

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24710063

研究課題名(和文)放射線照射後の染色体転座形成および形成抑制の分子機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of chromosome translocation formation/suppression after exposure to ionizing radiation

研究代表者

山内 基弘(YAMAUCHI, Motohiro)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60437910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：染色体転座は白血病や固形癌をはじめ、様々な疾患の原因となりうる臨床的に重要な染色体異常であるが、その形成・形成抑制の分子機構は明らかではない。本研究では転座形成の必要条件である、複数のDNA二本鎖切断(DSB)同士の会合に影響を与える因子を同定した。DSB部位に集積するDNA修復蛋白質の「フォーカス」でDSBを可視化し、複数のDSB同士の会合頻度を調べた結果、Ku80、DNA-PKcs、およびATM蛋白質がDSB同士の会合を抑制していること、また53BP1蛋白質にはDSB同士の会合および転座形成を促進する働きがあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chromosome translocation is a clinically relevant chromosome aberration since it can cause leukemia, solid cancer, or other diseases, yet the molecular mechanism for translocation formation/suppression is unknown. In the present study, we identified factors affecting interaction between multiple DNA double-strand breaks (DSBs), that is prerequisite for translocation formation. We visualized DSBs by "foci" of a DNA repair factor accumulating at DSB sites, and examined frequency of DSB interaction. We identify Ku80, DNA-PKcs, and ATM as factors suppressing DSB interaction, and we also find that 53BP1 promotes DSB interaction and thereby facilitates translocation formation.

研究分野：放射線生物学

キーワード：染色体転座 DNA二本鎖切断 フォーカス 会合 Ku80 DNA-PKcs ATM 53BP1

1. 研究開始当初の背景

染色体転座は放射線被ばくなどで複数の染色体に DNA 二本鎖切断が起こり、その修復が異なる染色体間で起こった場合に形成される。その際に例えば、癌原遺伝子が他の遺伝子と連結して融合遺伝子を形成したり、あるいは癌原遺伝子の配列が他の染色体上の強力なプロモーターの下流に結合されたりすると、その癌原遺伝子産物の恒常的な活性化あるいは高発現が起こり、細胞癌化につながる。このように染色体転座は白血病や癌を代表とする様々な疾患の原因となりうる、臨床的に重要な染色体異常であるが、その形成および形成抑制の分子機構は明らかではなかった。

2. 研究の目的

本研究では、放射線照射後の染色体転座の形成・形成抑制の分子機構、特に染色体転座形成の必要条件である、「DNA 二本鎖切断同士の会合」に影響を与える因子を同定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細胞

コントロール細胞としては、正常ヒト線維芽細胞 BJ-hTERT および野生型 (WT) のマウス胎児線維芽細胞 (MEFs) を用いた。Ku80 欠損細胞としては、Ku80 (-/-) MEFs、DNA-PKcs 欠損細胞としては、DNA-PKcs (-/-) MEFs、ATM 欠損細胞としては毛細血管拡張性運動失調症 (Ataxia Telangiectasia) 患者由来の線維芽細胞 AT5BI-hTERT を用いた。

(2) 放射線照射

細胞に対する放射線照射はガンマ線照射装置 (線源: Cs-137) 中で、線量率 1 Gy/min、室温にて行った。

(3) 蛍光免疫染色

DNA 二本鎖切断 (DSB) の可視化は、DSB 部位に集積する 53BP1 蛋白質の蛍光免疫染色により行った。また細胞周期を区別するため、S 期細胞を Ethynyl deoxyuridine (EdU)、G2/M 期細胞をセリン 10 リン酸化ヒストン H3 (Phospho-H3) で染色した。

(4) DSB および DSB 会合の観察・カウント

DSB 部位における 53BP1 蛋白質の集積は蛍光免疫染色により、顕微鏡下でいわゆる「フォーカス」として可視化できる。このフォーカスは DSB の指標としてすでに確立されている (Löbrich et al. *Cell Cycle* 2010)。そこで顕微鏡下でくっついていることが目視で確認できる複数のフォーカスを「会合している DSB」としてカウントした。なお、予

備実験の結果および先行論文から、放射線照射後生成する染色体転座の大半は、G0/G1 期に照射を受けた細胞であることが分かっていたため、フォーカスの会合は EdU(-)/Phospho-H3 (-) の G1 期の細胞で調べた。

(4) 生細胞イメージング

生細胞で DSB および細胞周期を可視化するため、DSB のマーカーとしては mCherry-BP1-2、S/G2 期のマーカーとしては mAG-Geminin を用いた。mCherry-BP1-2 はロックフェラー大学の De Lange 博士より譲受したもので、53BP1 のフォーカス形成に必要なドメインと蛍光蛋白質 mCherry の融合蛋白質である (Dimitrova et al. *Nature* 2008)。また mAG-Geminin は理化学研究所の宮脇博士より譲受したもので、S/G2 期に発現する Geminin と蛍光蛋白質 monomeric Azami Green (mAG) の融合蛋白質である (Sakaue-Sawano et al. *Cell* 2008)。本研究では BJ-hTERT 細胞に mCherry-BP1-2 および mAG-Geminin のベクターを導入し、これらの蛋白質を安定に発現する細胞 Cherry-Gem-BJ-hTERT を樹立した。Cherry-Gem-BJ-hTERT 細胞に 4 Gy のガンマ線を照射後、生細胞イメージング装置 (BioStation, Nikon) にて照射 2 時間後から 10 時間後まで 5 分間隔で細胞を撮影した。撮影後、画像を TIFF および AVI ファイルで保存し、mAG-Geminin (-) の G1 期細胞における mCherry-BP1-2 フォーカスの会合をカウントした。

(5) siRNA 処理

細胞への siRNA のトランスフェクションは Lipofectamine RNAi MAX (Life Technologies) にて行った。siRNA の最終濃度は 30 nM とした。ガンマ線照射および細胞固定は siRNA トランスフェクション 3 日後に行った。

4. 研究成果

(1) DSB 同士の会合の検出

正常ヒト線維芽細胞 BJ-hTERT に 2 Gy のガンマ線を照射後、経時的に細胞を固定し、53BP1, EdU, Phospho-H3 の蛍光免疫染色を行った。EdU(-)/Phospho-H3(-) の G1 期の細胞における 53BP1 の核内フォーカスを観察したところ、会合しているフォーカスが見られた (図 1)。会合しているフォーカスの割合は細胞ごとに異なったが、平均すると 10-20% のフォーカスが会合していた (図 2)。また会合の頻度は照射 0.5, 2, 4, 8 時間後で差は見られなかった (図 2)

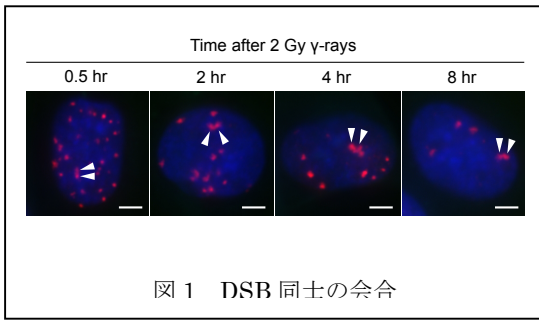


図1 DSB 同士の会合

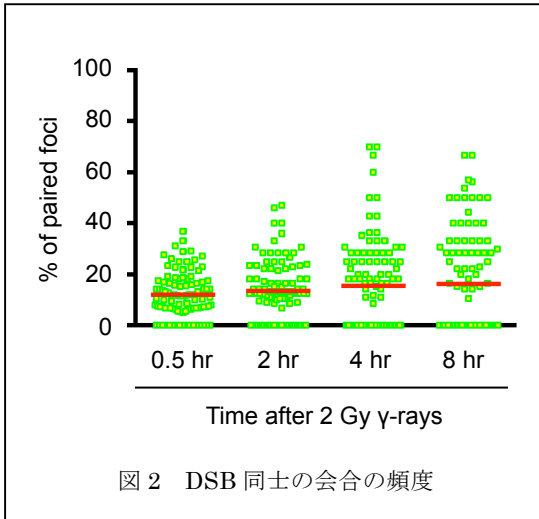


図2 DSB 同士の会合の頻度

(2) 生細胞における DSB の会合

次に生きた細胞における DSB の会合を観察した。Cherry-Gem-BJ-hTERT 細胞 (研究の方法の項参照) に 4 Gy のガンマ線を照射後、2-10 時間後の mCherry-BP1-2 フォーカスのライブセルイメージングを行った (典型的な画像を図 3 に表示)。

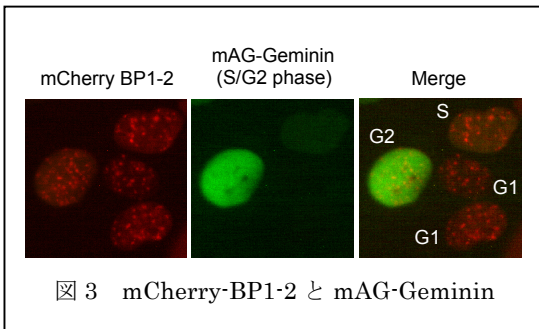


図3 mCherry-BP1-2 と mAG-Geminin

その結果、フォーカスの会合の仕方は以下の 3 種類あることが分かった。

- 1) **Dynamic pairing**
→複数の独立したフォーカスが動いて会合する (図 4 緑の矢頭)
- 2) **Static pairing**
→観察期間のはじめから終わりまでフォーカスが会合し続けている。
- 3) **Fission**
→はじめ 1 個だったフォーカスが分裂 (Fission) するように 2 個になる (図 4 ピンクの矢頭)

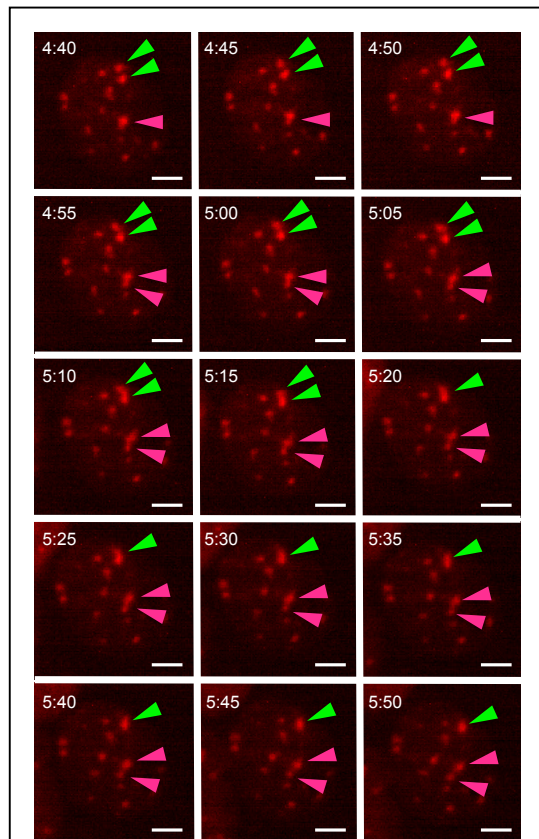


図4 mCherry-BP1-2 フォーカスの Dynamic pairing (緑) および Fission (ピンク) の例

経時的に撮影した画像を用いて詳細な解析を行った結果、フォーカス会合のうち、93% 以上は複数の独立したフォーカスが動いて会合する 'Dynamic pairing' で起こっていることが分かった (図 5)。

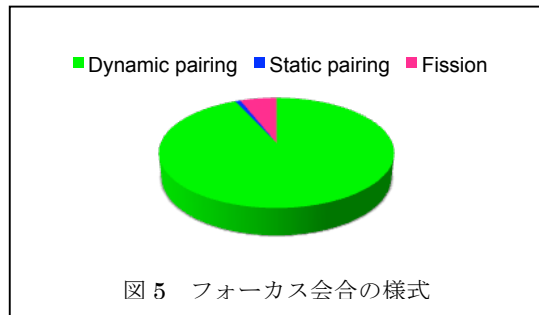


図5 フォーカス会合の様式

(3) DSB 会合頻度に影響を与える因子

先行論文における研究から、DSB の主要な修復経路のひとつである、Classical non-homologous end-joining (NHEJ) が、染色体転座の形成を抑制することが示唆されている (Simsek & Jasin, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2010)。そこで Classical NHEJ において最初に DSB 末端を認識して結合する Ku80 蛋白質の DSB 会合に対する影響を調べた。1 Gy ガンマ線照射後の Ku80 (-/-) マウス胎児線維芽細胞 (MEFs) の G1 期にお

る会合した 53BP1 フォーカスの頻度を経時的（照射 0.5, 2, 4, 8 時間後）に調べた結果、どのタイムポイントにおいても会合した 53BP1 フォーカスの頻度がコントロール細胞 (WT MEFs) と比べ、有意に高いことが分かった (図 6)。

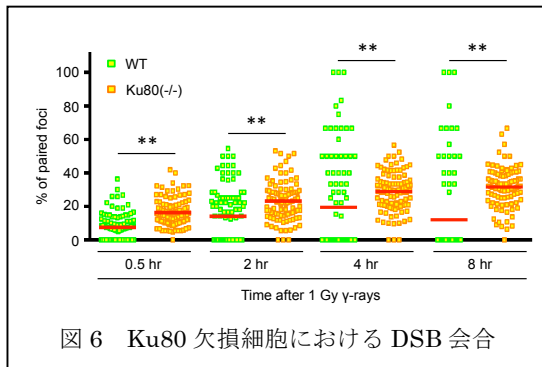


図 6 Ku80 欠損細胞における DSB 会合

次にもうひとつの重要な Classical NHEJ 因子である DNA-PKcs の DSB 会合に対する影響を調べた。その結果、1 Gy 照射 0.5, 2 時間後には差が見られなかったものの、照射 4, 8 時間後の DNA-PKcs (-/-) MEFs における DSB 会合の頻度は WT 細胞と比べ、有意に上昇していた (図 7)。

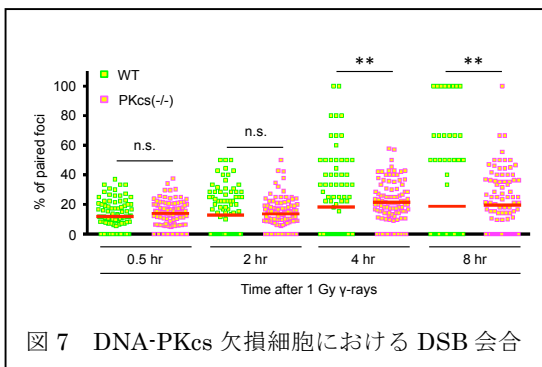


図 7 DNA-PKcs 欠損細胞における DSB 会合

私は前回の科研費の研究（若手研究 B、課題番号 21710061）において、ATM 蛋白質が放射線照射後の染色体転座頻度を抑制していることを明らかにした (Yamauchi et al. *BBRC* 2011)。そこで ATM 蛋白質の DSB 会合に対する影響を調べた。その結果、ATM 欠損細胞 (AT5BI-hTERT) における DSB 会合の頻度は、ガンマ線照射後どのタイムポイントにおいてもコントロール細胞 (BJ-hTERT) と比べ、有意に高いことが分かった (図 8)。

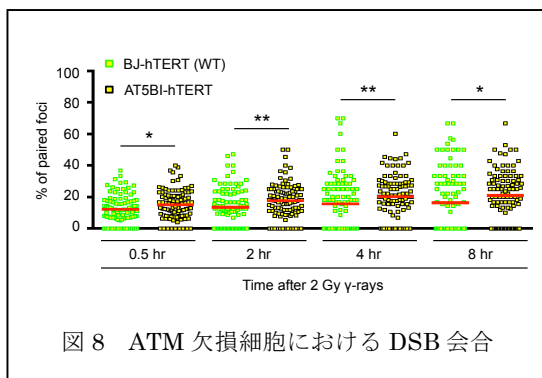


図 8 ATM 欠損細胞における DSB 会合

次に ATM 蛋白質と協力して DSB 修復に働いていることが報告されている、53BP1 蛋白質の DSB 会合に対する影響を調べた。この目的のため、DSB の指標としては mCherry-BP1-2 フォーカスを用い、53BP1 siRNA は mCherry-BP1-2 の発現を抑制しないものを用いた。その結果、予想と反対に 53BP1 をノックダウンすると、ガンマ線照射 8 時間後に DSB 会合が有意に減少するという結果が得られた (図 9)。

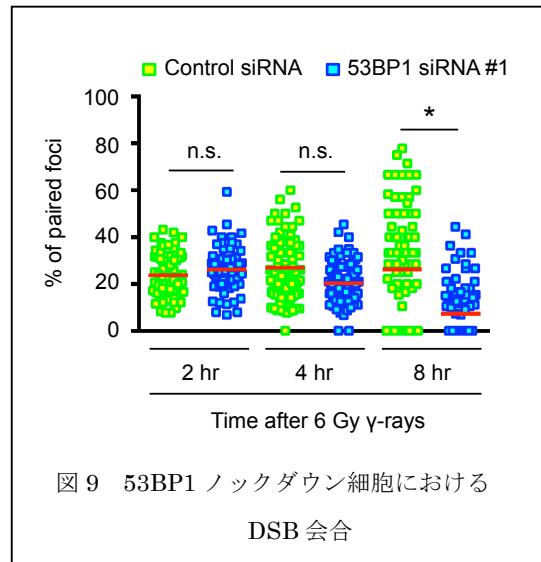


図 9 53BP1 ノックダウン細胞における DSB 会合

次に 53BP1 ノックダウン細胞におけるガンマ線照射後の二動原体染色体の頻度を調べた。二動原体染色体は転座と同じく、2 本の染色体にできた 2 個の DSB がつながりかわって起こる染色体異常である。セントロメア・テロメア FISH により二動原体染色体を検出する実験を行った結果、53BP1 ノックダウン細胞で二動原体染色体 (Dicentric) の頻度が有意に低下していることが分かった (図 10)。

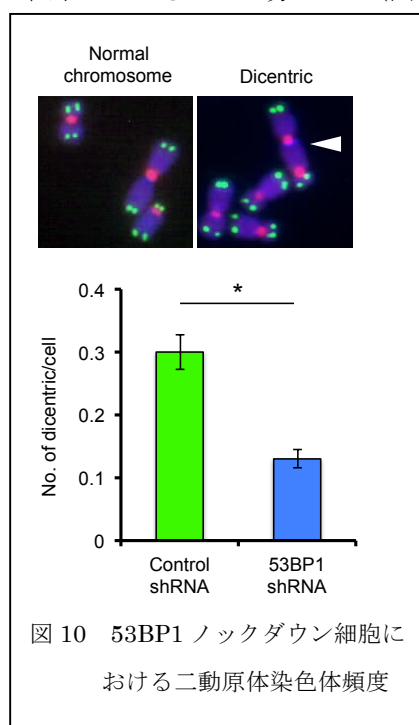
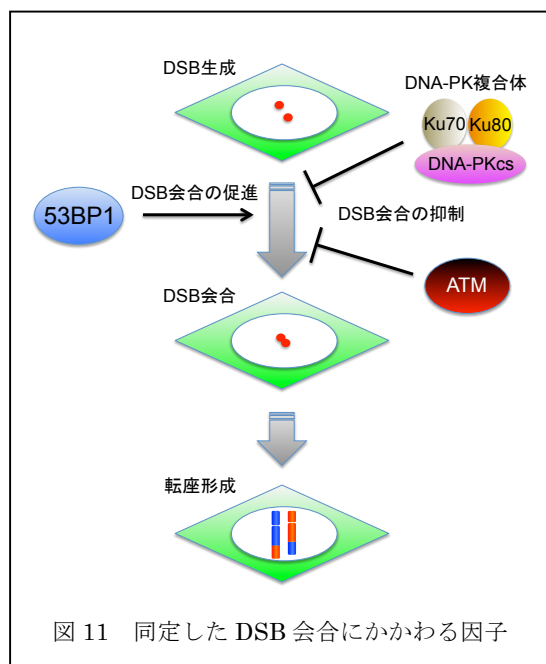


図 10 53BP1 ノックダウン細胞における二動原体染色体頻度

(4) 研究成果のまとめ

本研究では染色体転座形成の必要条件である、DSB 同士の会合に影響を与える因子を同定した。本研究で同定した因子の DSB 会合における役割を図 11 に示す。



(5) 得られた成果の国内外における位置付けとインパクト

放射線による染色体転座形成・形成抑制機構を明らかにしようとする研究は世界的に見ても少なく、理解が進んでいない分野である。本研究では、放射線照射後の転座形成の前段階である、DSB 同士の会合頻度に影響を及ぼす因子を同定した。これは DSB 同士の会合が単なる DSB の受動的な動きによるものではなく、特定の分子により能動的に制御されていることを示す知見である。DSB 会合にかかわる因子の研究はほとんどないが、2013 年の Roukos らの論文がある (Roukos et al. *Science* 341, 660-664, 2013)。本論文では DSB 会合頻度に影響を与える因子として MRE11 が示されているものの、他の因子の関与は述べられていない。本研究で得られた Ku80, DNA-PKcs, ATM, および 53BP1 が DSB 会合に関与するという知見は、未だ報告がなく、転座研究におけるインパクトは大きいと考えられる。また Ku80, DNA-PKcs, ATM, 53BP1 などの主要な DSB 修復因子が、単に DSB 修復に関わっているだけでなく、異なる複数の DSB 同士の会合に影響を与えているという本研究の知見は、修復蛋白質の新しい機能の発見であり、DSB 修復蛋白質の研究分野においても意義があると思われる。

(6) 今後の展望

本研究により、53BP1 フォーカスあるいは mCherry-BP1-2 フォーカスの会合頻度と転

座や二動原体染色体の頻度は相関することが分かった。そこでフォーカスの会合を指標に DSB の会合や転座形成の頻度に影響を与える新しい因子の同定を目指す。

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 1 件)

- (1) 山内基弘、三浦美和、松田尚樹、放射線被ばく後にできる DNA 損傷に対するヒト細胞の防御機構、日本放射線安全管理学会誌 査読有 第 13 巻 1 号 2014、79-83
DOI: 10.11269/jjrsm.13.79

[学会発表] (計 5 件)

- (1) 山内基弘、DNA 二本鎖切断同士の会合に影響を与える因子、第 37 回日本分子生物学会年会、2014 年 11 月 25 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- (2) 山内基弘、DNA 二本鎖切断同士の近接および染色体転座頻度に影響を与える因子、日本放射線影響学会第 57 回大会、2014 年 10 月 3 日、かごしま県民交流センター、鹿児島県鹿児島市
- (3) 山内基弘、DNA 二本鎖切断間の会合および染色体転座頻度に影響を与える因子、第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市
- (4) 山内基弘、染色体転座形成における p53 binding protein 1 (53BP1) の関与、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 5 日、神戸ポートアイランド、兵庫県神戸市
- (5) 山内基弘、ATM による染色体転座抑制機構、第 72 回日本癌学会学術総会、2013 年 10 月 5 日、パシフィコ横浜、神奈川県横浜市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山内 基弘 (YAMAUCHI, Motohiro)
長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教
研究者番号：60437910

(2) 研究分担者

該当なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

該当なし ()

研究者番号：