

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24510064

研究課題名(和文)放射線適応応答に關する非相同末端結合修復経路の解明と分子機構の解析

研究課題名(英文)Molecular analysis of the pathway of non-homologous end-joining involved in the radioadaptive response

研究代表者

立花 章(Tachibana, Akira)

茨城大学・理学部・教授

研究者番号：20188262

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：放射線適応応答では、DNA 2本鎖切断(DSB)修復の正確度が上昇していると考えられる。放射線適応応答に關するDNA修復機構を明らかにするために、DSB再結合に關するDNAリガーゼの発現抑制を行った細胞での放射線適応応答を検討した。その結果、非相同末端結合修復のうち、「古典的経路」(C-NHEJ)で作用するDNAリガーゼIVが關与していることが明らかになった。これらのことから、放射線適応応答にはDNAリガーゼIVが作用するC-NHEJが關与しているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The radioadaptive response is the induction of cellular resistance to moderate or high doses of radiation by previous exposure to low doses. It has been suggested that the frequency of mis-rejoining of double-strand breaks (DSBs) is reduced in the radioadaptive response. There are two non-homologous end-joining (NHEJ) pathways to directly rejoin two ends of the breakpoint of DNA; classical NHEJ (C-NHEJ) and alternative NHEJ (alt-NHEJ). It is also known that DNA ligase IV is involved in C-NHEJ, and DNA ligase III in alt-NHEJ. In order to clarify which pathway is involved in the radioadaptive response, we investigated the radioadaptive response in the cells with reduced DNA ligase activity. We found that the radioadaptive response was suppressed in the cells with reduced amount of DNA ligase IV. On the contrary, the radioadaptive response was not suppressed in the cells with reduced amount of DNA ligase III. These results suggest that C-NHEJ is involved in the radioadaptive response.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線適応応答 非相同末端結合 DNAリガーゼ

1. 研究開始当初の背景

細胞に低線量の放射線を照射すると、その後の高線量の放射線照射に対して抵抗性となる現象がヒトリンパ球で発見され、放射線適応応答と呼ばれており、低線量放射線のほか、低濃度の過酸化水素によっても誘導される。研究代表者はこれまでにマウス胎児由来細胞株 m5S を用いた研究により、10 cGy 以下の低線量の X 線照射を行うと放射線適応応答状態が誘導され、さらにタンパク質リン酸化酵素であるプロテインカイネース C (PKC) 及び p38 MAP カイネースが活性化されることを示し、これらが作用する細胞内情報伝達系が適応応答に関与していることを示唆した。実際、PKC のサブタイプの一つである PKC の発現量を低下させた m5S 細胞では放射線適応応答が抑制されることを見出し、PKC が放射線適応応答誘導に重要な役割を果たしていることを示した。

しかし、放射線適応応答誘導のメカニズムには不明な点が多い。適応応答によって染色体異常が減少することから、電離放射線による DNA 損傷の中でも生物学的に重要な損傷である DNA 2 本鎖切断 (DSB) の修復機構が適応応答に関与するものと考えられるが、その詳細は明らかでない。適応応答機構を理解するためには、どのような修復機構が関与しているのかを解明することが必要である。

研究代表者は、試験管内で DSB の再結合を解析する実験系を開発し、放射線適応応答を誘導した細胞では DSB 再結合の効率が上昇し、しかも正確な再結合が行われることを明らかにした。このことから、放射線適応応答では、誤りの少ない DSB 再結合活性が上昇するか、或いは誤りがちな DSB 再結合活性が低下し、その結果として染色体異常頻度が減少するものと推測された。しかし、上記 2 つの可能性のどちらであるかは不明のままである。

DSB 修復機構には、相同組換え修復と非同末端結合修復 (NHEJ) の 2 つの機構があるが、さらに近年 NHEJ の中に classical NHEJ (C-NHEJ) と alternative NHEJ (alt-NHEJ) の 2 つの経路があることが明らかにされてきた。これらの 2 つの NHEJ 経路は、適応応答で働く DNA 修復機構の解明に新たな道を開くものである。C-NHEJ は DNA 依存プロテインカイネース、DNA リガーゼ、XRCC4 などのタンパク質が関与し、比較的正確な再結合を行う。一方、alt-NHEJ はポリ ADP リボースポリメラーゼ、DNA リガーゼ、XRCC1 などのタンパク質が関与し、再結合の際に誤りを起こしやすいと考えられている。このことから、研究代表者の試験管内 DSB 再結合反応の結果は、これら 2 つの NHEJ 経路の活性化の有無によって説明できるのではないかと推論できる。

2. 研究の目的

本研究では、以上の知見を踏まえて、DNA リガーゼ及び DNA リガーゼが放射線適応応答にどのように関与しているかを明らかにすることによって、2 つの NHEJ 機構が適応応答において果たしている役割を解明し、放射線適応応答での DNA 修復機構の全体像を明らかにすることを目指している。

3. 研究の方法

(1) DNA リガーゼの遺伝子発現抑制

DNA リガーゼの発現を抑制するために、RNA 干渉法 (RNAi) を用いた。マウス m5S 細胞に RNAi 用試薬である LipofectAmine RNAiMAX (インビトロジェン社) を用いて、発現を抑制したい DNA リガーゼに対する干渉 RNA (siRNA) を導入した。siRNA には、インビトロジェン社の Stealth siRNA を用いた。RNAi においては、用いる siRNA の配列によって、発現抑制の程度に差があることが知られているが、インビトロジェン社からは 1 つの遺伝子に対し 3 種類の siRNA がセットとして提供されているため、これらのうち、最も効率のよい siRNA を検索した。後述するように、siRNA 導入後約 1 週間で放射線適応応答の検討を行うため、siRNA を導入してから 1 週間後の細胞から全 RNA とタンパク質を抽出し、これを用いて RT-PCR 法によって mRNA 量を分析することにより、最も遺伝子発現を抑制させることのできる siRNA を選択した。

(2) 微小核形成を指標とした放射線適応応答の解析

(1) により作成した DNA リガーゼ発現抑制細胞を用いて、微小核形成を指標として放射線適応応答の解析を行った。放射線適応応答は、細胞周期が G1 期にある細胞に放射線を照射して解析した。本研究で用いる m5S 細胞は接触阻止により、極めて容易に細胞周期を G1 期に揃えることができる。siRNA 導入後、約 7 日培養することにより、ほぼ全ての細胞が G1 期になる。この細胞を低濃度過酸化水素 (1 μ M) で処理することにより放射線適応応答を誘導した。低線量 X 線の代わりに低濃度過酸化水素により放射線適応応答が誘導されることは既にこれまでに報告されており、我々も常に用いている。1 μ M 過酸化水素で細胞を 5 時間処理した後、X 線 5 Gy を照射し、細胞をスライドガラス上にまいて、サイトカラシン B を含む培地中で培養した。約 3 日間培養した後、細胞を固定し、核を染色した。サイトカラシン B によって細胞質分裂は阻害されるが、核の分裂は阻害されないため、二核細胞が出現する。5 Gy X 線による損傷を修復できなかった場合には、二核細胞中に微小核が出現する。低濃度過酸化水素により放射線適応応答が誘

導された細胞にX線 5 Gy を照射すると、無処理細胞にX線 5 Gy を照射したときに比べ、放射線適応応答により微小核の出現頻度は低下する。DNA リガーゼ発現抑制細胞での微小核頻度を検討することにより、放射線適応応答が誘導されているか否かを検討した。

(3) 試験管内 DSB 再結合反応での再結合エラーの DNA 塩基配列解析

前述したように、これまでに、3 Gy X 線を照射した m5S 細胞、および 2 cGy 照射後 3 Gy 照射した m5S 細胞の細胞核抽出液を用いた試験管内 DSB 再結合反応によって DSB 再結合活性の検討を行った。その結果、これまでに再結合時に誤りを起こしたことによると考えられるマーカー遺伝子欠損変異プラスミドクローンを多数得ている。これらのプラスミドのマーカー遺伝子の塩基配列解析を行った。BigDye Terminator kit (Applied Biosystems 社) を用いてシーケンス反応を行い、ABI PRISM310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) DNA リガーゼ IV 発現抑制細胞での放射線適応応答

DNA リガーゼ IV は C-NHEJ に関与するとされる DNA リガーゼである。3 種類の siRNA をマウス m5S 細胞に導入し、RT-PCR 法を用いて発現量を検討して、siRNA(48) が安定して DNA リガーゼ IV mRNA の発現量を最も低下させることができることを見出した (図 1 (A))。

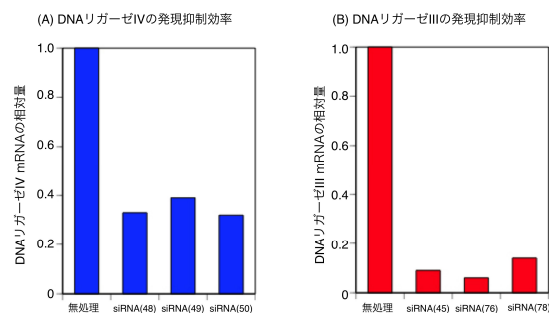


図 1. DNA リガーゼの発現抑制効率

(A) DNA リガーゼ IV の発現抑制。3 種類の siRNA を用いて検討したところ、siRNA(48) が常に約 30% 程度まで発現抑制した。(B) DNA リガーゼ III の発現抑制。3 種類の siRNA のうち、siRNA(76) が最もよく発現を抑制した。

続いて、この siRNA を用いた DNA リガーゼ IV 発現抑制細胞における放射線適応応答について、微小核形成を指標として解析した。その結果、DNA リガーゼ IV 抑制細胞では適応応答が抑制されることが明らかになった (図 2)。

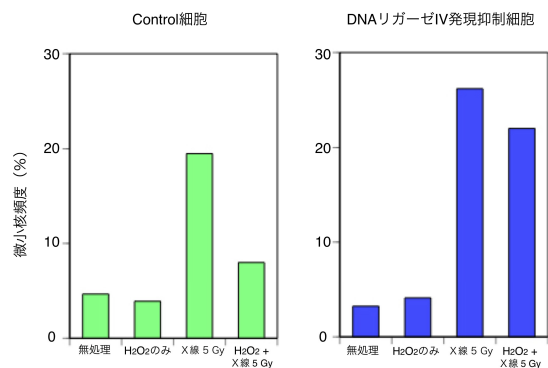


図 2. DNA リガーゼ IV 発現抑制細胞での放射線適応応答

siRNA(48)によって DNA リガーゼ IV の発現を抑制した細胞を用いて、微小核頻度を解析したところ、低濃度過酸化水素で前処理した場合に微小核頻度がほとんど低下しなかった。

さらに、X線照射後の生存率を指標として放射線適応応答を検討したところ、DNA リガーゼ IV 発現抑制細胞では、放射線適応応答の効果が認められず、微小核形成の場合と同様、放射線適応応答が抑制されていることを示唆する結果が得られた (data not shown)。

(2) DNA リガーゼ III 発現抑制細胞での放射線適応応答

DNA リガーゼ III は alt-NHEJ に関与するとされる DNA リガーゼである。上記 DNA リガーゼ IV の場合と同様に、3 種類の siRNA のうち、mRNA 発現量を最も低下させる siRNA を検索したところ、siRNA(76) が最も効率よく発現を抑制することが明らかになった (図 1 (B))。

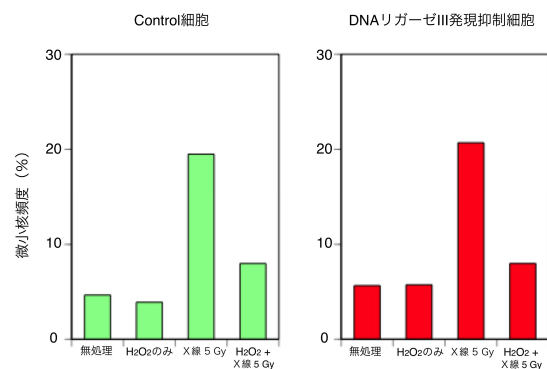


図 3. DNA リガーゼ III 発現抑制細胞での放射線適応応答

siRNA(76)によって DNA リガーゼ III の発現を抑制した細胞を用いて、微小核頻度を解析したところ、低濃度過酸化水素で前処理した場合に微小核頻度は control 細胞と同程度に低下した。

この DNA リガーゼ III 発現抑制細胞における放射線適応応答について、微小核形成を指標として解析した。その結果、DNA リ

ガーゼ III 抑制細胞では放射線適応応答が抑制されなかった (図 3)。

(3) DNA リガーゼ I 発現抑制細胞での放射線適応応答

本研究開始時には、alt-NHEJ に関与する DNA リガーゼは DNA リガーゼ III のみであるとされていたが、その後、DNA リガーゼ I も alt-NHEJ に関与するという報告が発表された。このため、DNA リガーゼ I についても、上記と同様に RNAi による発現抑制を行い、放射線適応応答を検討した。

DNA リガーゼ I の発現を抑制する siRNA を検索し、さらに DNA リガーゼ I 発現抑制細胞における放射線適応応答について微小核形成を指標として解析した結果、DNA リガーゼ I 抑制細胞では DNA リガーゼ III 抑制細胞と同様に、放射線適応応答が抑制されなかった (data not shown)。

(4) 試験管内 DSB 再結合反応での再結合エラーの解析

上述したように、X線 3 Gy を照射した細胞、および予め 2 cGy 照射後に 3 Gy を照射した放射線適応応答状態の細胞のそれぞれから核抽出液を精製し、試験管内 DSB 再結合反応を用いて、再結合反応を行ったところ、3 Gy 単独照射の場合は DSB 再結合の効率が低く、再結合時のエラー頻度も高かった。一方、適応応答状態の細胞核抽出液では、DSB 再結合効率は高く、かつ再結合時のエラー頻度も低かった。このことは、この試験管内反応系が細胞での放射線適応応答を反映しているものと考えられることができる。

そこで、このときにどのような修復エラーが生じているのかを検討するために、再結合エラー部分の DNA 塩基配列を解析した。塩基配列解析の結果、プラスミド配列に見られた変異は欠失突然変異であった。表 1 に、欠失のサイズと、その欠失を持つプラスミドクローンの個数を示す。

表 1 欠失サイズとそのクローン数

欠失サイズ (bp)	3 Gy 照射	2 cGy + 3 Gy
13	0	1
46	5	11
47	2	0
52	0	2
73	1	0
85	1	0
113	0	1
168	0	1
169	2	0
185	1	0
243	0	1
391	1	0
416	1	0
528	1	0
566	0	1
607	1	0

全体的に、3 Gy 照射の方が、2 cGy + 3 Gy の場合よりも欠失サイズが大きいことが表より分かる。例えば、100 bp 以上のサイズの欠失を持つクローンは、3 Gy 照射では 16 クローン中 7 クローン (44 %) であるが、2 cGy + 3 Gy では 18 クローン中 4 クローン (22 %) であり、3 Gy 照射の方がその比率が高い。この結果から、放射線適応応答状態にある細胞では、X線照射の場合に比べて DNA の欠失範囲が小さいものと考えられる。

(5) 考察と結論

本研究では、放射線適応応答の過程に、C-NHEJ と alt-NHEJ のどちらの経路が関与するかを検討するために、それぞれの経路に関与するとされる DNA リガーゼの発現を抑制した細胞を用いて、放射線適応応答を解析した。その結果、C-NHEJ に関与する DNA リガーゼ IV の発現を抑制した場合には放射線適応応答が抑制されたが、alt-NHEJ に関与する DNA リガーゼ III および DNA リガーゼ I の発現を抑制した細胞では放射線適応応答に影響はなかった。これらのことから、放射線適応応答には DNA リガーゼ IV が作用する C-NHEJ が関与しており、alt-NHEJ の寄与は少ないものと考えられる。

RNAi 法によって DNA リガーゼの発現抑制を行ったところ、DNA リガーゼ III では高い効率の発現抑制が見られたが、DNA リガーゼ IV では約 30 %程度しか発現抑制がされなかった (図 1)。DNA リガーゼ IV は生存に必須の酵素であるとされており、DNA リガーゼ IV を欠損したマウスは胎生致死となる。細胞が生存するにはある程度の DNA リガーゼ IV 活性を維持する必要があるため、完全な活性抑制ができなかったものと考えられる。DNA リガーゼ IV 発現抑制細胞では、過酸化水素前処理をして放射線適応応答を誘導した場合に、前処理無しの場合よりも微小核頻度がわずかに低下し、放射線適応反応がある程度残っているように見える (図 2) が、これは恐らく部分的に残存している DNA リガーゼ IV 活性によるものと考えられる。

C-NHEJ は alt-NHEJ よりも DSB 修復の正確度が高いとされていることから、放射線適応応答においては C-NHEJ 活性が上昇することによって、修復の正確度が上昇しているものと推測される。また、試験管内 DSB 再結合反応での修復エラーを解析したところ、適応応答条件の細胞では DNA の欠失範囲が小さくなることが明らかになり、このことも C-NHEJ の関与を示唆している。

本研究の結果から、放射線適応応答は C-NHEJ 活性が上昇することによって生じているものと考えられるが、どのような機構によって C-NHEJ 活性が上昇するのかは明らかでない。C-NHEJ 活性の調節機構に関する研究はこれまでのところほとんど行

われていない。研究代表者は、これまでに protein kinase C α と p38 MAP kinase α が放射線適応応答誘導に關与することを明らかにしてきた。これらの細胞内シグナル伝達経路が C-NHEJ 活性の調節に關与している可能性が考えられる。今後、放射線適応応答時の C-NHEJ の調節機構の解明が必要であると思われる。

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 3 件)

Sasaki, MS., Tachibana, A., Takeda, S., Cancer risk at low doses of ionizing radiation: artificial neural networks inference from atomic bomb survivors., *Journal of Radiation Research*, 55 巻、391-406、2014、査読有

Ohara, M., Funiyu, Y., Ebara, S., Sakamoto, Y., Seki, R., Iijima, K., Ohishi, A., Kobayashi, J., Komatsu, K., Tachibana, A., Tauchi, H., Mutations in the FHA-domain of ectopically expressed NBS1 lead to radiosensitization and to no increase in somatic mutation rates via a partial suppression of homologous recombination., *Journal of Radiation Research*, 55 巻、690-698、2014、査読有

Hosoki, A., Yonekura, S., Zhao, QL., Wei, ZL., Takasaki, I., Wang, LL., Hasuike, S., Nomura, T., Tachibana, A., Hashiguchi, K., Yonei, S., Kondo, T., Zhang-Akiyama, QM., Mitochondria-targeted superoxide dismutase (SOD2) regulates radiation resistance and radiation stress response in HeLa cells., *Journal of Radiation Research*, 53 巻、58-71、2012、査読有

[学会発表](計 25 件)

湯田愛弥、吉井沙耶香、立花 章、放射線適応応答における DNA ligase III と IV の關与、日本放射線影響学会第 57 回大会、平成 26 年 10 月 1 日～3 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)

立花 章、長森夏海、松永愛美、郡司未佳、小林純也、線緩照射による放射線適応応答誘導とその機構、日本放射線影響学会第 57 回大会、平成 26 年 10 月 1 日～3 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿児島市)

長森夏海、松永愛美、小林純也、立花 章：線緩照射による放射線適応応答誘導への p38 MAPK の關与、日本放射線影響学会第 57 回大会、平成 26 年 10 月 1 日～3 日、かごしま県民交流センター(鹿児島県・鹿

児島市)

Nagamori, N., Matsunaga, M., Kobayashi, J., Tachibana, A., The mechanism of the radioadaptive response induced by chronic γ -irradiation., 第29回放射生研-放医研国産シンポジウム、2013.11.28-29、コープ・イン・京都(京都府・京都市)
長森夏海、松永愛美、小林純也、立花 章、線緩照射による放射線適応応答誘導への PKC の關与、日本放射線影響学会第 56 回大会、平成 25 年 10 月 18 日～20 日、ホテルクラウンパレス青森(青森県・青森市)
Saotome, S., Murase, A., Matsunaga, M., Tachibana, A., The interaction between PKC α and p38MAPK might be involved in the induction of radioadaptive response., 第 40 回欧州放射線研究学会年会、2013.09.01-05、ダブリン城会議場、ダブリン市(アイルランド)
立花 章、松永愛美、五月女淑歩、小林純也、ガンマ線緩照射による放射線適応応答の誘導、日本放射線影響学会第 55 回大会、平成 24 年 9 月 6 日～8 日、東北大学(宮城県・仙台市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

立花 章 (Akira Tachibana)
茨城大学・理学部・教授
研究者番号：20188262

(2)研究分担者

無し

(3)連携研究者

無し