

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：32206

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12162

研究課題名（和文）細胞質内ストレス応答におけるMRE11とATMの機能的相互作用の解明

研究課題名（英文）Functional Interaction between MRE11 and ATM in cytoplasmic stress responses

研究代表者

小林 純也（Kobayashi, Junya）

国際医療福祉大学・成田保健医療学部・教授

研究者番号：30301302

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）：放射線高感受性遺伝病A-TとATLDの原因遺伝子ATM、MRE11の細胞質内ストレス応答経路に役割・機能的相互作用をヒト正常線維芽細胞、血管内皮細胞、を用いて明らかにすることを目的とし研究を行った。その結果、血管内皮細胞では低線量率放射線照射依存的に微小核を形成し、その機構に關与するタンパク質群をDIAプロテオミクス解析で明らかとした。また、同様なDIA解析で32個の顕著に発現増加するのタンパク質を同定し、その中でSOS2、DR-6、MEKK4はミトコンドリア性ストレスに依存して継続的に増加することを明らかにし、低線量率照射時の生体影響マーカーに適用しうる可能性を提示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、微小核形成は炎症関連因子の分泌機構を活性化し、周辺細胞へ炎症反応を拡大させる可能性が示唆されているが、血管内皮細胞において低線量率放射線照射特異的に微小核形成が誘導されること、またその機構に關与する因子群を明らかにしたことは、今後低線量率放射線被ばく時の血管・循環器系での影響拡大の可能性を検討する上で重要な鍵になると考えられる。また、血管内皮細胞は循環器疾患研究のモデルとなっているが、プロテオミクス解析から低線量率放射線特異的に増加する因子群は低線量率放射線による循環器系疾患の可能性を評価する有力なマーカーとして、将来的に利用できる可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this research is to identify the role of ATM and MRE11 in intracellular stress-response of human vascular endothelial cells. We showed that micro-nuclei were induced in vascular endothelial cells after low-dose rate irradiation. Our DIA proteomics analysis suggests the important proteins for micronuclei formation. We also identify 32 kinds of protein, which increased remarkably after irradiation. Among of them, SOS2, DR-6, MEKK4 increased continuously in response to oxidative stress, suggesting that they might be useful for biological effect markers.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ストレス応答 酸化ストレス 脳神経変性 ATM MRE11

1. 研究開始当初の背景

電離放射線に細胞が被ばくすると、細胞核内のゲノム DNA に二本鎖切断 (DSB) 損傷が生じるが、DSB 損傷の残存は細胞死・発がんにいたることから、損傷 DNA は直ちに検知され、様々な細胞内応答経路を経て、損傷 DNA が修復される。この一連の機構解明には放射線高感受性・ゲノム不安定性を呈する遺伝病である、ATM が欠損した毛細血管拡張性運動失調症 (AT)、NBS1 欠損のナイミーヘン症候群 (NBS) 及び MRE11 欠損した ATLD (AT-like disorder) 症の患者およびその原因遺伝子が重要研究対象とされ、ATM キナーゼが細胞周期チェックポイント制御因子であり、NBS1, MRE11 は RAD50 と複合体形成し、DSB 損傷の主要修復経路、相同組換え修復 (HR) の初期制御に機能することが明らかとなっていた。

しかし、AT, ATLD 患者は、NBS 患者と異なり、重篤な脳神経変性症状である小脳性運動失調症 (進行性小脳萎縮) を示すことから、その原因遺伝子産物 ATM, MRE11 は放射線誘発 DSB 損傷応答とは別に、環境ストレスに対抗するための重要機能を持っていることが示唆されてきた。近年の研究から、ATM キナーゼが活性酸素種 (ROS) によって細胞質で活性化されミトコンドリアやペルオキシソームなど ROS 蓄積細胞器で機能することや、ATM 機能欠損マウス由来神経細胞が酸化ストレスに高感受性を示すことが報告され (Chen J, *Neurosci*, 2003; Guo Z, *Science*, 2010; Yasmine et al, *Blood* 2012) ATM は細胞質、特にミトコンドリア等の ROS 産生細胞器で抗酸化的に機能し、その欠損が AT 患者での小脳性運動失調の原因と示唆された。AT 症同様に進行性小脳失調を示す AOA3 症の患者細胞で細胞内 ROS の増加、ミトコンドリア機能異常が見られ、ATM キナーゼの機能不全が見られたが、原因遺伝子はミトコンドリア制御因子、チトクローム b と判明し、ミトコンドリア機能不全が ROS 蓄積・ATM 機能障害を経て進行性小脳失調にいたる可能が示唆された。一方で、MRE11 は NBS1 と独立して二本鎖 DNA (dsDNA) の細胞質侵入時のセンサーとして細胞質内機能を持つが、酸化ストレス応答に対する関与は明らかでなく、MRE11 欠損がなぜ、進行性小脳失調につながるかは未解明のままとなってきた。

2. 研究の目的

放射線高感受性遺伝病の一つ ATLD 症の原因遺伝子 MRE11 は、その遺伝子産物が放射線誘発 DNA 損傷の修復に機能することが明らかとなっているが、AT-LD 症で発症する進行性小脳失調症の発症に関係する MRE11 タンパクの機能は明らかになってない。そのため、その発症メカニズムに迫るために、同様な脳神経変性症を呈する ATM 遺伝子欠損の放射線高感受性遺伝病 AT 症でその関連が示唆される ATM キナーゼが機能する酸化ストレス応答機能と MRE11 がセンサー機能をもつ細胞質性 dsDNA 応答、これら細胞質内ストレス応答経路における ATM と MRE11 の機能的相互作用をヒト正常線維芽細胞、血管内皮細胞を用いて検討し、さらに細胞質内ストレス応答に MRE11 及び ATM と相互作用しうる因子をプロテオミクス解析で同定し、新規因子の役割を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト正常細胞における酸化ストレス依存的な微小核形成誘導の検討

ヒト線維芽細胞、血管内皮細胞に対して、総線量 3Gy で高線量率 (0.9 Gy/分) 及び低線量率 (1 mGy/分) で線照射終了後に固定、抗 H2AX 抗体で免疫蛍光染色し、核 DNA は DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 染色し、蛍光顕微鏡で微小核形成の有無を観察した。線維芽細胞に対しては ATM 阻害剤 (KU55933 10 µM) の添加の影響も検討した。

(2) 低線量率放射線照射特異的に発現変動するタンパク質の DIA プロテオミクス解析

血管内皮細胞に対して、総線量 3Gy で高線量率 (0.9 Gy/分) 及び低線量率 (1 mGy/分) 照射 15 分後に、非照射サンプルと共に細胞を回収して急速凍結した。凍結サンプルはかずさ DNA 研究所に依頼し、DIA プロテオミクス解析を行って取得されたデータに基づき、発現量が非照射と比較して、有意に増加減少する因子を抽出した。

(3) DIA プロテオミクス解析同定因子の酸化ストレス応答の検討

血管内皮細胞について Pyocyanin 処理 (50 µM) を行った後に細胞を回収し、ウェスタンブロット法で、DIA (Data independent acquisition / SWATH 法を用いたプロテオミクス解析で優位に発現変化することで同定された因子・タンパク質の発現の増減について検討した。なお、従来の DDA (data-dependent acquisition) 法では MASS スペクトルが取得され、強度の高いピークから順に MS/MS 解析・同定するため、発現量の低いタンパク質は解析データから欠落する可能性が大きく、発現定量解析もできないが、今回用いた DIA プロテオミクス解析は精度の高い定量的解析を網羅的に実施することができる。

(4) MRE11 結合因子の機能解析

MRE11 と物理的相互作用をする因子として同定した FXR1 を対象に、MRE11 の重要機能の一つである R-loop 解消への役割への関与について、蛍光ヌクレオチドを細胞に取り込ませた後に、転写抑制を誘導して、標識された DNA 鎖の変化を蛍光顕微鏡で観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト正常細胞における酸化ストレス依存的な微小核形成誘導の検討

血管内皮細胞で検討した場合、非照射の通常増殖状態でも微小核の形成 10%程度の細胞で確認されたが、低線量率放射線照射では、高線量率放射線照射と異なり、非照射時と比較して2倍程度の微小核形成の増加が見られ(図1) pyocyanin (ミトコンドリア性 ROS 誘導剤) 処理による ROS 誘導時にも同程度の増加が見られた。さらにこれら増加した微小核の多くは免疫蛍光染色で検討すると、DSB マーカーである H2AX に陽性であったことから、低線量率放射線照射には主にミトコンドリア性 ROS 蓄積を介して微小核が形成され、それら微小核には DSB 損傷が含まれることが示唆された。一方、ヒト繊維芽細胞でも同様に検討したところ、非照射時とともに低線量率放射線照射、高線量率放射線照射時でも、微小核形成は誘導されなかった。しかし、放射線照射と共に ATM キナーゼ阻害剤 (KU5933) 添加時を行って検討すると、非照射時で約 5%、高線量率照射時で約 12%に対して、低線量率放射線照射では約 44%と顕著な微小核形成が観察された。このことは、繊維芽細胞では、ATM が微小核形成を抑制する重要因子であること、一方血管内皮細胞では微小核形成制御における ATM の機能が限定的である可能性が示唆された。

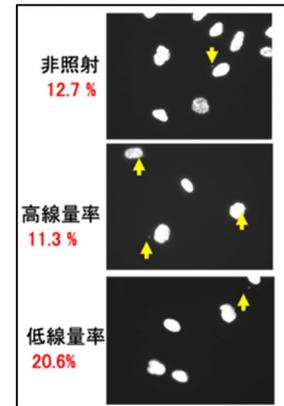


図1 血管内皮細胞における H2AX 陽性微小核の誘導

(2) 低線量率放射線照射特異的に発現変動するタンパク質の DIA プロテオミクス解析

DIA プロテオームで網羅的発現解析を行ったところ、6500 種類以上のタンパク質が同定でき、低線量率放射線照射では非照射と比べて 131 個の遺伝子産物が 2 倍以上増加し、145 個が 1/2 以下に低下していた。その中では炎症応答、酸化ストレス応答関連因子の顕著な増加とともに、種々の増殖因子シグナル関連因子の増加も見られた(表1)。これらの因子の中で高線量率放射線照射時では変動しない因子を抽出すると、32 種類のタンパク質が低線量率照射で 2 倍以上に増加するが、高線量被ばくでは発現変化がなかった。また、85 種類のタンパク質は低線量率放射線照射でのみ 1/2 以下に減少していた。

低線量率照射で2倍以上に増加する遺伝子(131個)

増殖因子シグナリング	20
炎症応答関連	10
酸化ストレス応答	8
p53関連	7
インテグリンシグナリング	5

低線量率照射で1/2以下に減少する遺伝子(145個)

DNA複製関連	15
ヒストン/クロマチン/M期制御	13
Ub/SUMO関連	7
DNA修復関連	6

表1 DIA プロテオミクス解析で発現変動があったタンパク質(遺伝子)の特徴

これら低線量率放射線照射特異的に発現変動する因子を対象に、機能的相互作用について String 解析を行ったところ、低線量率照射特異的に発現増加する因子についてクラスター形成は認められなかった。一方、低線量率照射特異的に減少する因子について明確なクラスターが形成され(図2)。その中に微小核形成の抑制に機能する因子 (UHRF1, TOPBP1, TIMELESS, SMC2, SMC3, SMC4, SMC5, SMC6, SMC7, AURKB, KIFC1/KIF4A, KIF20A, KIF14, KIF15, KIAA0101, IQGAP3, DNMT1, DLGAP5, CIT, CHAF1B, CEP55, AURKB) が含まれており、低線量放射線照射はこれら因子群の発現減少が微小核形成を誘導しているという機構が明らかとできた。

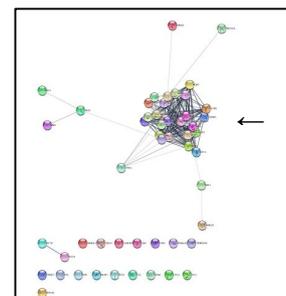


図2 低線量率照射特異的に減少した85個のString解析

(3) DIA プロテオミクス解析同定因子の酸化ストレス応答の検討

DIA プロテオミクス解析で低線量率放射線照射特異的に発現増大する因子について、血管内皮細胞でウェスタンブロット解析で検討すると、低線量率照射では主な刺激因子は ROS 特異的蓄積酸化ストレス活性化であることからミトコンドリア性 ROS 誘導剤 pyocyanin 処理を行って検討した結果、発現増加で同定された因子のうち、SOS2, DR-6, MEKK4 は pyocyanin 処理に伴い継続的に増加することが観察された。一方、発現減少された因子でも検討すると、SMC4, DNMT1 の減少が観察されたが、DNA 二本鎖切断損傷誘導剤 (etposide) 処理では観察されなかった。これら結果から、DIA プロテオミクス解析で同定された因子の多くは、低線量放射線照射時のミトコンドリア性 ROS の誘導に起因して、発現変化していることが示唆された。SOS2, DR-6, MEKK4 のようにミトコンドリア性 ROS で発現増加が確認された因子については、低線量率放射線細胞影響を評価するマーカー、さらに放射線被ばく時の循環器系疾患リスクを推定するマーカーとなりうる可能性もある。

(4) MRE11 結合因子の機能解析

FXR1 ノックダウン細胞および MRE11 ノックダウン細胞でウェスタンブロット解析で検討するとともに酸化ストレス応答が低下しており、両因子の酸化ストレス応答への役割が示唆された。一方、これらノックダウン条件で転写ストレス誘導剤処理後の R-loop の変化を検討すると、MRE11 ノックダウン細胞では R-loop が解消されず、FXR1 ノックダウン細胞では正常に解消されていた。この結果は R-loop 解消を通してのゲノム安定性の維持において、MRE11 が FXR1 と独立して機能することが示唆された。また、R-loop の解消における TUG-1 の役割、発がんとの関係性についても明らかにした。さらに、MRE11 と常に複合体を形成し、DNA 二本鎖切断損傷発生時に相同組み換え修復を通してゲノム安定性に機能する RAD50 は、その遺伝子欠損が ATM 依存性チェックポイントの活性化不全、免疫不全につながることも明らかにした。このように MRE11 はゲノム安定性のキータンパク質であることが考えられ、細胞質ストレス応答における役割の重要性も示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Meng Q, Hayashi I, Anno K, Kobayashi J.	4. 巻 9
2. 論文標題 Relationship between micronucleus formation and oxidative stress in human vascular endothelial cells under low dose rate irradiation.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicology Sciences	6. 最初と最後の頁 47-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2131/fts.9.47	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shimada M, Tokumiya T, Miyake T, Tsukada K, Kanzaki N, Yanagihara H, Kobayashi J, Matsumoto Y.	4. 巻 64
2. 論文標題 Implication of E3 ligase RAD18 in UV-induced mutagenesis in human induced pluripotent stem cells and neuronal progenitor cells.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Radiat Res.	6. 最初と最後の頁 343-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jrr/rrac099	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 -
1. 著者名 Morishima N, Ogata H, Magae J, Ito Y, Kobayashi J.	4. 巻 28
2. 論文標題 Analysis method of cellular stress caused by intermediate dose-rate irradiation using a cell lysate array technique.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 288-306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.13011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Meng Q, Zaharieva EK, Sasatani M, Kobayashi J.	4. 巻 26
2. 論文標題 Possible relationship between mitochondrial changes and oxidative stress under low dose-rate irradiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Redox Report	6. 最初と最後の頁 160-169
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/13510002.2021.1971363	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 -

1. 著者名 Sayed AEDH, Nagata K, Nakazawa T, Mitani H, Kobayashi J, Oda S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Low Dose-Rate Irradiation of Gamma-Rays-Induced Cytotoxic and Genotoxic Alterations in Peripheral Erythrocytes of p53-Deficient Medaka (<i>Oryzias latipes</i>).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Marice Science	6. 最初と最後の頁 773481
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmars.2021.773481	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 -

1. 著者名 Nakamura Y, Katoh S, Kobayashi J, Umeda T, Kobayashi S, Numazawa S.	4. 巻 8
2. 論文標題 Low-dose ionizing radiation suppresses the apoptosis-induced by serum-removal culture.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fundamental Toxicological Sciences	6. 最初と最後の頁 249-269
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2131/fts.8.249	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 -

1. 著者名 小林純也	4. 巻 61
2. 論文標題 低線量放射線の生体影響の解明	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 歯科放射線学	6. 最初と最後の頁 1-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11242/dentalradiology.61.1	査読の有無 無
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 -

1. 著者名 Saito Y, Kobayashi J, Kanemaki MT, Komatsu K.	4. 巻 133
2. 論文標題 RIF1 controls replication initiation and homologous recombination repair in a radiation dose-dependent manner	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Cell Science	6. 最初と最後の頁 jcs240036
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1242/jcs.240036.	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 -

1. 著者名 Tsuchiya H, Shimada M, Tsukada K, Meng Q, Kobayashi J, Matsumoto Y	4. 巻 62
2. 論文標題 Diminished or inversed dose-rate effect on clonogenic ability in Ku-deficient rodent cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Radiation Research	6. 最初と最後の頁 198-205
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jrr/rraa128.	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Meng Q, Kobayashi J.
2. 発表標題 Relationship between micronucleus formation and oxidative stress in human vascular endothelial cells under low dose-rate irradiation.
3. 学会等名 日本放射線影響学会第64回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林純也
2. 発表標題 低線量放射線の生体影響の解明
3. 学会等名 日本歯科放射線学会第1回秋季学術大会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 小林純也
2. 発表標題 低線量放射線影響研究と放射線生物学教育
3. 学会等名 放射線生物学東京談話会 (東京RBC) (招待講演)
4. 発表年 2021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
---------	---------