

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 25 年 5 月 30 日現在

機関番号：12608
 研究種目：若手研究（A）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21689033
 研究課題名（和文） DNA 修復系のライフサイクルとホメオスタシスに基づく放射線感受性予測・制御戦略
 研究課題名（英文） Strategy for the prediction and control of radiosensitivity based on the life-cycle and homeostasis of the DNA repair system
 研究代表者 松本 義久 (Matsumoto Yoshihisa)
 東京工業大学・原子炉工学研究所・准教授
 研究者番号：20302672

研究成果の概要（和文）：

本研究は、DNA 二重鎖切断修復の非相同末端結合修復経路で中心的な役割を演ずるタンパク質の分子が作られてから分解されるまでの一生（ライフサイクル）および変性などによる機能不全状態から回復あるいは防御する機構（ホメオスタシス）の解析を通じて、得られた知見を放射線感受性予測と制御の新しい技術開発に繋げることを目的として行った。

主な成果として、(1) DNA ligase IV においてクロマチン結合に必要とされる領域、安定性に関わる新たな領域がそれぞれ明らかになった。(2) XRCC4 のクロマチン結合に関与する分子とその結合領域が明らかになった。(3) XRCC4 において、リン酸化部位以外で放射線感受性が上昇する変異体が数種類見つかри、リン酸化以外の翻訳後修飾あるいはタンパク質間相互作用の役割が示唆された。これらの結果から、タンパク質間相互作用、あるいはタンパク質—クロマチン間相互作用を標的とした新たな放射線感受性制御法の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

This study aimed to find a new approach to the prediction and control of radiosensitivity through the analyses of the life cycle – how proteins are generated and degraded - and homeostasis – how proteins are protected and recovered from dysfunctional status, such as denaturation - of proteins involved in DNA double-strand break repair through non-homologous end joining.

We obtained the following major outcomes. First, we found regions in DNA ligase IV for chromatin binding and stabilization. Second, we found a protein required for the chromatin binding of XRCC4 and also clarified binding region in XRCC4. Third, we created a series of mutants of XRCC4 and XLF. In XRCC4, we found several mutants, other than potential phosphorylation site mutants, with elevated radiosensitivity, suggesting possible involvement of posttranslational modifications other than phosphorylation or protein-protein interaction. These results might show a new strategy for radiosensitization by targeting the protein-protein or protein-chromatin interactions.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2010 年度	4,000,000	1,200,000	5,200,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			0
年度			0
総計	18,600,000	5,580,000	24,180,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・放射線科学

キーワード：放射線治療生物学

1. 研究開始当初の背景

本研究代表者は、大学院修士課程入学時に自ら提案して開始して以来、一貫して、DNA依存性プロテインキナーゼ (DNA-PK) の性質と機能に関する研究を行ってきた。DNA-PK は DNA-PKcs、Ku86 (Ku80) および Ku70 から構成され、二本鎖 DNA 末端に結合して活性化するというユニークな性質を有するタンパク質リン酸化酵素であり、DNA 二重鎖切断 (DSB) の「センサー」として、その修復や情報伝達に重要な役割を担う分子であると考えられる。申請者は、この DNA-PK の性質、機能を糸口として、DNA 損傷に対する生体応答と修復のメカニズムの全容を解明すること、また、その成果をがん治療に生かすことを目指している。

DNA-PK は試験管内では数十のタンパク質をリン酸化することが知られている。しかしながら、生体内で実際にどの分子をリン酸化しているか、つまり、「真の基質」が何か、は明らかになっておらず、DNA 修復分野における最大のミッシング・リンクの1つとなっている。本研究代表者は 2000 年に、DNA ligase IV とともに DSB を最終的に結合すると考えられている XRCC4 が、生細胞内で放射線照射後に DNA-PK 依存的なリン酸化を受けることを示した。以来、リン酸化基質の同定とリン酸化の生理的意義の解明を中心的に行い、DSB において重要な役割を持つと考えられるリン酸化部位 2カ所を突き止めた。また、DNA-PK、XRCC4 などを含む修復複合体を単離し、その成分と形成過程の解析も行ってきた。

以上の研究は DNA 損傷が起こった場合の DNA 修復系の応答特性、言わば「動的特性」、に注目している。これに対して、DNA 修復系の存在状態や調節機構、言わば「前動状態特性」、に着目して、放射線感受性の予測と制御を目指す本研究を提案した。

2. 研究の目的

本研究は、DNA二重鎖切断修復の非相同末端結合修復経路 (NHEJ) で中心的な役割を演ずるタンパク質 (DNA-PKcs、Ku86 (Ku80)、Ku70、XRCC4、DNA ligase IV (LIG4)、XLF (Cernunnos) 等) に注目し、これらの分子が作られてから分解されるまでの一生 (ライフサイクル) および変性などによる機能不全状態から回復あるいは防御する機構 (ホメオスタシス) を探る。さらに、これらと放射線感受性の個人差、組織・細胞による違い、および生理的条件による変化との関係を探り、得られた知見を放射線

感受性予測と制御の新しい技術開発に繋げることを目的として行った。

3. 研究の方法

1) さまざまな培養細胞を種々の条件下で培養し、NHEJ 関連分子の発現をウェスタン・ブロッティング法、RT-PCR 法などにより検討した。

2) DNA-PKcs、Ku86、Ku70、XRCC4、LIG4、XLF 等を抗体カラムを用いて非照射細胞から精製し、ウェスタン・ブロッティング法等により、翻訳後修飾状態を解析した。

3) 欠損細胞、酵素阻害剤、siRNA などを用いることにより、分子間の相互関係を解析した。また、XRCC4、LIG4、XLF にさまざまな変異を導入後、欠損細胞に導入し、放射線感受性 (コロニー形成法) 等を指標として機能解析を行った。

4. 研究成果

平成21年度は、まず、これらの分子を培養細胞から抗体カラムによって単離し、翻訳後修飾状態を解析することを試みた。XRCC4については、結合分子探索もあわせて行い、細胞骨格関連因子、タンパク質リン酸化酵素、カルシウム結合タンパク質などが見出された。DNA-PK、新規タンパク質リン酸化酵素によるリン酸化部位探索およびリン酸化の意義の検討のため、網羅的にリン酸化部位置換変異体を作成した。また、他の修飾の可能性が考えられる部位についても変異体を作成した。更に、XRCC4のクロマチンDNAへの結合機構の解析を行うとともに、クロマチン結合状態にあるXRCC4を含む複合体を単離し、その成分分析を行った。

Ku86、Ku70については、これまでに、ヒトとマウスで発現量や安定性が著しく異なることを明らかにしているため、この原因を探るために、それぞれの培養細胞からcDNAを調製した。XLF、DNA ligase IVについては、ヒト細胞からcDNAを調製し、翻訳後修飾やタンパク質間相互作用に関わることを予想された部位について変異体を作製した。

平成 22 年度は、翻訳後修飾による調節の解析を中心に行った。XRCC4 については、これまでに 5カ所のリン酸化状態特異的抗体を作製している。これを用いたウェスタン・ブロッティングの結果、4カ所は放射線照射によってリン酸化が亢進するものの、1カ所は放射線照射による変化が認められなかった。欠損細胞や阻害剤を用いた検討の結果、リン酸化には DNA-PK と ATM が相補的に関わ

っていることが示された。また、XRCC4、LIG4のクロマチン結合状態を解析した結果、ヒト細胞では放射線非照射時においても20Gyのγ線照射後と同等の結合が見られた。これらのことから、XRCC4は平常時(放射線非照射時)においても複製や転写に伴うDNA損傷に応答してDNA-PK、ATMによる調節を受けている可能性が考えられた。その他のリン酸化酵素、あるいはユビキチン化、SUMO化酵素などによる調節の可能性を探るため、変異体を系統的に作製した。また、上記分子のホメオスタシスを探るために、温熱、低酸素の影響や低線量率放射線に対する応答を解析した。

平成23~24年度には、22年度までに作製された変異体等を用いて、XRCC4、XLF、LIG4の制御機構について解析を行った。主な結果として、(1) LIG4においてクロマチン結合に必要とされる領域、安定性に関わる新たな領域がそれぞれ明らかになった。これらの領域に変異を導入すると放射線感受性が上昇したことから、DNA二重鎖切断修復において重要であることが示唆された。(2) XRCC4のクロマチン結合に関与する分子とその結合領域が明らかになった。また、この領域が動物種間において極めて保存性が高いことが明らかになった。(3) XRCC4、XLFについて種間保存性を考慮しつつ系統的に作製された変異体の機能解析を行った。XRCC4については、リン酸化部位以外で放射線感受性が上昇する変異体が数種類見つかри、リン酸化以外の翻訳後修飾あるいはタンパク質間相互作用の役割が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計21件)

1. Urushihara, Y., Kobayashi, J., Matsumoto, Y., Komatsu, K., Oda, S., Mitani, H. DNA-PK inhibition causes a low level of H2AX phosphorylation and homologous recombination repair in Medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 429, 131-136 (2012). DOI: 10.1016/j.bbrc.2012.10.128. PMID: 23142596 【査読有】
2. Ito, Y., Ito, T., Karasawa, S., Enomoto, T., Nashimoto, A., Hase, Y., Sakamoto, S., Ito, T., Mimori, T., Matsumoto, Y., Yamaguchi, Y., Handa, H. Identification of DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (DNA-PKcs) as a novel target of Bisphenol A. *PLoS ONE*, 7(12), e50481 (2012). DOI: 10.1371/journal.pone.0050481. PMID: 23227178 【査読有】
3. Hayashi, J., Sakata, K., Someya, M., Matsumoto, Y., Satoh, M., Kataya, K., Hori, M., Takagi, M. and Hareyama, M. Analysis of

Ku and XRCC4 expressions of hypopharyngeal cancer tissues and results treated with chemoradiotherapy. *Oncol. Lett.*, 4, 151-155 (2012). DOI: 10.3892/ol.2012.674. PMID: 22807979 【査読有】

4. Tsuchimoto, T., Sakata, K., Someya, M., Yamamoto, H., Hirayama, R., Matsumoto, Y., Furusawa, Y. and Hareyama, M. Gene expression associated with DNA-dependent protein kinase activity under normoxia, hypoxia and reoxygenation. *J. Radiat. Res.*, 52, 464-471 (2011). DOI: 10.1269/jrr.10137. PMID: 21905307 【査読有】
5. Someya, M., Sakata, K., Matsumoto, Y., Kamdar, R.P., Kai, M., Toyota, M. and Hareyama, M. The association of DNA-dependent protein kinase activity of peripheral blood lymphocytes with prognosis of cancer. *Brit. J. Cancer*, 104, 1724-1729 (2011). DOI: 10.1038/bjc.2011.158. PMID: 21559021 【査読有】
6. 松本義久 「DNA二重鎖切断に対する生体防御機構と医療応用」 *表面科学* 32(9), 569-574 (2011). 【査読有】
7. 松本義久 「DNA二重鎖切断の修復とシグナル伝達」 *細胞 The CELL* 43(6), 4-8 (2011). 【査読無】
8. Kamdar, R.P. and Matsumoto, Y. Radiation-induced XRCC4 Association with Chromatin DNA Analyzed by Biochemical Fractionation. *J. Radiat. Res.*, 51, 303-313 (2010). PMID: 20448413 【査読有】
9. 松本義久、Mukesh Kumar Sharma, Radhika Pankaj Kamdar 「非相同末端結合の素過程の解明と臨床応用への展望」 *癌の臨床* 56, 431-435 (2010). 【査読無】
10. 松本義久 「DNA切断の「認識」の分子生物学—The End is the Beginning」 *電気学会OQD-10-002* (2010). 【査読無】

[学会発表] (計68件)

1. Sicheng LIU, Radhika Pankaj KAMDAR, 足立 典隆, 松本 義久. 生化学的分画法によるXRCC4-DNAリガーゼIV複合体のクロマチン結合の解析 (Chromatin binding of XRCC4-DNA ligase IV complex revealed by biochemical fractionation analysis). 日本放射線影響学会第55回大会, 東北大学(仙台), 2012年9月6日~8日, 口頭発表O22-2.
2. Liu, S., Kamdar, R.P., Adachi, N., Matsumoto, Y. Role of BRCT domains of DNA Ligase IV in its chromatin binding and recruitment of XRCC4. 28th RBC-NIRS International Symposium, Kyoto (Coop-Inn Kyoto), 29-30 November 2012, Poster Presentation.
3. Sharma, M.K., Matsumoto, Y. Regulation of non-homologous end joining repair mechanism

- of DNA double-strand break by kinase activity of DNA-PK. 28th RBC-NIRS International Symposium, Kyoto (Coop-Inn Kyoto), 29-30 November 2012, Poster Presentation with Proffered Short Talk.
4. 松本 義久. DNA二重鎖切断修復機構のアナトミーと医療応用への展望. 第5回 Quantum Medicine研究会(茨城大学理学部公開シンポジウム/茨城大学研究推進プロジェクト「がん放射線治療に関する生命基礎研究」講演会), 茨城大学理学部(水戸), 2012年3月4日.
 5. Liu, S., Kamdar, R.P., Matsumoto, Y. Assembly of non-homologous end joining machinery revealed by biochemical fractionation analysis. 第17回国際癌治療増感研究会, 仙台(赤門鍼灸柔整専門学校), 2011年6月24日, 一般演題2-1.
 6. Sharma, M.K., Fukuchi, M., Imamichi, S., Matsumoto, Y. DNA-PK phosphorylation in XRCC4 and XLF and its role in DNA double-strand break repair through non-homologous end joining. 14th International Congress of Radiation Research, Walsaw, Poland, 28 August – 1 September 2011, POS14-01.
 7. 福地命, Sharma, M.K., Kamdar, R.P., 松本 義久. DNA二重鎖切断修復におけるXRCC4の制御機構. 日本放射線影響学会第53回大会, 京都(京都テルサ), 2010年10月20~22日, PA-20.
 8. Sharma, M.K., Matsumoto, Y. DNA-PK phosphorylation mediated regulation of NHEJ repair process of DNA double strand break. 日本放射線影響学会第53回大会, 京都(京都テルサ), 2010年10月20~22日, OA-5-3.
 9. Kamdar, R.P., Liu, S., Matsumoto, Y. Recruitment and assembly of XRCC4-DNA ligase IV complex on radiation damaged chromatin in situ revealed by biochemical fractionation analysis. 日本放射線影響学会第53回大会, 京都(京都テルサ), 2010年10月20~22日, OA-5-2.
 10. 松本義久. DNA二重鎖切断修復におけるXRCC4の解析. 日本放射線影響学会第53回大会, 京都(京都テルサ), 2010年10月20~22日, W3-1.
 11. 松本義久, Sharma, M.K., Kamdar, R.P. 非相同末端結合の素過程の解明と臨床応用への展望. 第40回放射線による制癌シンポジウム, 札幌(さっぽろ芸文館), 2010年7月10日, SI-3.
 12. Sharma, M.K., Matsumoto, Y. DNA-PK Phosphorylation Sites Essential for DNA Double-Strand Break Repair And Its Possible Application in Cancer Therapy. 第16回国際癌治療増感研究会, 岐阜(県民文化ホール未
来会館), 2010年6月19日, 一般口頭発表15.
 13. Sharma, M.K., Matsumoto, Y. The true substrate of DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) and the significance of phosphorylation. 第12回癌治療増感研究シンポジウム, 奈良(猿沢荘), 2010年2月13日, 第9回国際癌治療増感研究協会国際研究奨励賞受賞記念講演(AL).
 14. Sharma, M.K., Matsumoto, Y. Identification of DNA-PK phosphorylation targets in XRCC4 & XLF proteins and their physiological significance in the process of DNA double-strand break repair. 56th Annual Meeting Radiation Research Society, Maui (Grand Wailea Resort Hotel and Spa), Hawaii, USA, 25-29 September 2010, Poster Session PS2.36.
 15. Matsumoto, Y. XRCC4: a bona fide substrate of DNA-PK in DNA double-strand break repair. 56th Annual Meeting Radiation Research Society, Maui (Grand Wailea Resort Hotel and Spa), Hawaii, USA, 25-29 September 2010, Symposium Talk (Invited) S1201.
 16. Kamdar, R.P., Matsumoto, Y. Assembly of non-homologous end-joining machinery on radiation-induced DNA double-strand breaks. Ataxia- Telangiectasia Workshop 2010, Redondo Beach (Crowne Plaza Hotel), CA, USA, 11-14 April 2010, Poster #122.
 17. Sharma, M.K., Matsumoto, Y. DNA-PK phosphorylation targets in XRCC4 and XLF proteins in DNA double-strand break repair. Ataxia- Telangiectasia Workshop 2010, Redondo Beach (Crowne Plaza Hotel), CA, USA, 11-14 April 2010, Poster #168.
 18. 福地 命, Sharma, M.K., 松本 義久. 生細胞内でのDNA-PKによるXRCC4のリン酸化: ヒト、マウス細胞間での相違. 日本放射線影響学会第52回大会, 広島(広島市南区民文化センター), 2009年11月11~13日, P1-12.
 19. Sharma, M.K., Matsumoto, Y. DNA二重鎖切断の修復におけるXRCC4およびXLFのDNA-PKによる新たなリン酸化部位. 日本放射線影響学会第52回大会, 広島(広島市南区民文化センター), 2009年11月11~13日, 一般演題(OB-29).
 20. Kamdar, R.P., Matsumoto, Y. Assembly of XRCC4-DNA ligase IV-XLF complex on radiation damaged chromatin in situ revealed by biochemical fractionation analysis. 日本放射線影響学会第52回大会, 広島(広島市南区民文化センター), 2009年11月11~13日, 一般演題(OB-28).

[図書] (計3件)

1. Matsumoto, Y., Imamichi, S., Fukuchi, M., Liu,

- S., Wanotayan, R., Kuniyoshi, S., Yoshida, K., Mae, Y., Sharma, M.K. Radiosensitization strategy through modification of DNA double-strand break repair. In “DNA Repair-New Research Directions”, Edit. Chen, C. ISBN 980-953-307-746-3, InTech (2012).
2. 松本義久 「放射線によるDNA損傷・修復と細胞死」 日本放射線腫瘍学会・日本放射線腫瘍学研究機構編「臨床放射線腫瘍学」, 40-44, 南江堂(2012).
3. Kamdar, R.P., Matsumoto, Y. DNA double-strand break repair through non-homologous end-joining: Recruitment and assembly of the players. “DNA Repair”, Edit. Kruman, I. ISBN: 978-953-307-697-3, InTech, pp. 477-502 (2011).

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

1. 細胞生物学会ランチョンセミナー（日本ミリオア主催） 「The End Is the Beginning-DNA 二重鎖切断認識・修復研究の現状と展望」 2010年5月19日、大阪国際会議場(大阪市).
2. サマー・サイエンスキャンプ 2012/サイエンスキャンプ DX/第33回数理の翼夏期セミナー 「DNA 損傷に対する生体防御機構の分子・細胞生物学」 2012年8月10日、川崎市青少年の家(川崎市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

松本 義久 (Matsumoto Yoshihisa)

東京工業大学・原子炉工学研究所・准教授

研究者番号：20302672

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし