

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K12325

研究課題名(和文)新規視覚化技術による非相同末端再結合タンパク質モニタリング系の開発とその応用

研究課題名(英文) Development and Application of a Monitoring System for Non-Homologous End Joining Proteins Using Novel Visualization Techniques.

研究代表者

柳原 晃弘 (Yanagihara, Akihiro)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・主任研究員

研究者番号：70423051

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)：放射線が作るDNA鎖切断の修復メカニズムの解明は、放射線の生物影響評価や医学利用の観点で重要な課題である。本研究では、修復タンパク質のリアルタイム観察における技術的課題解決のため、従来にない高コントラストを実現する新たな蛍光標識法を開発し、ヒトでの主要な修復経路で働くタンパク質が放射線照射後に細胞内でどのように振る舞うのかを、生きたまま観察することに初めて成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究でリアルタイム観察のための新技術が開発されたことで、DNA鎖切断の修復がヒト細胞内でどのように起きているのかについて、経時的・空間的な解析が可能となり、修復メカニズム解明に非常に有益なツールをもたらした。修復メカニズムの解明に貢献することで、将来的には放射線の影響評価、放射線治療の効率化、遺伝子治療の精密化等への貢献が期待される。また、この技術は、高いバックグラウンドノイズ等で従来観察が困難な様々な対象物を可視化できる潜在性を有しており、生命科学分野での生細胞内観察全般に新たな可能性を提供する。

研究成果の概要(英文)：Elucidating the repair mechanisms for DNA strand breaks caused by radiation is crucial in evaluating the biological effects of radiation and its medical applications. In this study, we developed a novel fluorescent labeling method that achieves unprecedented high contrast to address the technical challenges of real-time observation of repair proteins. For the first time, we successfully observed in living cells how proteins involved in the primary repair pathways in humans behave after radiation exposure.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA二重鎖切断 DNA修復 ライブセルイメージング

## 1. 研究開始当初の背景

電離放射線はその高いエネルギーで、生命の設計図であるゲノム DNA を切断する。DNA が切断されたままでは、細胞は増殖することができず死んでしまう。これが、組織障害をもたらす、最終的には個体にも死をもたらす。一方で、がん治療においてはこの作用によってがん細胞を殺し、がんを治すために活用されている。このように、DNA の切断は細胞死をもたらす重篤な損傷であるが、細胞はそれを修復(再結合)する機能を持っており、切断が少なければこの修復機能によって細胞死を免れることができる。

放射線の生物作用として、細胞死以外の大きな影響として放射線発がんがある。放射線発がんは、放射線によるゲノム変異が原因であると広く考えられている。放射線によってできた DNA 切断は、細胞が持つ修復機能によって再結合されるが、必ずしも元通りに戻るわけではなく、切断部位に挿入や欠失が生じたり、時には大規模なゲノム構造の変化を伴う場合もある。このような誤った修復がゲノム変異を生じさせ、そのうちのいくつかは発がんの過程に寄与すると考えられている。

このように、放射線による DNA 切断を正確に修復することは、生物の健全性の維持にとって極めて重要であり、修復が正確だったり間違ったりするメカニズムの解明は、放射線の生物影響を理解する上で、また放射線を有効に活用する上で重要な課題である。

DNA は二重らせん構造をとっているが、放射線はこの二本の鎖を切断してしまう。これを DNA 二重鎖切断 (DSB) と呼ぶ。DSB は DNA 切断活性を持つタンパク質によっても作られ、このようなタンパク質を使って人為的に DSB を作り、DSB の修復過程で誤った修復が起こることを利用して、様々な遺伝子変異細胞や遺伝子変異マウスが作られ、それらの遺伝子機能解析に利用されている。また、DSB の正確な修復経路を利用することで、思い通りの遺伝子変化を生じさせることが技術的に可能であり、これは遺伝子治療にも活用できる技術として注目されている。このような技術は遺伝子編集と呼ばれ、近年その利用や研究開発が盛んになってきており、基礎生命科学分野の他、農業、漁業、畜産業、医薬品産業等、様々な業界で注目されている。遺伝子編集技術は人々に大きな恩恵をもたらす夢の技術とされているが、まだ発展途上の技術であり、様々な問題や制約もある。遺伝子編集の基本は、細胞が持つ DSB の修復メカニズムの利用である。そのため、この技術の効率化や高精密化、安全化等には、DSB 修復メカニズムの深い理解が不可欠である。したがって、DSB 修復メカニズムの解明は、放射線の生物影響やその利用を越え、極めて幅広い産業や基礎科学の分野にとって重要な課題である。

ヒトでの DSB 修復に注目すると、主に二つの経路で修復されることがわかっている。一つは非相同末端再結合 (NHEJ) と呼ばれ、誤りがちな再結合をする経路として知られている。もう一つの経路は相同組換え経路 (HR) と呼ばれ、正確な修復を行う。ヒトではこれら二つのうち、特に NHEJ が主に利用される。この二種類の経路が、どのようにして使い分けられているのか、どのようにして選択されているのかについて研究が進んできているものの、完全には理解されていない。特に、修復タンパク質が細胞内でどのように振る舞っているのかをリアルタイムで観察する分野で大きな障害があった。細胞内でのタンパク質の動きを生きのまま観察するためには、通常、蛍光タンパク質との融合が利用される。実際、HR に関わるタンパク質は蛍光タンパク質による標識によって、DSB に集まる様子や再び解離する様子などが生きのまま観察可能であった。しかし、ヒトでの最も主要な経路である NHEJ のタンパク質は、蛍光タンパク質で標識しても、放射線照射後の細胞内での動きを観察することができなかった。これは、DSB に集まったタンパク質からのシグナルと、バックグラウンドとして核内に分散して存在するタンパク質からのシグナルに十分な差がないから、つまりシグナル/ノイズ比 (S/N 比) が低いからであると考えられた。NHEJ タンパク質も DSB に集まることは他の実験で示されていたが、集まってくる量 (分子数) が少ないため、そのシグナルがバックグラウンドノイズに埋もれてしまうのである。実際、レーザー照射によって局所的に多数の DSB を発生させると、NHEJ タンパク質の DSB への集積も観察することは可能であり、蛍光標識によるリアルタイムでの可視化に潜在的な可能性はあった。しかし、局所的に多数の DSB があると、単一の DSB についての修復過程を解析するのは困難であり、単発的な DSB を生じさせる放射線の DSB 修復過程を解析するためには、十分な S/N 比が稼げる新たな可視化技術を開発する必要があった。

## 2. 研究の目的

本研究では、NHEJ タンパク質が放射線誘発 DSB に集まってくる様子を生きのままリアルタイムで観察できるようにすることを目的とし、そのために、そのシグナルを検出するために十分な S/N 比を実現するような高コントラストの新たな蛍光標識法を開発することを目指した。また、NHEJ タンパク質の可視化だけにしか使えない特殊な方法ではなく、他のタンパク質の可視化にも利用できるような汎用性の高い方法でこれを達成することを目標とした。

### 3. 研究の方法

S/N 比を上げる方法として、蛍光標識をより明るくするという方法が考えられる。実際に、緑色蛍光タンパク質である GFP を標的タンパク質に複数連結させることで、S/N 比が向上するという研究結果が報告されている。本研究ではこの方法、つまり、GFP をいくつも連結させるという方法を基盤として、さらに改良を加えていくことでより S/N 比の高い新規蛍光標識法を確立した。

- (1) まず、新規蛍光標識法の有用性を検証するため、従来から利用されている単一の GFP での標識でも DSB への集積が観察できるタンパク質での検証を行った。DSB の初期応答タンパク質である NBS1 は、DSB への集積が容易に観察できるタンパク質の一つであるため、NBS1 での検証を行った。DSB への NBS1 の集積は複数の点として観察され、この点はフォーカスと呼ばれる。検証項目として、この方法が本来の NBS1 のフォーカス形成の性質に影響を与えないか、フォーカスの明るさ・コントラストが従来法と比べてどれくらい高いか、細胞毒性等の悪影響を与えないかなどを調べ、フォーカスの明るさ・コントラストが向上すること以外の悪影響が出ないことを検証した。
- (2) NHEJ タンパク質は、従来の単一 GFP 標識でもレーザー照射では DSB に集まるのが観察できるため、新規蛍光標識法でもこの性質が保持されているかを検証した。この検証によって、この方法が NHEJ タンパク質の DSB への集積能を邪魔しないかどうかを検証できる。レーザー照射で集積が観察できるものについては、DSB への集積能を保持しているものと判断し、次に放射線でのフォーカス形成の検証に進んだ。
- (3) 新規蛍光標識法で標識した NHEJ タンパク質が、放射線によってフォーカスを形成するかどうかを顕微鏡で観察した。レーザーでは集積が観察されるものの放射線ではフォーカスが見られないという場合は、まだ S/N 比が不十分であると判断し、さらなる改良によって S/N 比のより一層の向上を図った。
- (4) NHEJ タンパク質の放射線でのフォーカスが観察できるまで S/N 比を向上させた後、見えているフォーカスが DSB に集積したもののなかのどうかの検証を行った。まず、同一細胞を放射線の照射前後で観察し、放射線照射によってフォーカスが形成されることの検証を行った。次に、放射線量が増えるにつれて、生じる DSB も増えるため、それに従ってフォーカス数も増えるのかどうかを検証した。また、DSB の指標として広く利用されている  $\gamma$ H2AX を利用し、新規蛍光標識法で見たフォーカスが  $\gamma$ H2AX フォーカスと一致するのかどうかということ調べることで、このフォーカスが DSB に集まったものなのかどうかを検証した。また、生じたフォーカスは、生理的な条件下では修復とともに消失すると考えられるため、そのような本来の生理的な反応を反映しているかどうかを、フォーカスの経時観察によって検証した。
- (5) 新規蛍光標識法を NHEJ 以外のタンパク質にも応用し、汎用性が高い方法なのかどうかを検証した。HR で働くことが知られている RNF20 は、NHEJ タンパク質と同様、単一 GFP での標識では放射線によるフォーカスが観察できない。そこで、RNF20 を一例として、この新規蛍光標識法で放射線によるフォーカスが見えるようになるのどうかを検証した。

### 4. 研究成果

- (1) まず、NBS1 の放射線でのフォーカスについて、従来法と新規蛍光標識法とを比較すると、新規蛍光標識法の方が極めて明るく、高コントラストのフォーカスが観察できることが明らかとなった。また、このフォーカスは放射線照射に依存しており、非照射細胞では観察されなかった。さらに、NBS1 のフォーカス形成には NBS1 の N 末領域を必要とするが、N 末領域を欠いた NBS1 では、新規蛍光標識法でもフォーカスは一切観察されなくなった。また、この標識法による高い細胞毒性も特に見られなかった。これらの結果から、新規蛍光標識法が DSB 修復・損傷応答タンパク質のフォーカス形成の本来の性質を保持したまま、明るさ・コントラストの向上をもたらすことが示された。
- (2) 新規蛍光標識法で標識した NHEJ タンパク質は、レーザー照射によって DSB 部位に素早く集まることが、複数の NHEJ タンパク質で観察された。この結果は、この標識法が NHEJ タンパク質の DSB への集積能にも悪影響を与えないことを示しており、放射線によるフォーカス形成が観察できる可能性が示された。フォーカス観察に十分な S/N 比の達成を目指し、連結する GFP の数を徐々に増やしながらか観察を続けた結果、放射線でも Ku80、Ku70、

XRCC4、XLF、PAXX といった複数の NHEJ タンパク質のフォーカスを観察することが可能になった。これらのフォーカスは、放射線照射前には観察されず、照射によって初めて見えてくるのが、同一細胞の照射前後の観察によって明らかとなった。また、放射線量が高いほどフォーカス数も多く、これらのフォーカスが放射線によって生じた DSB に集積したものであることが示唆された。さらに、これらのフォーカスが  $\gamma$ H2AX フォーカスと綺麗に重なることがわかり、新規蛍光標識法によって初めて見えてきた NHEJ タンパク質のフォーカスは、DSB への集積を反映したものであるということが強く示唆された。経時的な観察をすると、放射線で生じた NHEJ タンパク質のフォーカスは、数時間後には消失していく様子が観察された。これは、DSB が修復（再結合）されたことによって、役割を終えた修復タンパク質が離散していったことが反映されたものと推測される。これらの結果から、新規蛍光標識法は NHEJ タンパク質が本来持つ生理的な性質に悪影響を与えないことが予想され、この方法を用いることで、DSB 修復がどのように進行していくのか、NHEJ と HR はどのように使い分けられているのかなど、DSB 修復の詳細なメカニズムについて、顕微鏡観察の面からさらに明らかにされると期待される。

- (3) 新規蛍光標識法を RNF20 に応用することで、単一 GFP 標識では観察できなかった放射線での RNF20 フォーカスの形成が観察できるようになった。これは、新規蛍光標識法の持つ高いコントラストのおかげであり、この方法の汎用性を示している。生細胞イメージングにおいて、S/N 比が不十分であるために目的のシグナルが検出できない場面は多くあり、そのような様々な課題解決にこの方法が貢献できる可能性がある。本研究が対象とした DSB 修復分野を超えて、この技術が広く生命科学分野の発展に貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------