

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K20449

研究課題名（和文）放射線等で生じる、異常な付加体が付くゲノム切断端から付加体を除去する機序の解明

研究課題名（英文）Understanding mechanisms in removal of aberrant adducts from ends of genomic DNA breaks caused by radiation and other factors

研究代表者

山田 真太郎（Yamada, Shintaro）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20837869

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：放射線などの環境要因や内的要因から自然発生するゲノム切断の多くは切断端が化学修飾された「汚い」切断であり、発がん性の強いDNA損傷である。しかし、その修復機構の多くが不明である。本研究では、DNAトポイソメラーゼII（Top2）による「汚い」ゲノム切断をモデルとして、修復機構を解析した。ヒト乳がん細胞MCF-7や、TK6 B細胞を用いて解析した結果、Top2が切断端に結合した「汚い」ゲノム切断の修復に、様々なDNA修復因子が複合的に関わることが明らかになった。この成果は放射線などにより自然発生する「汚い」ゲノム切断を修復する経路の異常により、ゲノムに変異が蓄積する機序を理解する一助となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線などの環境要因や内的要因から自然発生するゲノム切断の多くは切断端が化学修飾された「汚い」切断であり、発がん性の強いDNA損傷である。この「汚い」ゲノム切断の修復はまず切断端を「きれい」（3'末端に水酸基、5'末端にリン酸基が付いた状態）にする必要があるが、分子機構の多くが不明である。本研究では、内的要因から発生する「汚い」切断をモデルとして解析し、「汚い」ゲノム切断を「きれい」にする過程に、様々なDNA修復酵素が複合的に関わっていることを明らかにした。この成果は、放射線などにより自然発生する「汚い」ゲノム切断を修復する経路の異常により、ゲノムに変異が蓄積する機序を理解する一助となる。

研究成果の概要（英文）：Many genomic breaks that occur spontaneously from environmental or internal factors such as radiation are "dirty" breaks in which the cut ends are chemically modified, and are highly carcinogenic DNA damage. However, many of the molecular mechanisms of repair are unknown. In this study, we analyzed the repair mechanism of "dirty" genomic breaks by DNA topoisomerase II (Top2) as a model. Using human breast cancer cells (MCF-7) and TK6 B cells, it was found that multiple DNA repair factors including the ATM kinase are involved in the repair of "dirty" genome breaks in which Top2 is covalently bound to the ends. These results provide a basis for understanding the mechanism by which mutations accumulate in the genome due to abnormalities in the pathway that repairs "dirty" genomic breaks that occur naturally due to radiation and other factors.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA二重鎖切断修復 II型DNAトポイソメラーゼ

1. 研究開始当初の背景

放射線で作られたゲノム切断の修復は、制限酵素で作られたゲノム切断の修復より遅い。その理由は、放射線は切断端が化学修飾された「汚い」切断を作る(図1, ③)のに対し、非相同末端結合は「きれいな」ゲノム切断しか再結合できないからである(図1, ①→⑤、④→⑤)。これまで、遺伝子座特異的に特定の化学修飾をゲノム切断の末端に付ける実験手法は無かった。そのため「汚い」ゲノム切断を「きれいな」にする分子機構(図1, ②→④と③→④)は不明のままである。環境要因(例、放射線)のみならず内的要因から自然発生するゲノム切断もそのほとんどが「汚い」切断である。本研究の目的は、G0/G1 期に発生する「汚い」ゲノム切断を「きれいな」にする分子機構を解明することにある。ゲノム切断の修復経路は、酵母からヒトに到るまで例外なしに、制限酵素による「きれいな」切断をモデル実験系(図1, ①→⑤)にして解析されてきた。切断端に作られる異常な化学修飾を除去する機序は、除去を測定するバイオアッセイが無かった。そのためこれまで解析がなされていない。

2. 研究の目的

TOP2β による DNA のもつれの解消は細胞の活動に必須であり、細胞当たり 1 日 10 万回以上も行われる(図2)。この反応は TOP2β による DNA の切断、再結合を伴うが、DNA の再結合が失敗すると、TOP2β が DNA 切断末端に共有結合したままの「汚い」切断末端(病的 TOP2β-DNA 複合体)が形成される(図3)。TOP2β は生理状態でもしばしば触媒反応に失敗することで多くの「汚い」ゲノム DNA 切断が自然発生していることが研究室で見つかった(Mol Cell 2016, PMID: 27814490)。本研究では、病的 TOP2β-DNA 複合体を「汚い」切断末端のモデルとして解析し、「汚い」ゲノム切断を「きれいな」にする機構を解析した。本研究の問いは、致死性・難治性の DNA 損傷である「汚い」切断末端(放射線による DNA 切断末端や病的 TOP2β-DNA 複合体)は、どのように正確かつ効率的に G1 期において修復されているのか、である。

3. 研究の方法

ヒト B 細胞 (TK6) と、ヒト乳がん細胞 MCF-7 を用いて解析を行った。TK6 は、核型が安定であり、DNA 切断による影響(染色体断裂など)の評価に適している。本研究では、G1 期における修復を解析したが、MCF-7 は血清飢餓による G0/G1 期へ同調が容易である。DNA 切断とその修復は、細胞の免疫染色により一細胞レベルで解析した。この際に増殖期のマーカーである cyclin A で染まらない細胞を解析することで、G0/G1 期の細胞のみを評価した。病的 TOP2β-DNA 複合体 (TOP2β が DNA 切断末端に共有結合したままの「汚い」切断末端)

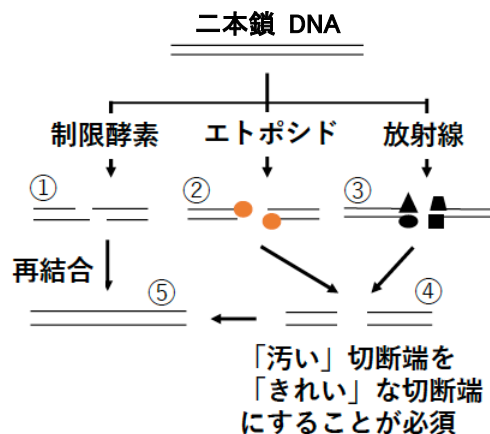


図1 「汚い」ゲノム切断の修復

放射線は切断端に様々な化学修飾が付いたゲノム切断、「汚い」切断を作る(①)。抗がん剤エトポシドも切断端に TOP2 がついた「汚い」切断を作る(②)。この切断が非相同末端結合によって再結合される(④→⑤)ためには全部の化学修飾が除去され、5'端にリン酸基、3'端に水酸基が付いた切断端が形成される必要がある(④)。「汚い」切断を「きれいな」切断にする(②→④あるいは③→④)の分子機構は全く不明である。

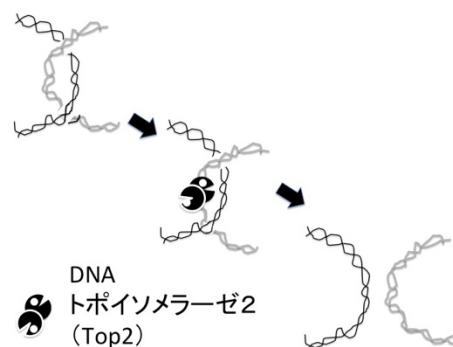


図2 トポイソメラーゼ2は、DNA のもつれを解消する際に DNA の二重鎖を切断、再結合する。この際に DNA の再結合反応が失敗すると TOP2β が断端に共有結合したままの DNA 二本鎖切断(病的 TOP2β-DNA 複合体)が生じる。これは染色体転座などの原因となる重篤な DNA 障害である。

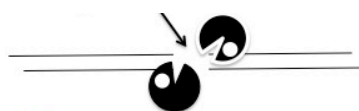


図3 病的 TOP2β-DNA 複合体

の検出には、超遠心法を用いた (*Mol Cell* 2016, PMID: 27814490)。この方法では、細胞を溶解後に、超遠心によって、DNA が共有結合している Top2 と、共有結合していない Top2 を分離する。超遠心による分画後、抗 Top2 抗体を用いたスロットブロッキング方法により、病的 TOP2 β -DNA 複合体を検出した。

4. 研究成果

まず TK6 B 細胞をエトポシドで処理して、ゲノム切断を誘導し、その修復時間を調べた。エトポシドは、Top2 触媒反応の阻害剤である。Top2 が DNA のもつれを解消する際に DNA の二重鎖を切断した後、エトポシドが DNA の再結合反応を阻害する。DNA の再結合反応が失敗すると、TOP2 β が断端に共有結合したままの DNA 二本鎖切断(病的 TOP2 β -DNA 複合体)が生じる。

DNA 二重鎖切断には相同組換え修復と非相同末端結合の2つの主な修復経路がある。本研究では、病的 TOP2 β -DNA 複合体の修復における、相同組換え修復因子の役割を解析した。BRCA1 や MRE11 は、G2/S 期において相同組換え修復で働く (図 4)。一方、両者は、G1 期において病的 TOP2 β -DNA 複合体から TOP2 β を除去し、非相同末端結合による修復を促進する主要な因子であることが研究室で明らかになった (*Mol Cell* 2016, PMID: 27814490; *PNAS* 2018, PMID: 30352856)。この修復反応は相同組換えと独立した機構である。本研究では、DNA 修復の変異体を多数用いた。本来なら変異株の作成が研究の律速となる。しかし、所属研究室では、実験に必要なヒト細胞 (TK6 や MCF-7) の変異体や、発現ベクターを保有していた。細胞培養の環境も整っており、すぐに実験を始められた。

相同組換え修復の各種変異体や、相同組換え修復因子の阻害剤を用いて、エトポシド処理で TOP2 β 依存的に誘導されるゲノム切断の修復時間を調べた。DNA 切断マーカーである γ H2AX や 53bp1 の免疫染色でみられた点状のシグナルの数を集計することにより、ATM を含む複数の遺伝子の阻害により、ゲノム切断の修復が著しく遅れることが明らかになった。またこの γ H2AX や 53bp1 の点状のシグナルの蓄積は、TOP2 β の変異と組み合わせることでほとんどみられなくなった。このことから、 γ H2AX や 53bp1 の点状のシグナルの蓄積は、TOP2 β に依存していることも確認した。ヒト乳がん細胞 MCF-7 も同様に解析して普遍性を検証した。MCF-7 を血清飢餓条件で 24 時間培養し、G1/G0 に細胞を同調させた後、エトポシド処理をして、ゲノム切断の修復を調べた。その結果、TK6 細胞で行った実験と同様に、MCF-7 でも、 γ H2AX や 53bp1 の点状のシグナルの蓄積がみられた。このことから、TK6 で見られた相同組換え修復因子の変異の影響は、細胞株特異的でないことが確かめられた。

MCF-7 は女性ホルモンの刺激で TOP2 β 依存的に DNA 損傷が起きることが知られている。近年、DNA 修復遺伝子である DNA-PKcs に変異を持つ Scid マウスの乳腺細胞でも、女性ホルモンの刺激により、DNA 損傷が頻発することが分かった (*PNAS* 2018, PMID: 30352856)。そこで、各種 DNA 修復変異体を用いて、女性ホルモンの刺激による DNA 切断の修復時間を調べた。その結果、エトポシド処理の結果と同様に、DNA-PKcs 変異体や、ATM 遺伝子の変異体などで、DNA 修復が著しく遅れることが明らかになった。

上記で調べた DNA 修復の変異が、DNA 修復のどのステップに重要であるかを調べるため、超遠心法により、病的 TOP2 β -DNA 複合体を検出した。その結果、いくつかの変異により、エトポシド依存的に、病的 TOP2 β -DNA 複合体がさらに蓄積することが明らかになった。この結果は、解析した DNA 修復遺伝子が、病的 TOP2 β -DNA 複合体 (TOP2 β が DNA 切断末端に共有結合したままの「汚い」切断末端) を「きれい」にする過程に関わることを示唆する。

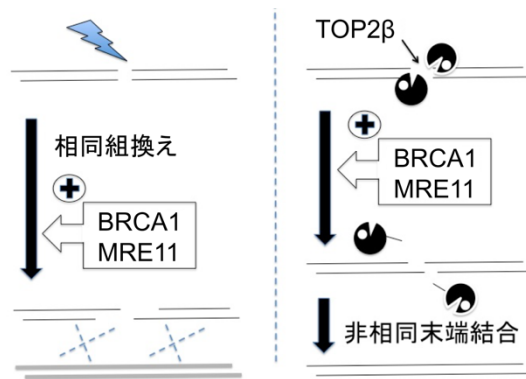


図 4 BRCA1 や MRE11 は、G2/S 期で相同組換えを促進することが知られていた (左) 一方、G0/G1 期に TOP2 β が DNA の再結合に失敗して DNA 二重鎖切断 (病的 TOP2 β -DNA 複合体) が生じた場合、切断末端から TOP2 β を除去することで非相同末端結合による修復を促進する (右)。これは、TOP2 β を除去する主要な経路であり、所属研究室で見つかった新しい修復機構である。本研究では、DNA 切断末端からの TOP2 β の除去に関わる相同組換え修復因子をさらに探索した。

以上により、Top2 が末端に共有結合した「汚い」ゲノム切断から Top2 を除去して切断端を「きれい」にする過程に、ATM キナーゼなどの DNA 修復因子が複合的に関わることが明らかになった。これらの成果は、「汚い」切断を「きれい」な切断にする修復機構の解明につながる。そして、放射線などにより自然発生する「汚い」ゲノム切断を修復する経路が、機能低下する結果、変異が蓄積する機序を理解する基盤を提供する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sasanuma Hiroyuki, Yamada Shintaro, Tsuda Masataka, Takeda Shunichi	4. 巻 93
2. 論文標題 Restoration of ligatable “clean” double-strand break ends is the rate-limiting step in the rejoining of ionizing-radiation-induced DNA breakage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102913 ~ 102913
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2020.102913	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
---------	---------