

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K12821

研究課題名(和文)放射線誘発DNA二本鎖切断での53BP1 repositioningの分子機構

研究課題名(英文) Regulation of 53BP1 repositioning and foci formation during homologous recombination

研究代表者

磯野 真由 (ISONO, Mayu)

名古屋大学・環境医学研究所・特任助教

研究者番号：90713511

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：53BP1は、DNA二本鎖切断(DSB)誘発時にはATM活性に依存してDSB部位に集積し、非同末端結合(NHEJ)を促進して相同組換え(HR)を抑制することが知られている。本研究では、G2期のHRが進行しているDSBで53BP1の集積塊(foci)を検出し、その集積の制御や意義を明らかにすることを目的とした。HR進行中の53BP1 foci数は、ATM阻害剤を添加しても未添加との違いは見られなかったが、ATR阻害剤の添加によって減少した。このことから、HR修復時のDSB部位で見られる53BP1 fociの維持には、ATM活性ではなくATR活性が関与していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究結果から、HR進行中のDSB部位における53BP1の集積の維持には、DSB誘発早期に活性化するATMではなくresectionの開始に伴い活性化するATRに依存することが示唆された。HR修復における53BP1の役割に関して、今後より詳細な解析を進めることができれば、発がん等の疾病発症のメカニズム解明の一助になると考えている。

研究成果の概要(英文)：DNA double-strand break (DSB) caused by ionizing radiation or anti-cancer drugs is a deleterious damage, which can lead to chromosomal instability. Cells have the two main repair pathways for DSB, non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). While NHEJ functions through cell cycle, HR ensues if NHEJ fails to repair DSB in S/G2 phase. 53BP1 is known as a factor promoting NHEJ via inhibiting HR. We show the activation of ATM and ATR is dispensable for the maintenance of 53BP1 foci at sites of DSBs generated by ionizing radiation at early time points (0.5 h). Interestingly, inhibition of ATR (but not ATM) disturbs the maintenance of 53BP1 foci at later time points (4 h), which is fully recovered when the inhibitor is omitted. Collectively, the results in this study suggest that localization of 53BP1 foci at DSB sites during HR is dependent on ATR activation.

研究分野：放射線照射によって誘発される細胞傷害、特に近年はDNA二本鎖切断修復機構に着目し研究を行っている。

キーワード：DNA二本鎖切断 DSB修復 53BP1 ATR活性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

放射線照射などによって誘発されるDNA二本鎖切断 (DNA double strand break: DSB)は、正確に修復されない場合、欠失変異や染色体転座などの重篤な突然変異から発がんにつながる要因の一つとなる。DSBは主に非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ)または相同組換え (homologous recombination: HR)によって修復される。DSB研究の中で、NHEJやHRの分子機構は解明されつつあるが、二つの主要な修復経路がどのように使い分けられているかは未だ多くが明らかになっていない。

DSB修復経路のバランスを調節する因子として、53BP1とBRCA1が最も注目されている。BRCA1はEXO1/DNA2が行うelongation of resectionのステップを促進することが明らかになってきた (Zhou et al., NAR, 2014)。一方で53BP1はresectionを抑制することでNHEJを促進する因子として知られている (Bunting et al., Cell, 2010)。BRCA1と53BP1は相反する機能を持ち、DSB修復経路のバランスを維持している。また近年の超高解像度顕微鏡解析により、G2期細胞における53BP1は時間の経過に伴い集積塊 (foci)が大きくなり、DSB近傍からは53BP1が除かれる現象 (53BP1 repositioning)が起こることが報告されている (Kakarougkas et al., NAR, 2013)。また53BP1 repositioningはBRCA1依存性であることから、「BRCA1は53BP1をDSB末端から外側へ移動させることで、53BP1がいないDSB末端からのresectionを促進する」というモデルが提唱されている。上記のように、細胞がresectionを行うためには、53BP1 repositioningが先だって起きる必要がある。これまでの研究では53BP1のrepositioningはHRが進行する際のマーカーのようにして使われているのみで、53BP1がどのようにしてrepositioningするかについてはほとんど研究が行われていない。

研究代表者は、BRCA1はPP4C依存的な53BP1の脱リン酸化を促進する機能があることを報告している (Isono et al, Cell Reports, 2017)。一方、S/G2期であっても、ATMが一過性に53BP1をリン酸化することでRIF1をクロマチンに集積させることも見出した。その後、DSBが残存しているにも関わらず、放射線照射後約1時間の時点で53BP1は脱リン酸化され、RIF1はクロマチンから放出される。さらに本研究に関わる重要な発見の一つとして、放射線照射直後の53BP1がリン酸化され、repositioningが起こっていない時間帯であったとしても、RIF1のノックダウンが早期のrepositioningを引き起こすことを見出している。RIF1が53BP1 repositioningに対する抑制因子であることは明らかであるが、RIF1放出以降に53BP1がどのようにrepositioningという動的変化を引き起こすのか、また動的変化がありつつもDSB部位に集積する意義は未だ不明であり、研究代表者はHRにおける53BP1を制御する分子機構に興味を持った。

2. 研究の目的

HRの進行に必要なステップである53BP1 repositioningとfoci形成維持の分子機構について、免疫蛍光染色によるfociの検出によって明らかにすることを試みた。

3. 研究の方法

本研究では、ヒト肺胞基底上皮腺癌細胞株 A549 を用いた。細胞をカバースリップ上に播種し、48 時間後に 2 Gy の X 線 (100 kV) または γ 線 (^{60}Co) 照射を行った。照射後にパラフォルムアルデヒド (paraformaldehyde: PFA) を用いて細胞を固定し、抗 γ H2AX 抗体 (ab26350, Abcam) および抗 53BP1 抗体 (A300-272A, Bethyl) を用いて免疫蛍光染色を行った。Resection の進行の指標となる RPA foci の検出に関しては、0.2% Triton-X in PBS による処理を行った後、PFA で固定し、抗 RPA 抗体 (LS-C38952, Life Span BioSciences) を用いて染色した。また、S/G2 期を染色するために抗 CENPF 抗体 (ab5, Abcam) または抗 MITOSIN 抗体 (610768, BD Biosciences)、主に S 期の細胞を検出するために EdU を用いて共染色を行った。G1 期および G2 期における foci を蛍光顕微鏡下でカウントした。阻害剤は ATM kinase 阻害剤 (ATMi, 118500, Calbiochem) および ATR kinase 阻害剤 (ATRi, VE-821, Axon1893, Axon) を使用し、ATM によってリン酸化される Chk2、ATR によってリン酸化される Chk1 を指標にウェスタンブロットによって使用濃度を検討し、ATMi は 10 μM 、ATRi は 5 μM で使用した。

4. 研究成果

(1) G2 期の DSB 部位に集積した 53BP1 の挙動

まず、放射線照射後 15 分、30 分、2 時間、4 時間、8 時間における γ H2AX と 53BP1 foci 形成数の推移について細胞周期別に検討した (図 1、左、中央)。G1 期、G2 期共に 53BP1 は照射後 30 分までに foci 数が増加し、30 分以降は foci 数の減少が見られた。この foci 数の推移は、DSB のマーカーである γ H2AX foci 形成数の推移、すなわち DSB 修復のキネティクスとほぼ一致していた。また、resection のマーカーである RPA の G2 期における foci 形成数の推移について検討した (図 1、右)。照射後 2 時間まで foci 数が増加し、以降減少を示した。また、放射線照射後 2 時間と 4 時間の RPA の foci 形成数が γ H2AX や 53BP1 の foci 形成数とほぼ同じであった。また、これまでの報告と同様、53BP1 の repositioning が 2 時間以降から見られた (未掲載)。これらの結果から、G2 期の HR が進行している DSB での 53BP1 は、repositioning しつつも foci 形成を維持していることを確認した。

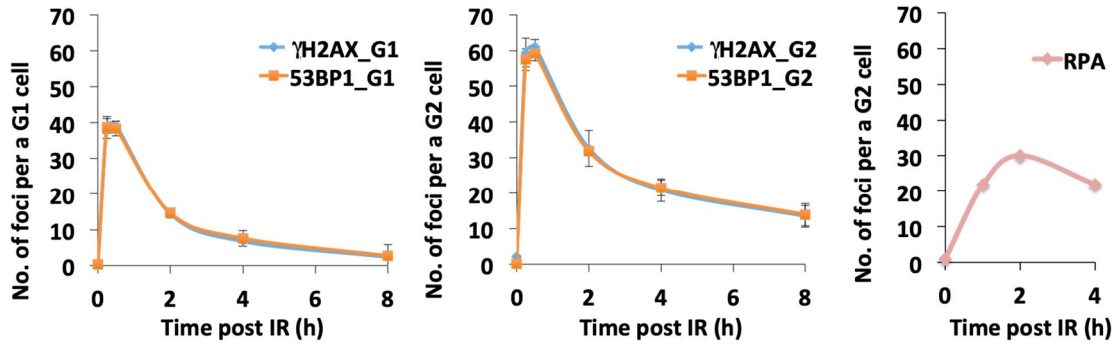


図1. DSB修復に伴うγH2AXと53BP1、RPAのfoci形成数の継時的推移

(2) HR 修復時の 53BP1 foci 形成の制御

DSB 誘発直後は ATM が活性化し、resection の進行に伴い ATR の活性が優位となり、活性が切り替わるといふ報告がある (Shiotani and Zou, Mol. Cell, 2009)。また、DSB 誘発直後の 53BP1 は ATM によってリン酸化され、そのリン酸化部位に RIF1 が一時的に集積することで resection の進行、すなわち HR を抑制している (Isono et al., Cell Reports, 2017)。これらのことから、HR の進行中に検出された 53BP1 foci 形成には ATR 活性が関与しているのではないかと考えた。そこで、G2 期の DSB 修復中に ATR 活性を抑制した際の 53BP1 の集積について検討した。まず、放射線照射後 30 分で ATRi を 30 分添加した際は未添加と変わらず 53BP1 foci の形成が見られ、形成数にもほとんど違いが見られなかった (図 2、上 (a))。しかしながら、照射後 4 時間で ATRi を 30 分添加した際は、未添加に比べて 53BP1 foci の形成数が減少していた (図 2、上 (b))。同様の条件で 53BP1 より上流で働く γH2AX foci の形成数についても検討を行った。53BP1 とは異なり、照射後 4 時間での ATRi 添加による foci 形成数の減少は見られなかった (図 2、上)。さらに、ATMi についても上記の条件で 53BP1 および γH2AX foci の形成について検討を行ったが、阻害剤の添加による両タンパクの foci 形成数の明らかな違いは見られなかった (図 2、上)。ちなみに、G1 期についても同様の実験を行ったが、53BP1 および γH2AX とともに未添加と阻害剤添加で違いは見られなかった (図 2、下)。

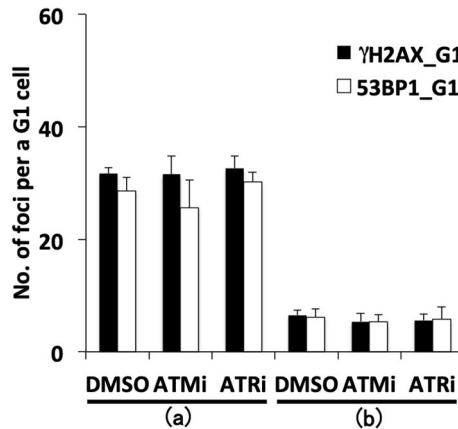
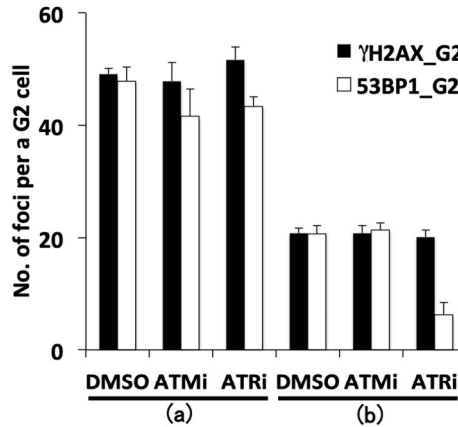
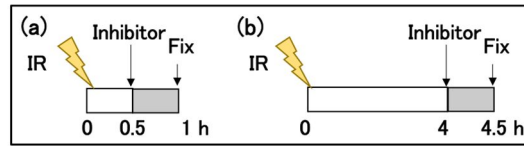


図2. 阻害剤添加後のγH2AXと53BP1のfoci形成数

また、照射後 4 時間で ATRi を 30 分添加したのち、阻害剤を除去して 30 分培養した際の 53BP1 の foci 形成数は未添加とほぼ同じ数までに回復していた (図 3)。以上の結果から、HR 修復時の 53BP1 foci の形成維持には ATR の活性が関与していることが考えられた。

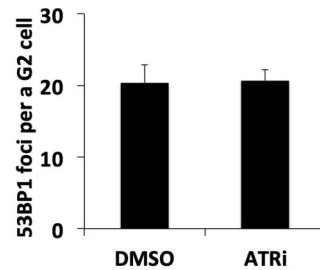
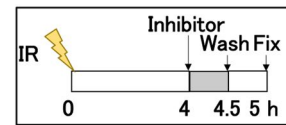


図3. 阻害剤除去後の 53BP1のfoci形成数

(3) まとめ

53BP1 は HR を抑制して NHEJ を促進すると提唱されてきたが、本研究の結果から、HR 修復時でも DSB 部位に集積することが確認され、53BP1 の HR 修復における新たな役割が存在するのではないかと推測された。また、HR 修復時の 53BP1 の foci 形成は、ATR 活性に依存して維持されている事が示唆された。しかしながら、ATR 活性が直接的または間接的に 53BP1 を制御しているのかについては明らかにできなかった。これまでに 53BP1 の repositioning は BRCA1-BARD1 によるヒストンのユビキチン化とクロマチンリモデラーの SMARCAD1 によって制御されていると

という報告がある (Densham et al., Nat. Struct. Mol. Biol., 2016)。このことから、ATR 活性と BRCA1-BARD1、SMARCAD1 との関係性についても詳細な解析を行う必要がある。また、ATR 活性阻害による DSB 部位からの 53BP1 の消失が修復過程にどのような影響を及ぼすのか検討することにより、HR 修復における 53BP1 の新たな役割を解明することができると考えている。そして、このような DSB 修復機構の詳細なメカニズムの解明は、がんなどの疾病発症の原因を探る一助になると思っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakazawa Y, Hara Y, Oka Y, Komine O, Heuvel D, Guo C, Daigaku Y, Isono M, He Y, Shimada M, Katoh K, Jia N, Hashimoto S, Kotani Y, Miyoshi Y, Tanaka M, Sobue A, Mitsutake N, Suganami T, Masuda A, Ohno K, Nakada S, Mashimo T, Yamanaka K, Luijsterburg M, Ogi T	4. 巻 180
2. 論文標題 Ubiquitination of DNA Damage-Stalled RNAPII Promotes Transcription-Coupled Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 1228 ~ 1244.e24
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2020.02.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Isono M, Hashimoto S.	4. 巻 2119
2. 論文標題 DNA Fragment Agarose Gel Electrophoresis for Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 201 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0323-9_17	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 磯野真由, 柴田淳史.	4. 巻 53
2. 論文標題 DNA二本鎖切断修復経路を最適化する時空間的制御機構	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 放射線生物研究	6. 最初と最後の頁 116-131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中沢由華, 原雄一郎, 岡泰由, 小峯起, Diana van den Heuvel, 郭朝万, 大学保一, 磯野真由, 何予希, 嶋田繭子, 加藤香奈, 賈楠, 橋下悟, 小谷祐子, 三好由夏, 田中都, 祖父江顕, 光武範史, 菅波孝祥, 増田章男, 大野欽司, 中田慎一郎, 真下知士, 山中宏二, Martijn S. Luijsterburg, 荻朋男.
2. 発表標題 転写共役ヌクレオチド除去修復機構に重要なRNAポリメラーゼユビキチン化部位の同定
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原雄一郎, 中沢由華, 岡泰由, 小峯起, Diana van den Heuvel, 郭朝万, 大学保一, 磯野真由, 何予希, 嶋田繭子, 加藤香奈, 賈楠, 橋下悟, 小谷祐子, 三好由夏, 田中都, 祖父江顕, 光武範史, 菅波孝祥, 増田章男, 大野欽司, 中田慎一郎, 真下知士, 山中宏二, Martijn S. Luijsterburg, 荻朋男.
2. 発表標題 ChIP-seqを利用したDNA損傷およびヌクレオチド除去修復のモニタリング
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 磯野真由, 萩原慶彦, 佐藤浩央, 尾池貴洋, 西良太郎, 中田慎一郎, 中野隆史, 鈴木啓司, 柴田淳史
2. 発表標題 相同組換え修復への経路切り替えを促進する時空間的53BP1動態制御機構
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>アウトリーチ活動 2018、2019年度 日本放射線影響学会 論文紹介企画小委員会委員</p>
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考