様式 C-7-2

自己評価報告書

平成２１年４月２５日現在

研究種目：基盤研究（Ｓ）
研究期間：2006～2010
課題番号：１８１０１００２
研究課題名（和文）　環境変異原によるＤＮＡ二重鎖切断の発生と発がん過程
研究課題名（英文）Induction of DNA double strand break by environmental genotoxic and carcinogenic agents

研究代表者
小松　賢志（KOMATSU KENSHI）
京都大学・放射線生物研究センター・教授
研究者番号：80124577

研究分野：放射線生物学
科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学
キーワード：環境変異原、DNA 修復、複製阻害、H2AX リン酸化、

１．研究計画の概要
（１）研究の目的：ＤＮＡ二重鎖切断はかって電離放射線照射により誘発される特殊な DNA 損傷と思われていた。しかし、ATM/ATR キナーゼによるリン酸化を受けるヒストン H2AX のリン酸化抗体を用いた最新技術では、従来の生化学的方法の数百倍―数千倍の感度増加により、細胞内に発生したわずかな DNA 二重鎖切断も検出可能になった。この結果、紫外線や DNA 鎖架橋剤などの環境変異原も DNA 二重鎖切断を誘発することが我々や他の研究者により次第に明らかとなった。そこで、本研究は各種の環境変異原による DNA 二重鎖切断発生の検証と防御機構の破綻によるゲノム不安定性、その解析結果を変異原性の検出と予防に資することを目的とする。

（２）研究の方法：①生理学的濃度の電離放射線、紫外線(UVC, UVA)、多環芳香族化合物（1-ニトロピレン、１．８-ジニトロピレン、ベンゾ「ａ」ピレン、３-ニトロベンズアントロン、４-アミノビフェニル）トポイソメレース阻害剤（ゲニステン、エトポシド）、DNA 架橋剤（ソラーレン、マイトマイシンＣ）、アスベスト（クリソタイル）等で処理後、細胞周期依存性を確認するために H2AX リン酸化抗体を用いて免疫染色を行った。また、BrdU との二重染色を行う。②環境変異原処理後の損傷乗り越え合成を酵素 Pol eta のフォーカス形成能および本研究で開発された損傷乗り越え合成アッセイ系を用いて測定する。また、ゲノム DNA シークエンスによる遺伝子突然変異の性質を検討する。③環境変異原処理後の SMC1 経由チェックポイントを検討する。④ヒストン H2AX や H2B の化学的修飾と相同組み換え能との関係を検討する。

２．研究の進捗状況
（１）我々が調べた（紫外線 UVA を除く）全ての環境変異原で H2AX リン酸化が起こり、しかも DNA 複製期に特異的に発生した。また、DNA 二重鎖切断の蛋白 NBS1 と共局在した。この結果から環境変異原の指標としての H2AX リン酸化の有効性が示された。
（２）ソラーレンの DNA への結合は UVA 照射により促進されるので、複合的汚染による DNA 損傷の増加の可能性が示された。
（３）紫外線に加えて DNA 鎖架橋剤や多環芳香族化合物も損傷乗り越え DNA 合成を誘導すること、その結果としてトランスバージョン変異を高率に誘導する事が明らかとなった。
（４）環境変異原処理によるゲノム不安定性の誘導機構には損傷乗り越え DNA 合成、チェックポイント制御や細胞核外で起こる中心体数の異常などの複数経路が原因となることがわかった。また、これらにはいずれも、DNA 二重鎖切断蛋白 NBS1 が関与しており、NBS1 欠失が細胞に高感受性をもたらすことが判明した。
（５）DNA 複製時に重要とされる相同組み換え修復にヒストン H2B の化学修飾が必須であること、そして H2AX のリン酸化が相同組み換え蛋白の損傷部位への集結を促進する事が示された。

３．現在までの達成度
当初の目的に向けて順調に研究が進展しており、予定どおりの成果が見込まれる。
（理由）
本研究で対象とした顕著な変異原性が報告されている全ての物質・放射線でヒストン H2AX のリン酸化が観測され、環境変異原性の新たな生物学的指標の確立が期待される。また、これらの処理に対する高感受性細胞株の樹立にも成功して、高感度検出系開発への道筋が開けた。その一方で、ゲノム不安定化の誘導経路が予想以上に複雑であることが判明した。しかし、その結果、現在まで不明であった相同組換えに於ける高等真核生物のクロマチン・リモデリングに必要な H2B ユビキチン化や損傷乗り越え合成開始となる PCNA ユビキチン化の制御機構などの革新的な学術的知見が得られており、当初目的を予定通り完了出来る見通しである。

４．今後の研究の推進方策
環境変異原により H2AX が網羅的にリン酸化受けることが示されたので、変異原検出への有用性を検討する予定である。下図に示したように環境変異原によるゲノム不安定化は予想以上に複雑な経路で起こることが分かったので、それぞれについて解析を進める。特に H2AX リン酸化の生物学的な意義や損傷乗り越え合成と相同組換えの関係を明らかにする予定である。

５．　代表的な研究成果
（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５件）
①Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Bruma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, Komatsu K. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. Biochem Biophys Res Commun., 査読あり, in press, 2009.
②Inactivation of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to excess centrosome duplication via the ATR/BRCA1 pathway. Shimada M, Sagae R, Kobayashi J, Habu T, Komatsu K,K. Cancer Research, 査読あり,69:1768-75, 2009.
③ NBS1 prevents chromatid-type aberrations through ATM-dependent interactions with SMC1. Antoccia A, Sakamoto S, Matsuura S, Tauchi H, Komatsu K. Radiat Res. 査読あり, 170:345-352, 2008
④Polyaromatic hydrocarbons cause histone H2AX phosphorylation in the S-phase of the cell cycle. Shimohara, C., Sawai, T. and Yagi, T. Genes and Environment, 査読あり,30, 92-99, 2008.
⑤ Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. Sakamoto. S., Iijima. K., Mochizuki. D., Nakamura. K., Teshigawara. K., Kobayashi. J., Matsuura. S., Tauchi. H. Komatsu K. Oncogene. 査読あり, 26:6002-9, 2007.

〔学会発表〕（計５件）
①小松賢志、ヒストン H2B ユビキチン化による相同組み換え修復の制御、第 68 回日本癌学会学術総会シンポジウム、横浜、2009 年 10 月
②Kenshi Komatsu, Role of NBS1 in genome stability after genotoxic and non-genotoxic stresses, Ataxia-Telangiectasia Workshop, Ohtsu, April,2008
③Kenshi Komatsu, Multiple roles of NBS1 in genome stability after genotoxic and non-genotixic stresses, 10th International Workshop on Radiation Damage to DNA、Fukushima,June,2008
④Kenshi Komatsu, UV sensitivity of cells from Nijmegen Breakage Syndrome and the underlying mechanisms. 3rd Japan-US DNA Repair Meeting, Sendai, May 2007
⑤Kenshi Komatsu,NBS1 foci formation and divergent roles in response to DNA damage-eliciting agents. International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (A-T) and ATM. Banff, Canada. September 2006

〔図書〕（計１件）
Kenshi Komatsu, Springer, Radiation Health Risk Sciences, 2007, 340, (183-192).

ホームページ
http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/Genome/kiban/index.html