

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：72609

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15449

研究課題名(和文) 超高解像度顕微鏡を用いた重粒子線誘発DNAクラスター損傷修復の可視化

研究課題名(英文) Visualization of heavy-ion induced clustered DNA double strand break formation using super-resolution microscopy

研究代表者

磯野 真由 (Isono, Mayu)

公益財団法人佐々木研究所・附属研究所・研究員(移行)

研究者番号：90713511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：重粒子線照射は局所集中的に多様なDNA損傷(クラスター損傷)を誘発すると考えられているが、未だ細胞レベルでクラスター損傷の可視化は出来ていない。本研究では次世代3D超高解像度顕微鏡を用いて重粒子線誘発DNA損傷の可視化を試みた。重粒子線誘発DNA二本鎖切断(DSB)の可視化には、DSB末端の一本鎖DNA領域に集積するRPA fociをマーカーとして用いた。我々は重粒子線が通過した軌道上に非常に近接して複数個のRPA fociが存在することを見出した。このような近接した複数のDSBの生成は、重粒子線特異的であり、X線と比較した際の高い染色体異常や細胞致死性を導く要因となることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Heavy-ion radiation induces clustered DNA damage, which contains multiple type of DNA damage, e.g. DNA double strand break (DSB), single strand break and base damage. However so far, such clustered DNA damage has not been visualized in the cellular level. Here we aimed to visualize the clustered DNA damage, particularly about the formation of DSB, after heavy-ion radiation by using 3D super-resolution microscopy. To address the question whether heavy-ion irradiation generates clustered DSB formation or not, we monitored RPA foci as a DSB marker. The super-resolution analysis revealed that heavy-ion radiation induced multiple RPA foci in close proximity. Furthermore, our analysis demonstrated that the distance between two individual RPA foci within H2AX foci was approximately 700 nm. In summary, our data suggests that these closely localized DSBs are considered to be a risk for chromosomal translocations, deletions and cell death after heavy-ion irradiation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNAクラスター損傷 重粒子線 染色体異常

1. 研究開始当初の背景

光子線(X線・ガンマ線)と粒子線(アルファ・炭素・鉄線等)の大きな違いは線量分布性であり、粒子線は局所集中的なDNA損傷を引き起こす事を特徴としている。物理学的シミュレーションから、重粒子線照射は数十bpの範囲内でDNA二本鎖切断(DSB: DNA double strand break)、塩基損傷、一本鎖切断(SSB: single strand break)を高密度に生成することが示唆されている。しかしながら、これらDNA損傷の密集性は生化学的実験では検出限界に達するため、細胞レベルでの証明は非常に困難とされてきた。研究協力者である群馬大学・柴田淳史助教は高解像度顕微鏡DeltaVision Coreを用いて、重粒子線誘発による損傷シグナルとしてのクラスター γ H2AX fociの可視化に成功し、その研究成果を報告している(Nakajima, PLOS ONE, 2013)。しかし、DeltaVision Coreを使ったとしてもDSB部位の同定には至っていない。群馬大学では平成26年11月に次世代3D超高解像度顕微鏡OMXが導入された。OMXはxy軸解像度の改善だけでなく、技術的に高解像度化が困難であったz軸の解像度を飛躍的に向上させているため、現在世界で最も高い空間解像度を有する蛍光顕微鏡である。例えばDSB末端に1-2分子のみ結合するKu70/80は、蛍光顕微鏡では可視化不可能とされていたが、OMXによりKu70/80の集積が可視化可能であることが報告された(Britton, JCB, 2013)。Ku70/80は1つのDSBに対し1つのKu70/80 foci(集積体)を形成するため、本研究ではOMXを使用することで重粒子線誘発クラスターDSBの存在を世界で初めて可視化出来ると考え、本研究を立案した。

2. 研究の目的

群馬大学が新たに導入した次世代3D超高解像度顕微鏡OMXを用い、蛍光免疫染色法によって損傷部位をラベルすることで重粒子線誘発クラスター損傷の可視化を試みる。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト正常線維芽細胞株1BR-hTERTを用いた。細胞を播種して48時間後に1 GyのX線(100 kV)または炭素線(LET: 60 keV/ μ m)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作成し、細胞サンプルを設置した。Ku80 fociに関しては、照射後5、15、30分で細胞をCSK-R bufferで処理を行った後(Britton, JCB, 2013)、PFAで固定し、抗Ku80抗体(Cat. no. MS-285-P1、Lab Vision Corporation)を用いて蛍光免疫染色を行った。一方、相同組み換え(homologous recombination, HR)の過程で起こるDSB末端でのDNAの削り込み(DSB end resection)で生じた一本鎖DNA(ssDNA)領域に結合するRPA fociを検出するため、照射

後2時間で細胞をTriton-X溶液で処理し固定した後、抗RPA抗体、抗 γ H2AX抗体、S/G2期マーカーである抗CENPF抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。免疫染色に併せてDAPIによる細胞核染色も行った。それぞれのfociはDeltaVision OMXを用いて撮像し、デコンポリューション画像、さらに解像度の高い3D-SIM画像を取得した。RPA foci検出に関しては、CENPF陽性細胞を選択し撮像した。得られたfoci画像は画像解析ソフトウェアImaris 8.1.2を用いて解析を行った。

4. 研究成果

(1) Ku80 fociにおけるDSB部位の可視化

重粒子線照射後5、15、30分の時点でKu80 fociを検出することを試みた。DSBマーカーとして用いた53BP1と共染色した場合はAlexa488によるKu80のシグナルが観察されたが、53BP1と共染色しないKu80の単独染色ではAlexa488によるKu80シグナルは認められなかった。抗Ku80抗体の濃度、染色時間、二次抗体の濃度などの様々な条件を検討したが、Ku80由来と思われるシグナルは現時点まで得られていない。一方、Ku80 fociを抗体以外の方法で検出するため、SNAP-Ku80ベクター安定発現U2OS細胞を作成し、Ku80 fociの検出を試みたがfociの検出は出来なかった。おそらく内在性のKu80との競合により、SNAP-Ku80がDSB部位に十分に集積出来なかったことが原因と考えられる。そのため、CRISPR-Cas9システムを用いてノックアウト細胞の作製を試みたが致死であった。現在は内在性Ku80をmCloverで標識したU2OS細胞の樹立を試みている(Natsume, Cell Rep, 2016)。Ku70/80はDSB発生後即座にDSB末端に集積する非相同末端結合(Non-homologous end-joining, NHEJ)関連タンパクである(Downs and Jackson, Nat Rev Mol Cell Biol, 2004)。また、NHEJは細胞周期に依存せず機能し、DSB修復機構としては第一選択される(Shibata, EMBO J, 2011, Isono, Cell Rep, 2017)。そのため、Ku80 fociの検出は正味の放射線誘発DSBを反映すると言える。検出可能となれば、重粒子線誘発クラスター損傷の可視化のみならず、DSBの数と細胞致死の関係性などを明らかにすることが可能となる。これは基礎研究の観点だけでなく、放射線治療の有用性を立証するといった臨床の観点においても重要性を担っている。そのため、上記した内在性Ku80タンパクのラベリングが出来れば、Ku80 foci検出が可能になると期待している。

(2) RPA fociにおけるDSB部位の可視化

HRによる修復が進行する際、DSB end resectionが生ずる。Resectionによって露出したssDNA領域にはRPAが集積し、RAD51との置き換わりが起こる。RAD51の集積した一本鎖DNAはテンプレートとなる姉妹染色体に侵入し、組み換えが進行して修復が完了す

る。したがって、DSB 部位検出の別のアプローチとして、resection が生じた DSB 末端に集積する RPA を対象に foci の 3D-SIM 化を行った。重粒子線及び X 線照射後 2 時間で生成した RPA foci について、Imaris による画像解析を行った。その結果、重粒子線照射後の 1 つの γ H2AX foci 内には複数の RPA foci が存在し、そのような γ H2AX foci の割合が X 線照射に比べて優位に高いことを見出した (図 1)。

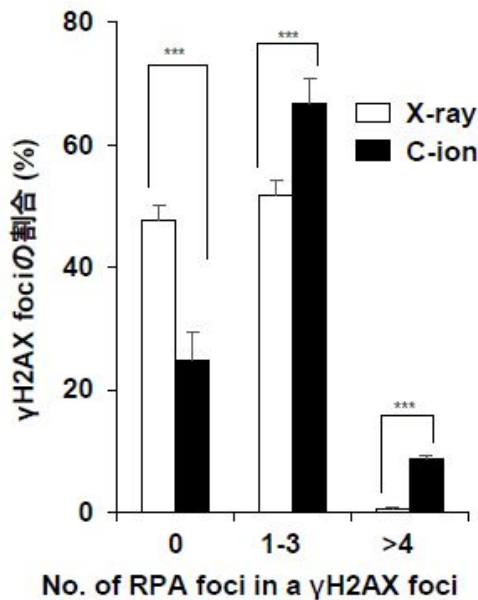


図1 重粒子線によるクラスター損傷の生成

また、存在する RPA foci 数に依存して γ H2AX foci の体積が増加することも明らかとなった。ただし、5 RPA foci 以上になると体積増加の直線性が失われた。さらに、RPA が 2-3 個存在する γ H2AX foci に関して、RPA 同士がどれくらいの距離で存在しているのかを検討した結果、RPA foci 同士は平均約 700 nm (150-1500 nm の幅がある) の距離で近接していることが明らかとなった(図 2)。

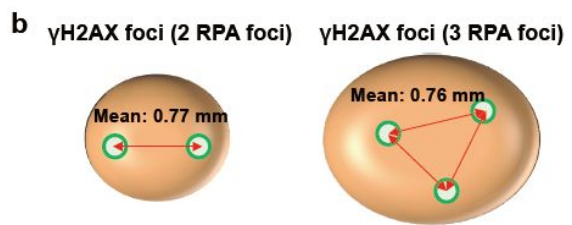
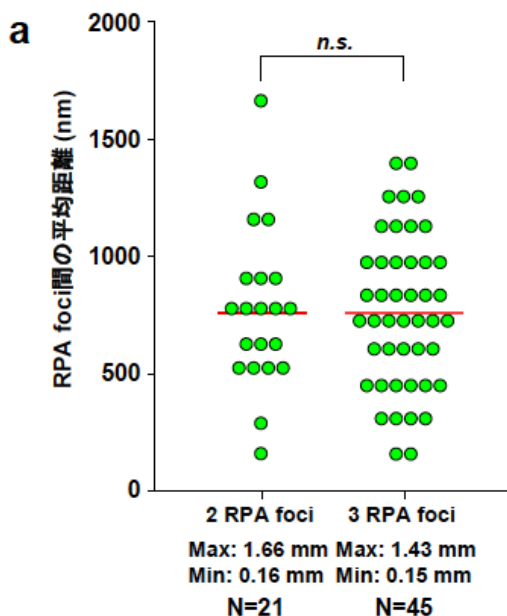


図2 重粒子線誘発クラスター損傷内のRPA foci間の距離 (a) Imarisによるfoci間の距離の定量、(b)模式図

以上のことから、RPA foci による DSB 部位の特定によって、重粒子線は複数の非常に近接した DSB を発生させることが示された。この重粒子線特有の複雑な DSB の生成は、染色体内または染色体間での欠失や転座を引き起こす要因であり、X 線に比べて、より高い頻度で染色体異常や細胞致死が起こることを示唆した。また、本研究で得られた結果は、放射線治療における重粒子線の有用性を立証する一助となった。

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 1 件)

Mayu Isono, Atsuko Niimi, Takahiro Oike, Yoshihiko Hagiwara, Hiro Sato, Ryota Sekine, Takashi nakano and Atsushi Shibata, BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation, Cell Reports, 18;520-32, 2017. 査読有

DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.042>

[学会発表](計 5 件)

萩原慶彦、磯野真由、新美敦子、尾池貴洋、佐藤浩央、中野隆史、柴田淳史、炭素イオン線誘発 DNA 二本鎖切断の修復経路選択における線エネルギー付与の効果、第 39 回日本分子生物学会年会、神奈川県横浜市、2016 年 11 月 30 日 - 12 月 2 日

Mayu Isono, Atsuko Niimi, Yoshihiko Hagiwara, Ryotaro Nishi, Shinya Isobe, Chikashi Obuse, Elena Peticci, Shinichiro Nakada, Takashi Nakano and Atsushi Shibata, BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation, The 10th 3R Symposium, Shimane, Japan, 13-17th, November, 2016

Yoshihiko Hagiwara, Atsuko Niimi, Mayu Isono, Takahiro Oike, Hiro Sato, Takashi Nakano and Atsushi Shibata, The effect of

linear energy transfer in DNA double strand break repair pathway choice in G2 cells, The 10th 3R Symposium, Shimane, Japan, 13-17th, November, 2016

磯野真由、新美敦子、尾池貴洋、萩原慶彦、佐藤浩央、関根峻太、吉田由香里、Elena Petricci、中田慎一郎、中野隆史、柴田淳史、BRCA1 による DSB end resection の時空間的制御、第 38 回日本分子生物学会年会、兵庫県神戸市、2015 年 12 月 1-4 日

Mayu Isono, Takahiro Oike, Ryota Sekine, Yuka Kimura, Yoshihiko Hagiwara, Yukari Yoshida, Takashi Nakano and Atsushi Shibata, The complexity of damage at the DNA break ends induces rapid DNA double strand break resection, The 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

磯野 真由 (ISONO, Mayu)
公益財団法人 佐々木研究所 附属佐々木研究所・研究員
研究者番号：90713511

(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)
国立大学法人 群馬大学・医学系研究科・助教
研究者番号：30707633