

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月10日現在

機関番号：15401
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23650588
 研究課題名（和文） ゲノムストレス記憶・継承システムの解明

研究課題名（英文） Study of the memory of genome stress

研究代表者

田代 聡（TASHIRO SATOSHI）
 広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授
 研究者番号：20243610

研究成果の概要（和文）：

本研究は、放射線や抗ガン剤によるゲノムストレスが、記憶・継承される可能性を検証するため、ゲノム修復関連タンパク質 RAD51 のクロマチン結合について網羅的解析を行った。抗がん剤処理2時間後の細胞では損傷部位や染色体のテロメア近傍などへの RAD51 の結合が確認されが、2週間後にはほとんど認められなかった。ヒストン H2AZ などの因子について、様々なゲノム修復因子やヒストンについて同様の解析を行うことで、長期間に渡る損傷クロマチンの変化について解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：

The purpose of this study is to test whether there is a system to memory the information of genome damage induced by ionizing radiation or anti-cancer drugs in human cells or not. We performed genome-wide analysis of the binding of DNA repair protein RAD51 to chromatin after induction of DNA damage. We could detect the binding of RAD51 to damaged sites and sub-telomeric regions at 2 hours after induction of DNA damage. The RAD51 binding to the damaged sites were reduced at two weeks after induction of DNA damage. We are now examining the binding of other repair factors and histones to the damaged sites at two weeks after induction of DNA damage.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・発がん

キーワード：放射線、抗がん剤、ゲノム損傷、クロマチン、クロマチン免疫沈降シーケンス法

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍治療法の進歩により、長期生存する小児がん経験者数が急速に増加しているため、放射線や抗がん剤を用いた治療による二次性悪性腫瘍の発症や次世代への影響の有

無の検証が重要な問題となってきた。二次性白血病などの発症には、治療に用いられる放射線や抗がん剤などによる様々なゲノムストレスが重要な因子となっているとされている。しかし、治療によるゲノムストレスが

どのように二次性悪性腫瘍などの発症に関与しているのか、あるいは次世代にどのような影響をあたえるのかについては未だ不明な点が多い。

2. 研究の目的

我々は、ゲノムストレスが記憶・継承されるためには、損傷ゲノムを含むクロマチンに何らかの刻印がなされる、すなわちゲノムストレスをエピジェネティックに記憶するシステムが存在するのではないかと考えた。そこで、本研究では、「放射線や抗ガン剤によるゲノムストレスの記憶や継承は、ヒストン、ゲノム修復タンパク質などのクロマチンへの結合により維持される」という仮説をたて、これを検証するため

1) ゲノム損傷誘導後のゲノム修復タンパク質のクロマチンへの結合

2) ゲノム損傷誘導後クロマチンでのヒストン構成の変化

について、全染色体 DNA を対象としたクロマチン免疫沈降シーケンス法による解析を行う。

3. 研究の方法

1) 組換え修復関連タンパク質 RAD51 の損傷誘導後のクロマチンへの結合の解析

RAD51 は、DNA 二本鎖切断の相同組換え修復で染色体の組換え反応を促進するために重要な DNA に結合するタンパク質である。また、RAD51 を過剰発現することにより、染色体転座など染色体異常の頻度が上昇することが報告されている。そこで、ヒト繊維芽細胞株 GM0637 に放射線照射や抗がん剤処理を行い、抗 RAD51 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法により RAD51 に結合したクロマチンを経時的に精製する。ついで、精製されたクロマチンから DNA を抽出し PCR 法により増幅した後、次世代シーケンサーを用いて、RAD51 のク

ロマチン結合について全染色体 DNA 領域を対象にクロマチン免疫沈降シーケンス解析を行う。ゲノム損傷誘導後 RAD51 のクロマチンへの結合上昇が持続的に認められた領域については、定量 PCR 法を用いたクロマチン免疫沈降法により RAD51 の当該領域への結合について検証を行う。

2) ゲノム損傷誘導後のヒストン結合変化の解析

我々は、ゲノム損傷誘導後のクロマチン構造変換の解析から、ヒストン H2 のバリエーションである H2AX が損傷クロマチンから放出されることが明らかにしている。さらに、最近ヒストン H2A のもう一つのバリエーションである H2AZ も損傷依存的にクロマチンから放出されることを見出した。そこで、放射線照射などによるゲノム損傷誘導後、経時的に抗 H2AX および H2AZ 抗体を用いてヒストン H2AX と H2AZ を含むクロマチンを精製し、全染色体 DNA を対象とした免疫沈降シーケンス解析を行う。

4. 研究成果

平成 23 年度には、ヒト繊維芽細胞株に抗がん剤処理によるゲノム損傷誘導後、経時的にゲノム修復関連タンパク質 RAD51 のクロマチンへの結合について、抗 RAD51 抗体を用いたクロマチン免疫沈降シーケンス法による検証に取り組んだ。まず、トポイソメラーゼ II 阻害作用を持つ抗がん剤エトポシド処理後 30 分後の RAD51 抗体を用いた免疫沈降シーケンス解析では、二次性白血病の疾患特異的染色体異常として知られている 11q23 転座の染色体転座切断点集中領域への RAD51 の結合が確認された。この結合は、ゲノム損傷応答因子 ATM の欠損細胞でより強く認められていた。さらに、11q23 転座の染色体転座切断点集中領域以外にも、一部の染色体のテロメ

ア近傍などへの RAD51 の結合が認められた。さらにクロマチン免疫沈降用の新しい RAD51 抗体を作成し、エトポシド処理 2 週間後の細胞を用いた RAD51 のクロマチンへの結合の解析を行ったが、残念ながら特異的なクロマチン領域への RAD51 の結合はほとんど認められなかった。このため、RAD51 以外の修復関連蛋白質のクロマチン免疫沈降法を用いた損傷クロマチンへの結合を検討している。

ヒストン H2 のバリエーションの損傷クロマチンへの結合の検討では、H2AZ-1 と H2A.Z-2 の 2 種類の H2AZ が存在することが報告された。我々は、H2A.Z-2 が損傷依存的にクロマチンから放出されることを確認した。しかし、現在 H2AZ-1 と H2AZ-2 を区別できる抗体は存在しない。このため、現在 FLAG などによって標識した H2A.Z-2 を発現させた細胞での H2AZ-2 の損傷クロマチンへの結合について検討を開始した。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Aoki Y, Sakogawa K, Hihara J, Emi M, Hmamai Y, Kono K, Shi L, Sun J, Kitao H, Ikura T, Niida H, Nakanishi M, Okada M, Tashiro S. Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines, *Int J Oncol*, 査読有, (in press).
2. Fujita K, Nakamura Y, Oka T, Ito H, Tamura T, Tagawa K, Sasabe T, Katsuta A, Motoki K, Shiwaku H, Sone M, Yoshida C, Katsuno M, Sishi Y, Murata M, Taylor JP, Wanker EE, Kono K, Tashiro S, Sobue G, La Spada AR, Okazawa H. A functional deficiency of TERA/VCP/p97 contributes to impaired DNA damage repair in multiple

polyglutamine diseases. *Nature commun*, 査読有, (in press).

3. Shi L, Fujioka K, Sun J, Kinomura A, Inaba T, Ikura T, Ohtaki M, Yoshida M, Kodama Y, Livingston GK, Kamiya K, Tashiro S. A Modified System for Analyzing Ionizing Radiation-Induced Chromosome Abnormalities, *Radiat Res.*, 査読有, 177(5), 2012, pp533-538

4. Tonda T, Satoh K, Otani K, Sato Y, Maruyama H, Kawakami H, Tashiro S, Hoshi M, Ohtaki M. Investigation on circular asymmetry of geographical distribution in cancer mortality of Hiroshima atomic bomb survivors based on risk maps: analysis of spatial survival data, *Radiat Environ Biophys*, 査読有, 51(2), 2012, pp133-141.

5. Hosoya N, Okajima M, Kinomura A, Fujii Y, Hiyama T, Sun J, Tashiro S, Miyagawa K. Synaptonemal complex protein SYCP3 impairs mitotic recombination by interfering with BRCA2, *EMBO Rep.*, 査読有, 13(1), 2011, pp44-51.

6. Takaku M, Kainuma T, Ishida-Takaku T, Ishigami S, Suzuki H, Tashiro S, van Soest RW, Nakao Y, Kurumizaka H. Halenaquinone, a chemical compound that specifically inhibits the secondary DNA binding of RAD51, *Genes Cells*, 査読有, 16(4), 2011, pp427-436.

[学会発表] (計 20 件)

1. Satoshi Tashiro, Jiying Sun, Kazuteru Kono, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura : Mechanism of the radiation-induced repair focus

- formation. 第 35 回日本分子生物学会, 福岡 2012. 12. 11.
2. Lin Shi, Kurumi Fujioka, Jiying Sun, Tsuyoshi Ikura, Megu Ohtaki, Mitsuaki Yoshida, Yoshiaki Kodama, Gordon K. Livingston, Kenji Kamiya, Satoshi Tashiro: Analysis of ionizing radiation-induced chromosome abnormalities by PNA-FISH. The 10th International Symposium on Chromosomal Aberrations (ISCA10), Amalfi (イタリア) 2012. 10. 19.
 3. 田代 聡:放射線の健康影響と小児. 第 115 回日本小児科学会学術集会, 福岡 2012. 4. 20.
 4. 田代 聡: 放射線誘発核内フォーカス形成のエピゲノム制御. 日本農芸化学会 2012 年度大会、京都 2012. 3. 22.
 5. 西淵いくの, 田代 聡, 原田昌彦, 深川竜郎, 井倉毅, 鈴木秀和, 木野村愛子, 孫継英: DNA 損傷応答におけるヒストンバリエント H2A. Z isoform の関与. 第 34 回日本分子生物学会, 横浜 2011. 12. 13.
 6. 時 林, 藤岡来実, 孫 継英, 木野村愛子, 稲葉俊哉, 井倉 毅, 大瀧 慈, 吉田光明, 児玉吉明, Gordon K. Livingston, 神谷研二, 田代 聡: A new system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜 2011. 12. 13.
 7. 青木義朗, 田代 聡: 5-Fluorouracil 誘導性 DNA 障害における ribonucleotide reductase-1 の役割に関する検討. 第 34 回日本分子生物学会, 横浜, 2011. 12. 13.
 8. 田代 聡 (招待講演・イブニングセミナー):放射線被ばくによるゲノム損傷と小児の健康影響. 第 53 回日本小児血液・がん学会学術集会, 前橋 2011. 11. 25.
 9. 西淵 いくの, 田代 聡, 原田 昌彦, 木村 智樹, 村上 祐司, 権丈 雅浩, 兼安祐子, 永田 靖: DNA 損傷応答におけるヒストンバリエント H2A. Z isoform の関与. 日本放射線腫瘍学会第 24 回大会, 神戸 2011. 11. 17.
 10. 時 林, 藤岡来実, 孫 継英, 木野村愛子, 稲葉俊哉, 井倉 毅, 大瀧 慈, 吉田光明, 児玉吉明, Gordon K. Livingston, 神谷研二, 田代 聡: A new system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. 日本放射線影響学会 第 54 回大会, 神戸 2011. 11. 17.
 11. Jiying Sun, Yukako Oma, Masahiko Harata, Kazuteru Kono, Hiroki Shima, Aiko Kinomura, Tsuyoshi Ikura, Hidekazu Suzuki, Shuki Mizutani, Roland Kanaar and Satoshi Tashiro: ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot. 第 54 回放射線影響学会, 神戸 2011. 11. 17.
 12. 田代 聡: 放射線により誘発される DNA 修復蛋白質による核内高次構造体形成、福島原子力発電所事故における現地での活動報告. 日本薬物動態学会 第 26 回年会, 広島 2011. 11. 17.
 13. Ikuno Nishibuchi, Satoshi Tashiro, Hiroki Shima, Tomoki Kimura, Yuji Murakami, Masahiro Kenjo, Yuko Kaneyasu, Yasushi Nagata: The dynamics of histone variant H2A. Z upon DNA damage. ASTRO's 53rd Annual Meeting, Miami, USA, 2011. 10. 2.
 14. 青木義朗, 檜原 淳, 迫川賢士, 恵美 学, 浜井洋一, 岡田守人, 田代 聡: DNA 二重鎖切断に着目した 5-Fluorouracil の作用機序の解明. 第 65 回食道学会学術集会, 仙台, 2011. 9. 26.
 15. 時 林, 藤岡来実, 孫 継英, 木野村愛子, 稲葉俊哉, 井倉 毅, 大瀧 慈, 吉田光明, 児玉吉明, Gordon K. Livingston, 神谷研二, 田代 聡: A new system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities. 第 84 回日本生化学会大会, 京都 2011. 9. 21.
 16. Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura, Dipanjan Chowdhury and Satoshi Tashiro: Mechanism of 11q23 chromosomal translocation after etoposide treatment. 第 84 回生化学会大会, 京都 2011. 9. 21.
 17. 田代 聡 (招待講演・シンポジウム): 放射線発がん分子メカニズム研究の新展開. 第 28 回 日本医学会総会特別企画, 東京 2011. 9. 17.

18. 田代 聡 (招待講演・シンポジウム) : 原発事故と小児放射線健康影響. 第114回日本小児科学会, 東京 2011. 8. 12.
19. 青木義朗, 迫川賢士, 檜原 淳, 恵美学, 浜井洋一, 岡田守人, 田代 聡 : DNA二重鎖切断に着目した 5-Fluorouracil の作用機序の解明. 第 66 回日本消化器外科学会総会, 名古屋, 2011. 7. 13.
20. 田代 聡 (フォーラム) : 福島県における小児甲状腺被ばく調査. 日本小児科学会緊急フォーラム, 東京 2011. 4. 17.

[その他]

ホームページ等

http://home.hiroshima-u.ac.jp/cellbio/cell_biology/Welcome_%28youkoso%29.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田代 聡 (TASHIRO SATOSHI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号 : 2 0 2 4 3 6 1 0

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :