

平成 23 年 1 月 28 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2007～2009
 課題番号： 19310035
 研究課題名 (和文) 新規細胞系を用いた放射線 DNA 損傷の修復精度と突然変異誘発機構の
 解明
 研究課題名 (英文) Study on DNA repair mechanism and mutagenesis using novel cell lines

研究代表者
 田内 広 (TAUCHI HIROSHI)
 茨城大学・理学部・教授
 研究者番号： 70216597

研究成果の概要 (和文)：

本課題は、遺伝子ノックアウトや遺伝子導入といった手法を用いて新たな突然変異や修復の検出系を樹立することと、放射線による遺伝子突然変異誘発における放射線の線質や修復タンパク質の役割を解明することを目的とした。研究の結果、DNA 損傷に応答して異常な細胞を排除する機構の制御において、新たなタンパク質の相互作用を発見した。また、突然変異誘発の高感度検出系を用いて、粒子線による「逆線量率効果」が放射線の線エネルギー付与 (LET) に依存して起きることを証明した。さらに、DNA 損傷修復と細胞周期との関連を調べるための新たな実験系も樹立し、その解析を継続して進めている。

研究成果の概要 (英文)：

In this study, we focused on the regulation of DNA damage repair pathways and induction of somatic mutation by radiation. We found that NBS1 regulates a novel apoptosis induction following DNA damage by disrupting the Ku70-Bax complex, which is required for activation of the mitochondrial apoptotic pathway. In addition, by using a hyper-sensitive mutation detection system, we successfully observed the reverse dose-rate effect for carbon beam at higher LET but not that at lower LET. Taken together with our previous publications on mutation induction by high LET radiation, the observation indicates that the changes in cell cycle dependence of mutation induction dependent on radiation LET should be a main cause of the reversed dose rate effect for somatic mutation. Finally, we established novel assay systems that can be applied for study on DNA repair and somatic mutation induction.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009 年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

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：放射線、突然変異、DNA 損傷修復

1. 研究開始当初の背景

たとえ低線量であっても放射線に照射された細胞内のDNAにはDNA二重鎖切断(DSB)が生じる。その大半は再結合(修復)されることで生体は維持されているが、修復不能な損傷や修復ミスが残ると、細胞の致死や突然変異を誘発することになる。そのため、DSB修復やそれに伴うシグナル制御は、放射線の生物影響を評価する上で特に考慮すべき重要な要素となる。DSB修復の機構ならびにその結果として現れる突然変異や癌化などとの関係を解明できれば、環境あるいは人工放射線のリスク評価において、遺伝的バックグラウンドのような生物学的な要因を考慮する際の重要な情報が得られ、よりきめの細かい評価が可能となるはずである。

DSBの修復機構には、大きく分けて非相同末端結合(non-homologous end joining: NHEJ)と相同組換え(homologous recombination: HR)の2つが存在し、細胞周期によってこの2つの経路を使い分けることでゲノム安定性が保たれている。それらの分子機構に関して、個々のタンパクの機能は少しずつ明らかになってきているが、修復機構に関わるタンパク機能とDNA修復の精度、さらにはDNA損傷に起因する遺伝子変異などとの関連は未解明のままである。

DSBの修復に中心的に関わるタンパク質とされている Nbs1 や Ku70 をはじめとした DNA 損傷修復タンパク機能が、放射線被ばくによって引き起こされる突然変異や遺伝的不安定性の誘導にどのように関わっているかを解明するためには、それぞれの遺伝子あるいは両方の遺伝子に機能不全が生じた場合に、DSB 修復の効率やその精度、その後の突然変異などがどのように影響されるかを解析することが有効であると考えて、本課題を計画した。そのために、遺伝子ノックアウトが可能なニワトリ DT40 細胞を用いて、新たな高感度突然変異検出系の作成に取り組んできた。

修復機構の分子メカニズムやシグナル経路の研究では、新たな論文が次々に発表されており、断片的ではあるがタンパク間の相互作用もあきらかになりつつある。しかし、その一方で、個々のタンパク機能に支えられた DSB 修復機構と実際に細胞や個体に現れる突然変異とを直接に関連づけて理解しようというような実験的アプローチは例がなかった。本研究はそのアプローチに正面から取り組んだものである。これまでの研究で最終段階に到達しつつある全く新たな突然変異実験システムと、新規の HR 解析細胞系をう

まく組み合わせることにより、学術的にもインパクトの高い成果が期待できると考えている。

2. 研究の目的

本研究課題では、HRとNHEJという2つのDSB修復系路に関わるタンパク機能を、修復精度の制御という新たな視点から解明することを目指している。これらの主要な2つのDSB修復系路を制御する代表タンパクとして、Nbs1ならびにKu70を取り上げる。Nbs1は、宝珠選考感受性や高発がん性を呈する遺伝病ナイミーヘン症候群(Nijmegen breakage syndrome: NBS)で変異を起こしているタンパク質であり、放射線によるDSB修復やシグナルのキーとなるタンパクとして国内・国外を問わずその機能解析が精力的に行われている。このような状況で、Nbs1遺伝子のクローニングから一貫して機能解析に取り組んでいる申請者らの研究は、先駆的な放射線生物学研究として世界的にも注目を集めてきた。特に「Nbs1が高等真核生物におけるHR修復に必須である」という発見は2002年11月にNature誌に掲載されるなど高く評価されたが、この「Nbs1がHR修復に必須である」という事実を、ヒト細胞でも確認し、データの収集を勧めたので(Sakamoto et al, 2007として報告)、このことからHR修復の制御タンパクとしてNbs1を、もう一方のNHEJには必須なタンパクとしては、既に広く認知されているKu70を取り上げることとした。

具体的な研究として、(i)HRに必須であることが明らかになった Nbs1 複合体(Nbs1/Mre11/Rad50 複合体)あるいはNHEJに必須な Ku70 の機能や、放射線の線質と体細胞突然変異の頻度との関係解明、(ii) Ku70 と NBS1 複合体との相互作用が DNA 損傷修復効率やアポトーシスの誘発に与える影響、(iii) HR による DSB 修復効率と細胞周期ならびに修復関連タンパク量との関係、の3点を明らかにすることを目的とした。iおよびiiではノックアウト細胞の作成や、細胞工学的手法による新規の突然変異検出系を組み合わせた実験用細胞系を構築し、iiiの研究には、新たなHR修復アッセイ系を樹立して使用する。これらにより DNA 損傷修復の制御から遺伝的不安定性につながる機構を包括的に解明する糸口をつかむことを目指した。

3. 研究の方法

(1) 2つの DNA 損傷修復を制御するタンパク質間の相互作用解析

代表者らは、ニワトリ DT40 細胞を用いた NBS1 ノックアウト細胞を作成し、NBS1 が放射線などで生じる DNA 二重鎖切断の相同組換え修復に必須であることを明らかにしているが、その後の NBS1 ノックアウト細胞の表現型解析の過程で、NBS1 が p53 とは独立に放射線誘発アポトーシスを制御するという事象を発見した。この事象をさらにヒト細胞で確認したので、それを詳細に解析した。まず、NBS1 によるアポトーシスの制御機構を明らかにするために、SV40 でトランスフォームした NBS 患者由来細胞に種々の変異 NBS1 遺伝子を導入した。それらの細胞を使って X 線照射後のアポトーシスを時間を追って調べるとともに、アポトーシス誘導関連タンパク質の翻訳後修飾や量的な変化をウエスタンブロット、免疫沈降によって解析した。

(2) 体細胞突然変異の新たな検出系

これまでの研究で進めてきた DT40 を用いた遺伝子ノックアウトが可能な高感度突然変異検出系は、本計画の申請時（平成 18 年 10 月）時点で Hprt ノックアウト細胞の最終確認を行っている段階であったので、突然変異系としての有効性を再度確認する作業を続けた。しかし、この実験系は計画当初に危惧していたとおり、細胞の 6-チオグアニン感受性が安定しないことから、実験系として使えないことがわかったので、その後の継続は断念せざるを得なかった。代わって、既に樹立していたヒト X 染色体導入ハムスター細胞を用いた突然変異検出系 (Tauchi *et al.*, Fusion Sci. Tech. 2002) を利用して実験を進めることとした。この細胞は 0.2Gy という低線量の放射線でも有意な突然変異の上昇が認められることが既に確認できている細胞系であり、低線量率での照射実験に適していると考え、本課題での各種の放射線を用いた体細胞突然変異の解析や DNA 修復機構との関連の解析に中心系に使用することとした。

4. 研究成果

(1) DNA 損傷に応答する Ku70 と NBS1 の相互作用

放射線高感受性と高発がん性を呈するナイミーヘン症候群 (NBS) の原因タンパク質である NBS1 は、DNA 二重鎖切断 (DSB) に応答した ATM キナーゼの活性化や細胞周期チェックポイント、相同組換えによる DSB 修復の制御に関与している。課題代表者ら

は、本研究を開始する前に、NBS1 が p53 とは独立の経路を通じてアポトーシスを制御するという事象を発見していたので、その機構について詳細な解析を続けた。当初の発見では、NBS 患者由来のリン芽球では、DSB 誘導後に起きるアポトーシスが著しく抑制され、その抑制の程度が AT 患者細胞よりも強くあらわれること、および NBS 細胞における p53 応答の異常は AT 細胞よりマイルドであることから、NBS1 が ATM-p53 経路とは異なる経路を通じて DSB 誘発アポトーシスに関与していることを予想していた。そこで本課題では、NBS 患者細胞を用いてアポトーシスに関わるエフェクタータンパク質の変化と、これに関与する NBS1 の機能ドメインを解析した。その結果、NBS1 のアミノ末端 (N 末) の FHA ドメインや、カルボキシル末端 (C 末) に位置する MRE11 結合ドメインはアポトーシス誘発には必須ではないことを見出した。一方で、NBS1 の中央部に位置するリン酸化部位が重要な役割を有していることが示唆された。放射線被ばく後にアポトーシスが誘発される直前に見られる NBS1 リン酸化は、ATM キナーゼの阻害剤 KU55938 では抑制されず、ATM および ATR を阻害するカフェイン処理によって抑制されたことから、アポトーシス誘導に関わる NBS1 リン酸化は ATR によるものであることが推測された。このことは、ATR キナーゼの異常で発症する ATR-セッケル症候群患者由来の細胞で放射線被ばく後数日から現れるアポトーシス誘導が見られないという事実から裏付けることができた。さらに、免疫共沈法を用いてアポトーシス誘導と相関して NBS1 との相互作用が見られるタンパク質を調べた。その結果、NBS1 とは異なる機構で DSB 修復に関わっている Ku70 タンパク質がアポトーシス誘導の鍵となるタンパク質 Bax と Ku70-Bax 複合体を形成しているが、NBS1 は放射線による DNA 損傷に反応してこの Ku70-Bax 複合体を解離させることを見出した。Ku70-Bax 複合体の解離は Bax 活性化を誘発し、この複合体解離は Ku70 のアセチル化に関わっており、それが NBS1 機能に依存しているものと考えられた。これらの観察から、NBS1 は相同組換えによる DSB 修復や S 期チェックポイントのみならず、独自のアポトーシス制御経路を通じた異常細胞の排除により、ゲノムの安定性維持に機能していることが推測された (図 1)。興味深いことは、Ku70 と NBS1 が DSB 修復のみならず、アポトーシスの誘導においても互いに競合しているかのように機能しているという点である。この 2 つのタンパク質の相互作用の詳細は、本課題に続く新たな研究計画において詳細に解析を行う予定である。

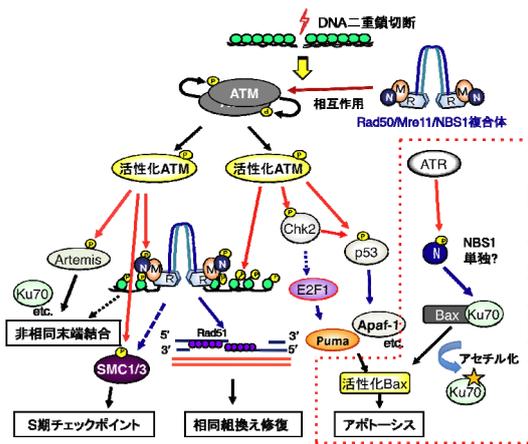


図1 放射線による DNA 損傷応答における NBS1 と Ku70 との相互作用
赤い点線で囲った経路が本研究で新たに発見した経路である。

(2) 突然変異の新規実験系を用いた高 LET 放射線影響の解析

核分裂中性子をはじめとする高 LET 放射線に特異な生物現象として、体細胞突然変異や細胞癌化において線量率が非常に低くなると逆に生物影響が大きくなるという「逆線量率効果」が知られている。この現象は最初に核分裂中性子による細胞のがん化実験で報告され、その後体細胞突然変異でも起こることが明らかとなったものである。その一方で、中性子以外の高 LET 放射線における逆線量率効果の有無はほとんど明らかになっていないのが実状であった。その理由として、従来の突然変異実験系では、誘発頻度の違いを確認するのに比較的まとまった線量が必要であるため、加速器のような限られた使用時間の放射線源でその確認をするような低線量率照射実験を行うのが困難であることがあげられる。そこで、代表者らは本課題の開始前に樹立していた、正常ヒト X 染色体を移入した HPRT 欠損ハムスター細胞を用いた「高感度突然変異検出系」を用いて、総線量を減らすことにより、加速器での低線量率実験が可能なレベルに照射時間を大幅に短縮することに成功した。照射には放医研重粒子がん治療装置 (HIMAC) からの炭素イオンビーム (290 MeV/u) を用い、LET 13 KeV/mm と 68 KeV/mm での線量率依存性を比較した。低線量率照射では、核分裂中性子で逆線量率効果が認められた線量率 (0.16 cGy/min) と同等あるいはそれ以下に設定し、照射中の積算線量をシンチレーションカウンタで同時モニターして線量精度を維持した。総線量は 0.1 Gy に設定した。これは、予備実験の結果、重粒子線の

場合は 0.1Gy でも十分有意な突然変異頻度の上昇が検出できたことによる。このような条件下で照射実験を行い、Hprt 欠損突然変異を解析した結果、13 KeV/mm では線量率の変化によって突然変異頻度はほとんど変化しない一方で、68 KeV/mm の場合には、線量率の低下にともなって突然変異頻度が有意に上昇し、中性子に限らず高 LET 放射線では逆線量率効果が起こることが示された (図2)。また、重粒子線による突然変異の細胞周期依存性は LET によって変化し、高 LET では中性子線と同じような細胞周期依存性のパターンをたどることから、逆線量率効果には放射線の LET と突然変異感受性における細胞周期依存性が主要な原因として寄与しているということを証明した。

なお、本研究の重粒子線照射は、放射線医学総合研究所重粒子がん治療装置の共同利用実験として実施したものであり、本課題では得られた突然変異体の遺伝子解析を中心として実施した。

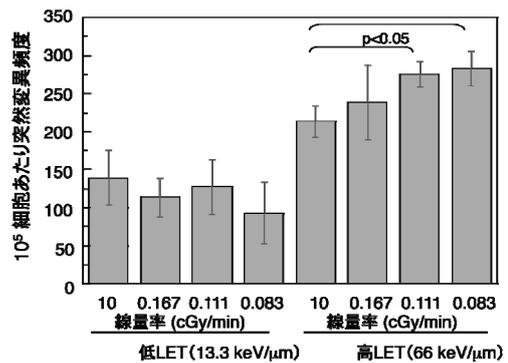


図2 突然変異高感度検出系を用いて発見した重粒子線の弱線量率効果 (Tauchi et al. J. Radiat. Res. 2009)

(3) 新たな DNA 損傷修復実験系の樹立

突然変異の高感度検出系を用いた解析を行う一方で、DNA 損傷修復と細胞周期との関連を調べるために、HR 修復効率の解析に用いる新規の実験系の樹立を目指した。その結果、DSB 導入の時間と部位が制御可能な細胞系の樹立に成功し、細胞の分裂周期を同調させて相同組換え修復の細胞周期依存性を解析する実験データの取得を進めている。現段階で得られているデータは、G1 期では相同組換え修復が非常に起きにくく、S 期によく起きる傾向を示している。しかしながら、当初の実験系樹立に用いた細胞では細胞周期の同調率が不十分であったことから、細胞周期をより同調しやすい細胞に変えて実験系を再構築することとした。こちらの細胞系もすでに

樹立を完了しており、今後解析を続けて行く計画である(報告時点で実験継続中、未発表)。さらに、ニワトリ DT40 細胞を用いて、DNA 損傷修復の主要な2つの経路である相同組換え修復を制御する NBS1 と非同末端結合の中心タンパク質である Ku70 との関係を解析するための新たなダブルノックアウト細胞の樹立にも成功し、細胞の増殖速度や放射線感受性、DNA 修復効率などの表現型解析を行っている(論文準備中)。本課題で樹立したこれらの細胞系は、先見のかつ独創的な実験系であり、今後の解析を進めることによって大きな成果に展開できるものと考えている。

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8件)

1. Tauchi, H., Waku, H., Matumoto, E., Yara, S., Okumura, S., Iwata, Y., Komatsu, K., Frusawa, Y., Eguchi-Kasai, K., Tachibana, A.: Two major factors involved in the reverse dose-rate effect for somatic mutation induction are the cell cycle position and LET value. *J. Radiat. Res.* 50, 441-448, 2009. 査読有
2. Nakano, T., Katafuchi, A., Matsubara, M., Terato, H., Tsuboi, T., Masuda, T., Tatsumoto, M., Pack, S.-P., Makino, K., Croteau, D. L., Van Houten, B., Iijima, K., Tauchi, H., Ide, H.: Homologous recombination but not nucleotide excision repair plays a pivotal role in tolerance to DNA-protein crosslinks in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 284, 27065-27076, 2009. 査読有
3. Iijima, K., Ohara, M., Seki, R., Tauchi, H.: Dancing on damaged chromatin: Functions of ATM and the RAD50/MRE11/NBS1 complex in cellular responses to DNA damage. *J. Radiat. Res.* 49, 451-464, 2008.
4. Ohtsuka, K., Koana, T., Tomita, M., Ogata, H., Tauchi, H.: Rapid myeloid recovery as a possible mechanism of whole-body radioadaptive response. *Radiat. Res.* 170, 307-315, 2008. 査読有
5. Iijima, K., Muranaka, C., Kobayashi, J., Sakamoto, S., Komatsu, K., Matsuura, S., Kubota, N., Tauchi, H.: NBS1 regulates a novel apoptotic pathway through Bax activation. *DNA Repair* 7, 1705-1716, 2008. 査読有
6. Someya, M., Sakata, K., Matsumoto, Y., Tauchi, H., Narimatsu, H., Hareyama, M.: Association of DNA-PK activity and radiation-induced NBS1 foci formation in

lymphocytes with clinical malignancy in breast cancer patients. *Oncology Report* 18, 873-878, 2007. 査読有

7. Morishima, K., Sakamoto, S., Kobayashi, J., Izumi, H., Suda, T., Matsumoto, Y., Tauchi, H., Ide, H., Komatsu, K., Matsuura, S.: TopBP1 associates with NBS1 and is involved in homologous recombination repair. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 362, 872-879, 2007. 査読有
8. Sakamoto, S., Iijima, K., Mochizuki, D., Nakamura, K., Teshigawara, K., Kobayashi, J., Matsuura, S., Tauchi, H., Komatsu, K.: Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene* 26, 6002-6009, 2007. 査読有

[学会発表] (計7件)

1. 田内 広: DNA 修復タンパク NBS1 と Ku70 の相互作用. 第32回日本分子生物学会年会, 横浜, 2009年12月10日.
2. Tauchi, H.: Post-translational modification of NBS1 regulates apoptosis induction in response to DNA damage. 第68回日本癌学会学術総会, 横浜, 2009年10月2日.
3. 田内 広: NBS1 が制御する新規の DNA 損傷誘発アポトーシス経路. 日本分子生物学会・生化学会合同年会 BMB2008, 神戸, 2008年12月11日
4. Tauchi, H.: Interaction Between NBS1 and Ku70 Regulates Apoptosis Induction by Radiation. International Workshop on DNA damage (Fukushima. 2008年6月11日.
5. 田内 広: NBS1 による Bax 活性化を通じた DNA 損傷誘発アポトーシスの制御. 日本分子生物学会・生化学会合同年会ワークショップ, 横浜, 2007年12月11日.
6. 飯島健太、村中千寿子、小林純也、坂本修一、小松賢志、田内 広: NBS1 による p53 非依存的な放射線誘発アポトーシス制御の機構. 日本放射線影響学会第50回大会, 千葉, 2007年11月16日.
7. Tauchi, H.: NBS1 regulates the induction of apoptosis following radiation damage to DNA. 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, USA, 2007年7月10日.

[その他]

ホームページ等

<http://tauchilab.sci.ibaraki.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田内 広 (TAUCHI HIROSHI)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：70216597