

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11645

研究課題名(和文) DNA二本鎖切断同士のペアリングを制御する分子ネットワークの解明

研究課題名(英文) Molecular network that regulates pairing between DNA double-strand breaks

研究代表者

山内 基弘 (YAMAUCHI, Motohiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60437910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：放射線被ばくによって起こる最も重大なゲノム変化のひとつにChromosome rearrangement (CR)があるが、その生成・生成抑制の分子メカニズムはよくわかっていない。CRはゲノムの異なる領域に生じた2つのDNA二本鎖切断(DSB)の結合によってできるため、CR生成には2つのDSBが動いて近接する「DSBペアリング」が必要である。私はすでにDSBペアリングを制御する因子を4つ同定していたが(Yamauchi et al. Sci. Rep. 2017)、本研究により、さらに2つの因子KAP1およびCHD3がDSBペアリングの頻度に影響を与えていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Chromosome rearrangement (CR) はがんや白血病、リンパ腫その他、様々な疾患で高頻度に見られるゲノム変化である。またCRIは遺伝子融合を引き起こすこともあり、生成した融合遺伝子はがんや造血器腫瘍のドライバーとなることが分かっている。しかしながら、CRの生成・生成抑制機構はこれまでよくわかっていなかった。本研究ではCR生成の必須ステップであるDSBペアリングを制御する2つの因子を同定した。またDSBができるゲノム内の領域によってDSBペアリングの頻度が異なることも明らかにした。これらの発見は、CRの生成メカニズムのより深い理解につながるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：Chromosome rearrangement (CR) is a genomic alteration caused by radiation exposure. The mechanisms which produce or suppress CR remains poorly understood. CR is generated via misrejoining between two DNA double-strand breaks (DSBs) occurring different genomic locations. Therefore, CR requires “DSB pairing”, which means that two DSBs move and come in close proximity. I already identified four factors regulating DSB pairing (Yamauchi et al. Sci. Rep. 2017). This study revealed two more factors, KAP-1 and CHD3, affected the frequency of DSB pairing.

研究分野：放射線生物学

キーワード：Chromosome rearrangement DNA二本鎖切断 ユークロマチン ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

細胞が放射線に被ばくすると DNA 二本鎖切断 (DSB) が生じる。DSB が正しく元通りに修復されれば問題ないが、間違っ て修復されれば転座や逆位などの Chromosome rearrangement (CR) ができる。CR は白血病やリンパ腫、固形癌のドライバーである融合遺伝子を生じかねない重大な染色体異常であるが、その生成・生成抑制の分子メカニズムはよくわかっていない。CR はゲノム内の異なる領域にできた 2 つの DSB がつなぎかわることによって生成するが、そのためにはまず、2 つの DSB が動いて近接する

「DSB ペアリング」が必要条件となる。そこで私はこれまで図 1 のような CR 生成の 3 ステップモデルを立てて研究を進めてきた。

私は以前発表した論文 (Yamauchi et al. Sci. Rep. 2017) において、DSB に集積する 53BP1 蛋白質に蛍光タグをつけた融合蛋白質を細胞に発現させて DSB 部位を可視化し、DSB ペアリングが実際に生きたヒト細胞で起こっていることを示した。さらに DSB ペアリングが、主要な DSB 修復

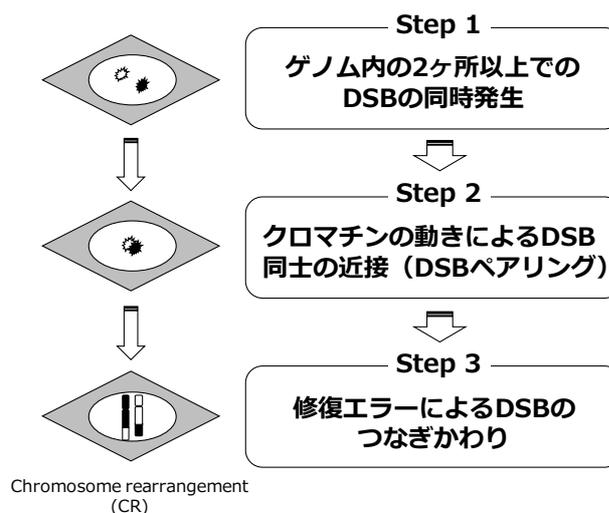


図 1 本研究における CR 生成の 3 ステップモデル

因子である Ku80、DNA-PKcs、ATM、および 53BP1 蛋白質によって制御されていること、またクロマチンのゆるみ具合が DSB ペアリングの頻度に影響を与えていることを明らかにした。しかしながら、上記の研究では多数の因子をスクリーニングしたわけではなく、代表的な DSB 修復因子のみを調べただけであるため、DSB ペアリングを制御しているのが上記の 4 因子のみとは考えにくい。ほかにも DSB ペアリングの制御因子が存在する可能性は非常に高いと考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新たな DSB ペアリング制御因子を見つけ、DSB ペアリング制御の分子ネットワークを明らかにすることであった。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

細胞は、テロメラーゼで不死化した正常ヒト線維芽細胞 BJ-hTERT を用いた。BJ-hTERT は 10% 牛胎児血清および 10 mM HEPES を含む MEM α で 37°C、5% CO₂ の環境にて培養した。

(2) γ 線照射

細胞に DSB を生成するため、 γ 線照射を行った。 γ 線照射には Cs-137 γ 線照射装置 (ポニー工業、大阪) を用い、線量率 1 Gy/min で行った。

(3) 細胞への siRNA 導入

細胞への siRNA 導入には、Lipofectamine RNAiMAX (以下 R-MAX と略。Life Technologies, USA) を用いた。Opti-MEM (Life Technologies, USA) に siRNA および R-MAX を加えて混ぜ、室温で 10-20 分置いた。その間に細胞をトリプシンではがし、メディアウムで懸濁した。その後、細胞懸濁液を siRNA/R-MAX/Opti-MEM 混合液と混ぜ、35 mm ディッシュにまいた。γ線照射などの実験は siRNA 導入 2-3 日後に行った。

(4) DSB ペアリングの可視化

DSB ペアリングの可視化には、DSB 部位に集積する 53BP1 タンパク質のフォーカスを用いた。また 53BP1 自体をノックダウンして DSB ペアリングを見る際には、53BP1 の最小フォーカス形成ドメインと蛍光タンパク質 mCherry の融合タンパク質 mCherry BP1-2 を用いた。なお mCherry BP1-2 は本研究で用いた 53BP1 siRNA に耐性である。2 個以上の 53BP1 フォーカスが近接しているものを DSB ペアリングとしてカウントした。53BP1 フォーカスの可視化は蛍光免疫染色法により行った。S 期をラベルするため、γ線照射 30 分前にメディアウムに EdU を添加した。γ線照射後、細胞を 3%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液で固定し、0.2% Triton X-100 リン酸緩衝液で膜浸透化処理を行った。その後、抗体希釈液 (2%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液) で希釈した 53BP1 に対する 1 次抗体を 37°C で 30 分処理した。また S/G2 期細胞を可視化して解析から除去するため、S/G2 期のマーカーである CENPF タンパク質に対する 1 次抗体も同時に処理した。次に蛍光色素 Alexa が結合した 2 次抗体を処理し、最後に EdU 検出反応を行った。53BP1 フォーカス同士の近接 (ペアリング) の解析は EdU(-)/CENPF(-) の G1 期細胞で行った。

4. 研究成果

siRNA スクリーニングで新たな DSB ペアリング制御因子を探索した結果、2 つのヘテロクロマチン構成因子、KAP1 および CHD3 が DSB ペアリングの頻度に影響を与えていることがわかった。この結果はクロマチンの凝集度が DSB ペアリングの頻度に影響することを示唆する。以前の研究で 53BP1 をノックダウンすると DSB ペアリングが減少することは分かっていたが、KAP1 あるいは CHD3 を 53BP1 と同時にノックダウンすると、DSB ペアリングの頻度が回復することがわかった。53BP1 はヘテロクロマチンに DSB ができた際、クロマチンを弛緩させることにより DNA 修復因子が DSB にアクセスしやすくすることが知られているが、この結果は、53BP1 によるヘテロクロマチン弛緩が何らかのメカニズムで DSB ペアリングに関与していることが示唆される。そこで次に、ヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域における DSB ペアリングの頻度を調べ、比較した。その結果、DSB ペアリングの頻度は、ヘテロクロマチン領域と比べ、ユークロマチン領域で有意に低いことが分かった。これは遺伝子が多いユークロマチン領域において DSB ペアリングを抑制する何らかのメカニズムが存在することを示唆している。

以上をまとめると、本研究により、新たな DSB ペアリング制御因子を 2 つ同定した。CR はほぼ全てのがんで見られるゲノム異常であるが、その生成機構は未だ不明である。本研究により、クロマチンの凝集度が CR の前段階である DSB ペアリングの頻度に大きな影響を与えていることが明らかとなった。本研究の成果により、CR の生成機構への理解がより深まることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 山内基弘、柴田淳史、鈴木啓司、宮川清
2. 発表標題 DNA二本鎖切断の相同組換え修復におけるBRCA1とスプライシング因子SART1の協調的働き
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内基弘、柴田淳史、加藤玲於奈、安原崇哲、平川美弥子、ハンムームー、宮川清、鈴木啓司、松田尚樹
2. 発表標題 スプライシング因子SART1がDNA二本鎖切断の相同組換え修復を促進するメカニズム
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内基弘、柴田淳史、安原崇哲、加藤玲於奈、平川美弥子、Moe Moe Han、宮川清、鈴木啓司、松田尚樹
2. 発表標題 DNA二本鎖切断の相同組換え修復におけるスプライシング因子SART1とBRCA1の協調的働き
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 山内基弘、柴田淳史、安原崇哲、萩原慶彦、平川美弥子、ハンムームー、鈴木啓司、松田尚樹
2. 発表標題 DNA二本鎖切断の相同組換え修復におけるBRCA1とスプライシング因子SART1の関係
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

1. 発表者名 Aizhan Shakayeva, Motohiro Yamauchi, Miyako Hirakawa, Naoki Matsuda
2. 発表標題 The role of splicing factor SART1 in DNA double-strand break repair by homologous recombination.
3. 学会等名 The 14th International Workshop on Ionizing Radiation Monitoring. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motohiro Yamauchi, Atsushi Shibata, Takaaki Yasuhara, Yoshihiko Hagiwara, Miyako Hirakawa, Aizhan Shakayeva, Moe Moe Han, Keiji Suzuki, Naoki Matsuda.
2. 発表標題 Pre-mRNA splicing factor SART1 facilitates homologous recombination repair by recruiting BRCA1 to DNA double-strand breaks.
3. 学会等名 The 3rd International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science. (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山内基弘、平川美弥子、松田尚樹
2. 発表標題 放射線被ばくで生じたDNA損傷を正確に修復する分子メカニズム
3. 学会等名 日本放射線安全管理学会第19回学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------