

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：85401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25550038

研究課題名(和文)放射線により生じる修復不能なDSBの特異的定量法開発

研究課題名(英文)Development of new methods that specifically detect and measure radiation-induced unrepairable DSBs

研究代表者

野田 朝男(NODA, Asao)

公益財団法人放射線影響研究所・分子生物科学部・副部長

研究者番号：40294227

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：修復不能な損傷を特異的に検出・定量する技術開発は、過去に被ばくを受けた組織・細胞を検査する新しいバイオマーカーになると期待される。本研究では、いつまで経っても修復されないゲノム損傷を持つ細胞の特徴付けを行い、修復不能損傷に特異的な結合タンパク質の同定を試みた。その結果、これらの細胞では、核膜構造の異形化と細胞の早期老化形質発現が起こる事を確認した。また、修復不能なゲノム損傷を持つ細胞で特異的に発現する遺伝子や蛋白質を網羅的に解析した結果、2つの特徴的な蛋白質を同定した。いずれも放射線被ばくにより、ATMキナーゼ依存性にリン酸化される蛋白質であり、損傷部位に局在することが確認された。

研究成果の概要(英文)：For the detection and measurement of cells bearing unrepairable DNA damages in the past-irradiated cells and tissues, we have been working on the development of new biomarkers that characterize the unrepairable damages (DNA DSBs). In this study we have found that the cells bearing the damages exhibited dysfunctional nuclear envelope structure and premature senescence. This phenotype was much more advanced in the progeria (premature aging syndrome) cells after the irradiation. By the proteome and transcriptome analyses we have identified two candidate genes (proteins) from cells carrying unrepairable DSBs. Since both proteins had ATM kinase target sequences we made antibodies against the phosphorylated forms of the proteins, and found that they showed ATM dependent phosphorylation and accumulation at the damages.

研究分野：環境・放射線影響科学

キーワード：放射線損傷 ストレス応答 DSB unrepairable damages

1. 研究開始当初の背景

(1) 放射線によるゲノム障害が原因で細胞障害が起こり、これが組織・器官の個別障害へとつながり全体としての生体影響へと発展する。これまでの研究は、生体影響に大きなウエイトを占めるゲノム損傷（具体的には放射線で生じる DNA の二本鎖切断：DSB）に対処する機構、すなわち修復やアポトーシス、あるいは異常修復の結果としての突然変異誘発機構の解析が主流であった。しかし近年、修復されずにいつまでも細胞内に留まり続ける損傷もあることが明らかとなり、これらの影響についても考慮する必要が出てきた。ゲノム損傷が原因で細胞死が起こる場合と修復の失敗の結果として突然変異が起こる場合を除くと、生体影響の原因は修復不能な損傷が及ぼす生物影響であると結論して良い。生物個体の大部分は分化して機能する長寿命細胞である事を考えると、これらの細胞に生じる修復不能な損傷の長期にわたる影響を考える必要がある。

(2) 我々はヒト正常線維芽細胞やマウスへの照射後、数ヶ月以上経っても消え去らない、つまり修復不能な DSB がある頻度で出現すること、これらの損傷を抱え込んだ細胞は早期老化の形質を発現するようになることを見いだした(J. Cell Sci. 125:5280-5287, 2012)。過去の文献を探すと、老化研究者等からは以前からこのような損傷が老化の原因のひとつとして想定されていたこともわかった(Sedelnicova ら, Campisi ら)。

2. 研究の目的

(1) 我々はこの修復不能な DSB 損傷の生化学的な解明を目指す。これまで、修復不能な DSB が存在することは想像できても、修復可

能な DSB と生化学的に区別して定量することは世界的にも誰も成功していない。これが可能となれば、放射線被ばくの長期的影響について、組織中の修復不能な DSB 数から考えることが初めて可能になる。過去に被ばくを受けた組織を用いての再度の被ばく線量推定も可能となる。

(2) 修復不能な DSB の生化学的特徴付けから、修復不能な DSB、あるいはそれを保持する細胞を特異的に検出する事が可能なバイオマーカーを同定する。これにより、過去に被ばくを受けた組織や細胞の検出を試みる。

3. 研究の方法

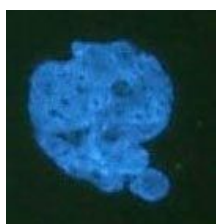
(1) ヒト正常線維芽細胞に 4~6 Gy 照射後 2 週間以上培養すると、どの細胞核にも 1~2 個の巨大な repair foci が観察される。Go 期で培養を続ける限りこの foci は居残り(これまで 1 年以上の継続観察)これが修復不能な DSB を反映していると考えられる。まず、修復不能な DSB を長期に保持する細胞の特徴付けを行う。これは核膜やクロマチン構造の変化を指標とする。

(2) この修復不能な repair foci と、照射直後に多数生じて 1~2 日以内にほとんど消えてしまう修復可能な repair foci の生化学的な識別を行う。具体的には、構成タンパク質の解析、プローブを用いた repair foci の釣り上げ、修復不能 foci 全体を抗原としたモノクローナル抗体作製法を用いる。修復不能な repair foci に特異的なタンパク質の同定およびそれに対する抗体を作製した後は、これらをプローブとして被ばく組織にいつまでも残る修復されない傷の定量を行う。

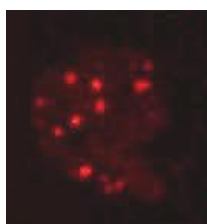
4. 研究成果

(1) 修復不能な DSB を持つに至った細胞の特徴付け。

修復不能な DSB を持つ Go 期ヒト線維芽細胞を長期に観察し続けた結果、老化形質(SA-gal)の発現と共に、核膜構造の異形化(異常)が顕著に見られる事が明らかとなった。以下の図は 12Gy 照射後一ヶ月培養した細胞の核構造と巨大な repair foci (53BP1)である。



細胞核(DAPI)



repair-foci

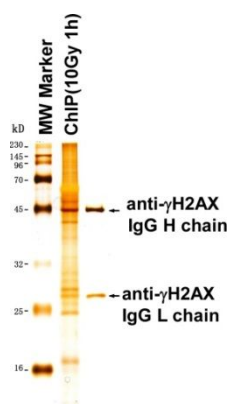
このような核膜構造異形化の典型は、ヒト早老症遺伝病であるハッチンソン・ギルフォード症候群(HGPS)でよく知られていることから、HGPS細胞を用いて核膜構造の異常と放射線で生じる修復不能な DSB の相関を解析した。その結果、培養早期から発現する核膜構造の異形化と細胞老化の促進に伴い、HGPS細胞では修復不能な DSB が自然発生している事、さらにこれは放射線照射で増大する事が明らかとなった。HGPSでの核膜構造の異形化の原因は変異型ラミン A 蛋白質の蓄積であるとされるので、核膜ラミンが修復不能な DSB の最終的な局在地ではないかと考え直接的な会合の有無を検証したが、これについては明確な結論は出なかった。これより、核膜ラミンの蓄積と修復不能な DSB とは間接的な影響関係があり、最終的には両者の働きで細胞を早期に機能不全・老化へと導くと結論し論文を発表した(Genes and Environment 37:13, 2015)

(2) 修復不能な DSB を持つ細胞に特徴的な遺伝子発現を expression array を用いた網羅的スクリーニングにて探索する(transcriptome 解析)。

Go 期ヒト正常線維芽細胞に 10Gy の X 線を照射して 1 ヶ月培養した。この状態では全ての細胞に修復不能な DSB が存在する事を確認後、Agilent Expression Array にかけて、非照射細胞との遺伝子発現の相違をヒトの全ての発現遺伝子について調べた。10Gy1 ヶ月の細胞側で特徴的に発現が高まっている遺伝子群を選別し、その中から核移行シグナル、クロマチン結合ドメイン、典型的なストレス応答ドメインの有無でさらに選別して候補遺伝子(蛋白質)を絞り込んだ。その結果、クロモドメインを持つ蛋白質、ヒストンバリエーション類似蛋白質、DNA 結合性ドメインを持つ蛋白質、核膜構造・核膜孔構成蛋白質がさらなるスクリーニング候補として残った。これらの中から、第一段階として ATM キナーゼの標的となるアミノ酸配列ドメイン(XXXSQXXX)を持つ蛋白質を今後の解析に用いることとした。

(3) H2AX や Rap80, BRCC36 をプローブとした免疫沈降、FLAG-Tag pull down, ChIP アッセイによる DSB 結合性の蛋白質の探索。

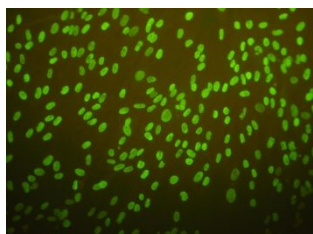
上記 10Gy1 ヶ月の細胞から核蛋白質粗抽出液を作製し、H2AX 抗体や、FLAG-Tag-Rap80 を bait としたクロマチン免疫沈降実験(ChIP)を行い、修復不能な DSB-repair-foci に結合している新規蛋白質因子の探索を行った。以下はその結果である。銀染色にて 2, 3 の特徴的な蛋白質バンドが観察された。



これらの蛋白質の同定を質量分析にて試みたが、現時点では検出感度、精製度共に不十分であり、新たな因子は同定できなかった。

(4) 修復不能な DSB を持つ細胞由来の全蛋白質、あるいはクロマチン画分を用いたマウスモノクローナル抗体作製。

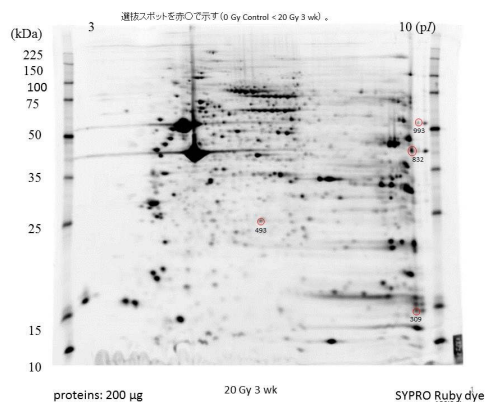
上記 10Gy1 ヶ月の細胞から核蛋白質粗抽出液を作製し、これを抗原として Balb/c マウスを免疫刺激し、B 細胞分離後に通常の方法にてハイブリドーマを作製した。ハイブリドーマ細胞コロニーを合計で数千個スクリーニングし、非被ばく細胞とは反応せず 10Gy1 ヶ月の細胞のみと反応するマウスモノクローナル抗体を産生する細胞クローンを探索した。その結果、照射後の細胞核と強く反応するモノクローナル抗体は多数得られたが(以下の図)、修復不能な DSB を持つ細胞成分にのみ特異的に反応する抗体がこれまでには得られなかった。



ハイブリドーマ培養上清による照射細胞核染色

(5) 修復不能な DSB を持つ細胞由来の全蛋白質、あるいは全核蛋白質を用いた二次元蛋白質 (transcriptome) 解析。

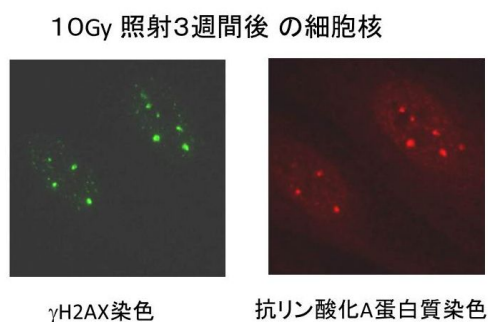
10Gy1 ヶ月の細胞由来の全蛋白質、あるいは細胞核由来の全蛋白質の二次元電気泳動による網羅的解析(proteome 解析)を行い、修復不能な DSB を持つ細胞に特徴的な蛋白質スポットの検出および、質量分析による蛋白質同定を試みた(以下の図)。その結果、4つの候補蛋白質が出現し、その同定ができた。



(6) 候補遺伝子 (蛋白質) の評価。

以上、これまでの多面的なアプローチの結果から、3種類の蛋白質が候補として残った。これらはいずれも、ATM kinase によるリン酸化標的のアミノ酸配列 (XXXSQXXX) を持っていたので、この SQ 配列を含む約 12 アミノ酸によるリン酸化ペプチド (XXXpSQXXX) を有機合成し、抗原として用いることにより、抗ウサギ・抗標的蛋白質リン酸化ペプチド抗体 (ポリクロー) を作製した。3種類の抗体が得られたので、これらを用いて修復不能な DSB を持つ細胞を染色してみたところ、そのうちの2つは修復不能な DSB-repair-foci と強く反応した(以下の図)。蛋白質 A、蛋白質 B とも核蛋白質であり、A は転写因子関連ドメイン、B は核膜結合蛋白質ドメインを持つことから、これらは新規の repair-foci 結合性蛋白質である事が

明らかとなった。



今後の作業工程としては、これらの蛋白質の DSB 結合（集積）機構および、その生物学的役割の解明が必要である。また、被ばく線量推定への応用の可能性についても検討する必要があるが、ここまでで3年間費やした。DSB repair-foci に集積する事が知られている因子の多くはストレス応答・細胞周期チェックポイントシグナル因子であり、そのうちの BRCA1 や NBS1、ATM などは典型的な癌抑制遺伝子であることから、今回得られた蛋白質因子も DSB 修復の重要な役割を担っている可能性がある。この解明は今後の課題である。

引用文献

Noda A et al. Unrepairable DNA double strand breaks that are generated by ionising radiation determine the cell fate of normal human cells. *J. Cell Sci.*, 125:5280-5287, 2012.

Sedelnikova OA et al. Senescing human cells and ageing mice accumulate DNA lesions with unrepairable double-strand breaks. *Nat Cell Biol* 2004, 6(2):168-170.

Freund A et al. Lamin B1 loss is a senescence-associated biomarker. *Mol*

Biol Cell 2012, 23(11): 2066- 2075.

5. 主要な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Noda A., Mishima S., Hirai Y., Hamasaki K., Landes RD., Mitani H., Haga K., Kiyono T., Nakamura N., Kodama Y. Progerin, the protein responsible for the Hutchinson-Gilford Progeria Syndrome, increases the unrepaired DNA damages following exposure to ionizing radiation. *Genes and Environment* 査読有 37:13 (1-12), 2015
DOI:10.1186/s41021-015-0018-4

[学会発表] (計 5 件)

Sekihara K, and Noda A. Hypertonic treatment increases radiation-induced unrepairable DNA damages in cultured human cells. International Congress of Radiation Research, May 26, 2015 Kyoto International Conference Center (Kyoto)
日高征幸、野田朝男、児玉喜明、ヒト SIRT1 の活性化は放射線誘発の修復不能な DSB を増幅する。日本放射線影響学会第 57 回大会、2014年10月1日、鹿児島県民交流センター（鹿児島市）
野田朝男、いつまで経っても修復されない DSB の生物学。日本放射線影響学会第 57 回大会シンポジウム、2014年10月1日、鹿児島県民交流センター（鹿児島市）
野田朝男、平井裕子、放射線で生じる修復不能な DSB の特徴付けの試み。日本放射線影響学会第 56 回大会、2013年10月19日、ホテルクラウンパレス青森（青森

市)

Noda A et al. Progerin, the causal protein for the accelerated premature aging in humans, enhances levels of unrepaired DNA damages following genotoxic stress insult. Annual meeting of Environmental Mutagenesis and Genomics Society, USA, Sep 21-25, 2013 Monterey, CA, USA.

[図書、産業財産権等]

なし

[その他]

ホームページ等：

<http://www.ref.or.jp/library/rr/rr1305.pdf>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

野田 朝男 (NODA, Asao)

公益財団法人放射線影響研究所

分子生物科学部・副部長

研究者番号：40294227

(2) その他、研究分担者等

なし