出及び、micro-irradiation 方では確認できなかった。一方、siRNA でノックダウンすると DSB 損傷マーカーである H2AX のガンマ線照射による kinetics に遅延がみられ、GRWD1 は放射線誘発 DNA 損傷応答に機能することが示唆された。また、siRNA ノック

ダウン細胞で ATM 依存的なリン酸化に影響が見られなかった一方で、DRGFP アッセイでは GRWD1 の siRNA ノックダウンにより HR 活性の低下がみられた。しかし、一般的な HR 因子の欠損でみられる、RAD51, RPA フォーカスの低下がノックダウン細胞で観察されなかった。これらの結果、及び GRWD1 ヌクレオソームスライディング活性を持つことから、GRWD1 は既報告の経路とは別に、ヌクレオソームレベルでのクロマチンリモデリング機能を通して、HR 修復制御に関わる可能性が考えられる。

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 17 件)

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. 査読有
doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.03.012.

Hoa NN, Kobayashi J, Omura M, Hirakawa M, Yang SH, Komatsu K, Paull 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. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0124495.
eCollection 2015.

Kamimura D, Katsunuma K, Arima Y, Atsumi T, Jiang J, Bando H, Meng J, Sabharwal L, Stofkova A, Nishikawa N, Suzuki H, Ogura H, Ueda N, Tsuruoka M, Harada M, Kobayashi J, Hasegawa T, Yoshida H, Koseki H, Miura I, Wakana S, Nishida K, Kitamura H, Fukada T, Hirano T, Murakami M. KDEL receptor 1 regulates T-cell homeostasis via PP1 that is a key phosphatase for ISR. *Nature Commun*. 6, 7474, 2015. 査読有
doi: 10.1038/ncomms8474.

Yoshikawa Y, Yamasaki A, Takatori K, Suzuki M, Kobayashi J, Takao M, Zhang-Akiyama QM. Excess processing of oxidative damaged bases hypersensitivity to oxidative stress and low dose rate irradiation. *Free Radic Res*. 49, 1239-1248, 2015. 査読有
doi: 10.3109/10715762.2015.1061186.

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. 査読有
doi: 10.1111/gtc.12310.

Shimura T, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. Severe mitochondrial damage associated with low-dose radiation sensitivity in ATM- and NBS1-deficient cells. *Cell Cycle* 15, 1099-1107, 2016. 査読有
doi: 10.1080/15384101.2016.1156276.

Shimada M, Matsuzaki F, Kato A, Kobayashi J, Matsumoto T, Komatsu K. Induction of Excess Centrosomes in Neural Progenitor Cells during the Development of Radiation-Induced Microcephaly. *PLoS One*. 11, e0158236, 2016. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0158236.
eCollection 2016.

Lustig A, Shterev I, Geyer S, Shi A, Hu YQ, Morishita Y, Nagamura H, Sasaki K, Maki M, Hayashi I, Furukawa K, Yoshida K, Kajimura J, Kyoizumi S, Kusunoki Y, Ohishi W, Nakachi K, Weng NP, Hayashi T. Long-term effects of radiation exposure on telomere lengths of leukocytes and its associated biomarkers among atomic-bomb survivors. *Oncotarget*, 7, 38988-38998, 2016. 査読有
doi: 10.18632/oncotarget.8801.

Igarashi K, Kobayashi J, Katsumura T, Urushihara Y, Hida K, Watanabe-Asaka T, Oota H, Oda S, Mitani H. An Approach to Elucidate NBS1 Function in DNA Repair Using Frequent Nonsynonymous Polymorphism in Wild Medaka (*Oryzias latipes*) Populations. *PLoS One*, 12, e0170006, 2017. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0170006.
eCollection 2017.

Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. A comparison of radiation-induced mitochondrial damage between neural progenitor stem cells and differentiated cells. *Cell Cycle*, 16, 565-573, 2017. 査読有
doi: 10.1080/15384101.2017.1284716.

Zhou H, Kawamura K, Yanagihara H, Kobayashi J, Zhang-Akiyama Q. NBS1 is regulated by two kind of mechanisms; ATM-dependent complex formation with MRE11 and RAD50 and cell cycle dependent-degradation of protein. *J Radiat Res*, 58, 487-494, 2017. 査読有
doi: 10.1093/jrr/rrx014.

Katoh S, Kobayashi J, Umeda T, Kobayashi Y, Nobuo I and Suzuki T. Chronic irradiation with low-dose-rate ¹³⁷Cs-γ rays inhibits NGF-induced neurite extension of PC12 cells via Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II activation. *J Radiat Res*, 58, 809-815, 2017. 査読有
doi: 10.1093/jrr/rrx032.

Shimura T, Sasatani M, Kawai H, Kamiya K, Kobayashi J, Komatsu K, Kunugita N. ATM-mediated mitochondrial damage response triggered by nuclear DNA damage in normal human lung fibroblasts. *Cell Cycle*, 16, 2345-2354, 2017. 査読有
doi: 10.1080/15384101.2017.1387697.

Yu L, Hisatsune J, Hayashi I, Tatsukawa N, Sato'o Y, Mizumachi E, Kato F, Hirakawa H, Pier GB, Sugai MA. Novel Repressor of the ica Locus Discovered in Clinically Isolated Super-Biofilm-Elaborating *Staphylococcus aureus*. *mBio*, 8, e02282-16, 2017. 査読有
doi: 10.1128/mBio.02282-16.

Fujino Y, Minamizaki T, Hayashi I, Kawakami A, Miyaji T, Sakurai K, Yoshioka H, Kozai K, Okada M, Yoshiko Y. Comparative proteome analysis of wild-type and klotho-knockout mouse kidneys using a combination of MALDI-IMS and LC-MS/MS. *Proteomics Clin Appl*. 11, 7-8, 1600095, 2017. 査読有
doi: 10.1002/prca.201600095.

Kawamura K, Qi F, Kobayashi J. Potential relationship between the biological effects of low-dose irradiation and mitochondrial ROS production. *J Radiat Res*, 59 (suppl_2): ii91-ii97, 2018 査読有
doi: 10.1093/jrr/rrx091.

Iijima K, Kobayashi J, Ishizaka Y. Structural alteration of DNA induced by viral protein R of HIV-1 triggers the DNA damage response. *Retrovirology*. 15, e8,

2018. 査読有
doi: 10.1186/s12977-018-0391-8.

〔学会発表〕(計 7件)

小林純也、斎藤裕一朗、周慧、柳原啓見、松浦伸也、小松賢志「低線量率放射線照射による細胞内 ROS 上昇と DNA 損傷応答との関係」BMB2015 (日本分子生物学会・日本生化学会合同大会) ワークショップ「放射線生物影響の課題に挑む分子生物学(生化学)研究の力」2015年12月3日(神戸)

Kobayashi J, Saito Y, Kato A, Oliveira DV, Yanagihara H, Matsuura S, Komatsu K. Regulation of various DNA damage responses through complex formations of NBS1. 16th Ataxia-Telangiectasia Workshop (ATW2015), Beijing Oct 11-14, 2015.

小林純也、河村香寿美、周慧、斎藤裕一朗、松浦伸也、小松賢志. 低線量率放射線照射による細胞内 ROS 上昇と DNA 損傷応答との関係. 日本放射線影響学会第 59 回大会 シンポジウム「低線量(率)放射線生物影響の課題への分子生物学的アプローチ」. 広島. Oct. 26-28. 2016.

小林純也、河村香寿美、周慧、斎藤裕一朗、柳原啓見、小松賢志. NBS1 の複合体形成とその機能: 制癌ターゲットとしての可能性. 第 45 回放射線による制癌シンポジウム. 大阪. Jul 15. 2016.

Kobayashi J. Oxidative stress and DNA damage responses under low dose rate irradiation. The 2nd KU RBC-CEA Joint Workshop. Kyoto. Apr 11-12. 2016.

河村香寿美、周慧、Qi Fei、林幾江、小林純也. 核小体関連タンパク質 nucleolin による DNA 複製ストレス応答の制御. 第 39 回日本分子生物学会年会 シンポジウム「多様な DNA 損傷応答の統合制御機構-経路選択とクロストーク」. 横浜. Nov. 30-Dec. 2. 2016

小林純也. 低線量率放射線照射によるミトコンドリア影響と ROS 産生との関係. 日本放射線影響学会第 60 回大会. 千葉. Oct. 26-28. 2017.

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 純也 (KOBAYASHI, Junya)

京都大学・放射線生物研究センター・准教

授

研究者番号： 3 0 3 0 1 3 0 2

(2) 研究分担者

林 幾江 (HAYASHI, Ikue)

広島大学・医歯薬保健学研究科(歯)・助

教

研究者番号： 0 0 3 4 6 5 0 3

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし