

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007 ～ 2008
 課題番号：19710050
 研究課題名 (和文) DNA 二重鎖切断センサー蛋白複合体の試験管内構築と細胞初期応答の解析
 研究課題名 (英文) Establishment of sensor complex of DNA double-strand breaks in vitro and analysis of initial steps in mammalian cells
 研究代表者
 加藤 晃弘 (KATO AKIHIRO)
 京都大学・放射線生物研究センター・研究員
 研究者番号：70423051

研究成果の概要： X線やγ線といった電離放射線は、生命の設計図である DNA を切断してしまうが、この切断の修復が細胞内でどのように行われているかを調べるため、その初期過程である DNA 切断末端の消化について解析を行った。その結果、NBS1 タンパク質が末端消化に必要であることが明らかとなった。また、NBS1 と結合する既知の DNA 消化タンパク質 MRE11 はこの過程に不必要であるという結果が得られ、未知の DNA 消化タンパク質の関与が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

研究分野：DNA 修復

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：DNA 修復、放射線、DNA 二重鎖切断

1. 研究開始当初の背景

電離放射線は DNA の二重鎖を切断する。DNA の二重鎖切断 (DSB) はそのままでは細胞に死をもたらすため、細胞はそれを修復する機構を備えている。しかし、この修復機構によって DNA が必ずしも元の状態に戻るわけではなく、修復することができなかった

り、修復過程でエラーを生じたりすることもある。修復過程でのエラーは癌の原因にもなりうる。また、このような修復機構で働いている遺伝子の突然変異は、ナイミーヘン症候群 (NBS) や毛細血管拡張性運動失調症類似疾患 (ATLD) といった、放射線高感受性や高発がん性を特徴とする遺伝病の原因となる。したがって、DSB の修復過程を解析する

ことは、放射線の生物影響や発がん過程を知るうえで非常に重要な課題である。

DSBの修復は、相同DNAとの間で鎖を交換することによってDSBを修復する相同組換え(HR)と、DSBの末端同士を相同な配列に頼らず結合させる非相同末端結合(NHEJ)の二つの主要な経路によって行われる。下等真核生物である酵母ではHRが主要な経路であるが、ヒトではNHEJが主要な経路である。酵母の研究からHRは次のように進行することがわかっている。野生型の酵母では、DSBを生じるとその末端が5'→3'方向に削られ、長い一本鎖DNA領域が作られる。この3'突出部位にはRad51タンパク質がフィラメント状に結合し、これが相同DNAに侵入することにより鎖の交換反応が行われる。酵母*mre11*欠失変異株ではこの3'突出の出現が遅く、酵母ではMre11タンパク質がDSB末端のプロセッシングに必要であることが示されている。Mre11はヌクレアーゼであるが、ヌクレアーゼ活性を失わせるような*mre11*の点突然変異を導入しても3'突出の出現は正常であるので、切断末端の消化にMRE11のヌクレアーゼ活性は不必要であると考えられ、Mre11がどのように3'突出の形成に関与しているのかは明らかでない。Mre11はHRとNHEJの両方に必要であるが、ヌクレアーゼ活性はHRにのみ必要であることが示されており、NHEJには長い3'突出領域が必要ないことが示唆されている。

ヒトにおいてはDSBを生じた後その末端がどのように処理されるかはわかっていない。ヒトではNHEJがDSBの主要な修復経路であるが、NHEJでは長い一本鎖DNA領域は必要ないと考えられているため、ヒト細胞においてDSB末端がどのように処理されるかは非常に興味深い。DSBは何らかのセンサーによって感知され、それによりDNA修復機構やDNA損傷チェックポイント機構が動き出すと考えられている。ヒトMRE11タンパク質はRAD50及びNBS1と共に複合体を形成するが、このタンパク質複合体(MRN複合体)は二重鎖DNAの末端に対して高い親和性を持ち、DNA末端同士を橋渡しする活性(tethering活性)を持ち、またDNA損傷チェックポイント機構の活性化において鍵となるATMタンパク質を活性化させる働きを持つことから、DSBのセンサータンパク質と呼ばれている。このようにMRN複合体はDSBに対する細胞の初期応答において様々な働きをもつと考えられるが、最も重要な反応との関連について明らかにされていない。すなわち、DSB末端のプロセッシングについてである。切断末端プロセッシングは上述したように酵母ではHRにおいて最初のステップとして必要であるため、DSBに対する初期応答において最も重要な生化学的反応の一つで

ある。ヒト細胞においても切断末端に一本鎖DNA領域ができるのかどうかも含め、DSB末端がどのような構造へと処理されるのかを調べることは極めて重要な課題である。

2. 研究の目的

ヒトにおけるDNA二重鎖切断の主要修復経路はNHEJであると考えられており、その場合DNA切断末端に一本鎖DNA領域が形成される必要性は無いと考えられる。本研究の目的の一つは、ヒト細胞におけるDNA二重鎖切断修復において、切断末端に一本鎖DNA領域がどの程度形成されているのかを調べることである。相同組換えにおいては、一本鎖DNA領域の形成は修復の初期過程であるので、この過程へのDNA二重鎖切断センサータンパク質複合体(MRN複合体)の関与について調査することも目的とする。また、一本鎖DNA領域の形成にはヌクレアーゼが関与していると推測され、その有力な候補としてMRN複合体の一員であるMRE11が挙げられるが、予想通りMRE11のヌクレアーゼとしての機能がDNA二重鎖切断の末端消化に必要なかどうかを確認する。予想が覆された場合は、DNA切断末端消化モデルの再考と新たな候補ヌクレアーゼの探索が必要となる。

3. 研究の方法

一本鎖DNA領域の検出のため、一本鎖DNA特異的結合タンパク質RPAに対する抗体を用い、放射線照射後におけるDNAへのRPA結合量の測定を行った。また、DNA二重鎖切断部位へのRPAの集結を観察するため、RPA抗体を用いた免疫染色法を行った。

同様に、一本鎖DNA結合タンパク質RAD51に対する抗体を用い、放射線照射後のDNA二重鎖切断への集積を調べた。RAD51は相同組換えタンパク質であり、相同組換えにおいてRPAの下流で働くので、相同組換えのステップがどこまで進んだかを判定する材料としても利用した。

チェックポイント機能の解析には、チェックポイントタンパク質SMC1の活性化にかかせない966番目のセリン残基のリン酸化に対する抗体を用い、放射線照射後にリン酸化がどの程度起こるかをウエスタンブロッティングにより調べた。

MRN複合体の関与を調べるため、上記の実験をNBS1欠損細胞、MRE11欠損細胞を用いて行った。コントロールとしては、それぞれの細胞に正常型NBS1または正常型MRE11を再発現させた細胞を作製しこれを用いた。

4. 研究成果

γ線照射後、RPA の核内での局在を調べた結果、DNA 二重鎖切断の指標であるγH2AX と共局在することがわかり、これは NBS1 タンパク質に依存しないことがわかった (図 1)。

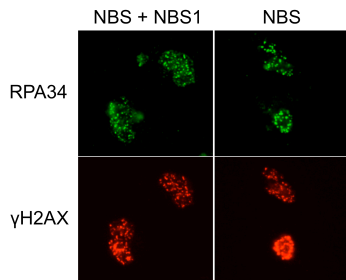


図 1

しかし、クロマチン画分における RPA の量をウエスタンブロッティングにより検討した結果、クロマチンへの RPA 結合は NBS1 に依存していることが明らかとなり (図 2)、DNA 二重鎖切断末端の消化に NBS1 が必要であることが示唆された。

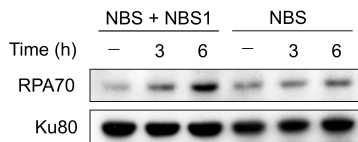


図 2

これは免疫染色法では明らかに出来なかった成果であり、今後の研究方法の選択においても注意しなければならない点である。RAD51 についても、γ線照射後の DNA 二重鎖切断へのリクルートに NBS1 は必要とされないが、クロマチンへの結合には NBS1 を必要とすることが示唆された (図 3、図 4)。

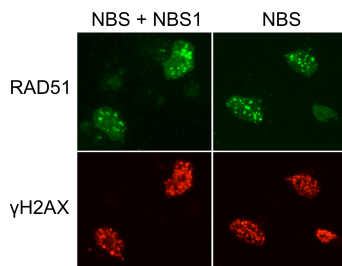


図 3

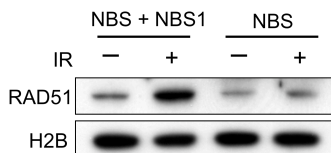


図 4

この結果からも DNA 二重鎖切断の末端消化に NBS1 が関与していることが強く示唆された。しかしながら、MRE11 欠損細胞では RPA や

RAD51 のクロマチン結合に異常は認められなかった。また、SMC1 のリン酸化も NBS1 欠損細胞では著しい低下が認められたが、MRE11 欠損細胞ではわずかな低下しか認められなかった。これらの結果から、ヒト細胞においても放射線照射により DNA の切断末端に一本鎖領域が形成されていること、それは DNA 二重鎖切断センサータンパク質複合体の一員である NBS1 には依存しているが同じ複合体に存在する MRE11 には依存していないこと、DNA 切断末端での一本鎖 DNA の形成はチェックポイントの活性化とも相関関係があること、が示された。一本鎖 DNA の形成に MRE11 が関与していないという結果は、他に重要なヌクレアーゼが存在していることを示唆しており、また NBS1 が関与しているという結果がそのヌクレアーゼの探索のための大きな手がかりとなるので、今後の迅速かつ円滑な進展が期待される。

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)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 加藤晃弘、初村裕英、松浦伸也、野田哲生、小松賢志
Nbs1 欠損マウス細胞の解析
第八回文部科学省特定領域研究「がん」5 領域 若手研究者ワークショップ (長野 2007 年 8 月 30 日)
- ② 加藤晃弘、柳原啓見、松浦伸也、野田哲生、小松賢志
Domain analysis of the Nbs1 gene in murine cells.
第 66 回日本癌学会学術総会 (横浜 2007 年 10 月 4 日)
- ③ 加藤晃弘、初村裕英、小松賢志
DNA 損傷チェックポイントにおける NBS1 の役割
日本放射線影響学会第 50 回大会 (千葉 2007 年 11 月 15 日)
- ④ 初村裕英、加藤晃弘、松浦伸也、小松賢志
NBS 患者細胞と Nbs1 欠損マウス細胞の解析
日本放射線影響学会第 50 回大会 (千葉 2007 年 11 月 15 日)
- ⑤ 宮口雄人、加藤晃弘、太田陽介、小林純也、小松賢志
MRN 複合体阻害による放射線増感作用の検討
日本放射線影響学会第 50 回大会 (千葉 2007 年 11 月 15 日)

- ⑥ 加藤晃弘、初村裕英、小松賢志
Role of the N-terminal region of NBS1
in ATR-mediated DNA damage
response
Maintenance of Genome Stability 2008
(メキシコ 2008 年 3 月 5 日)
- ⑦ 加藤晃弘、初村裕英、小松賢志
The role of the N-terminal
region of NBS1 in
ATR-mediated DNA damage
response
Ataxia-Telangiectasia
Workshop 2008 (大津 2008
年 4 月 25 日)
- ⑧ 加藤晃弘、初村裕英、小松賢志
NBS1 is required for ATRIP focus
formation.
第 67 回日本癌学会学術総会 (名古屋
2008 年 10 月 28 日)
- ⑨ 加藤晃弘、初村裕英、小松賢志
NBS1 is required for UV-induced DNA
damage response.
The 6th 3R Symposium (掛川 2008 年
10 月 29 日)
- ⑩ 加藤晃弘、初村裕英、小松賢志
NBS1 は ATRIP のフォーカス形成に
必要である
日本放射線影響学会第 51 回大会 (北
九州 2008 年 11 月 21 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 晃弘 (KATO AKIHIRO)
京都大学・放射線生物研究センター
研究員
研究者番号 : 70423051