

重粒子線照射に特異的なタンパク質リン酸化反応の探索

[1] 組織

代表者：矢島 浩彦
 (放射線医学総合研究所 重粒子セ)
 対応者：安井 明
 (東北大学加齢医学研究所)
 分担者：藤森 亮
 (放射線医学総合研究所 重粒子セ)

研究費：物件費 20万円

[2] 研究経過

放射線が誘発される損傷の中でも DNA 二本鎖切断 (DSB) は重篤な損傷であり、重粒子線治療における癌細胞殺傷効果も DSB 誘発が主たる要因になっていると考えられる。X 線と比べると、重粒子線は線エネルギー付与 (LET: Linear Energy Transfer) が高いため、イオン粒子の飛跡に沿って短い距離の間に多くのエネルギーを放出する (高 LET)。X 線やガンマ線は低 LET 放射線である。そのため、重粒子線によって生じた DSB は近傍に塩基損傷などが同時に生じている場合が多く、「複雑な損傷」などと呼ばれる。この様な違いが重粒子線に特異的な生物効果を生むと考えられ、同じ線量でもアポトーシスや突然変異、染色体異常の頻度は X 線とは異なる。しかしこれら生物学的エンドポイントの違いは細胞側の応答反応が進んだ後の結果であり、照射によって生じた損傷構造の違いに応じて実際に分子レベルでどの様に異なった反応が起き、それがどの様にしてエンドポイントの違いへと繋がっているかは未だに明らかではない。DNA 損傷応答 (DDR: DNA Damage Response) としては DNA 修復や細胞周期チェックポイントが知られているが、さらに両者に影響を与える要素として近年ではクロマチン構造の変換も着目されている。LET の差によってこれらの初期反応にどのような違いが生じるかを明らかにする事で、初めてエンドポイントの違いがどのように生じるかが解き明かされると考えられる。

これまでに研究が進んでいる重要な初期反応は、

タンパク質のリン酸化やユビキチン化、アセチル化などの翻訳後修飾である。中でもリン酸化は多くの反応経路で他の修飾を制御しており、最上流で機能している。これまでに多くの知見が得られているが、そのほとんどが X 線 (ガンマ線) を用いて行われたものであり、重粒子線照射に対する初期反応の研究は極めて乏しい。こうした観点から本研究の目的は、重粒子線によってもたらされる DNA 損傷に特異的なリン酸化反応を X 線と比較しながら明らかにすることである。こうした分子レベルでの解析を着実に進める事は、増感標的分子の探索を含めた重粒子線治療の高度化や、多くの重粒子線を含む宇宙放射線に対する防護のための基礎研究として重要であると考えられる。

ヒト細胞において主要な DSB の修復系は非相同末端結合 (NHEJ: Non-Homologous End Joining) と相同組換え (HR: Homologous Recombination) によるものである。重粒子線によって生じる DSB は NHEJ による修復の効率が低いことが知られており、おそらく「複雑な DSB」が直接結合に不都合な構造であるためと考えられるが、実際に両修復経路の寄与のバランスが X 線と比べてどの様に違っているか、詳細な検討はなされていなかった。そのため今年度は、まず各修復経路のリン酸化シグナルの

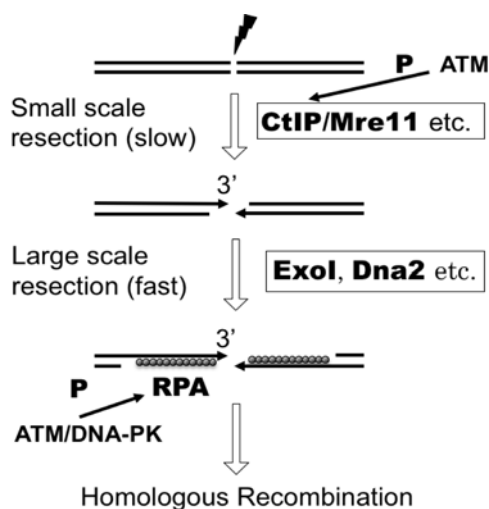


図1. HRの初期過程、DNA末端リセクションの模式図。P: リン酸化反応。

検証

から始めた。HR の初期過程は DNA 末端リセクションとして知られており、そこで中心的な役割を果たすことが明らかになっている CtIP のリン酸化のレベルと、その後生じる RPA のリン酸化レベルをリセクション活性の指標として検証した (図 1)。NHEJ 経路の指標としては、主要な因子として知られる DNA-PK の自己リン酸化を用いた。

重粒子線の照射には放医研の施設、HIMAC (Heavy Ion Medical Accelerator in Chiba) を利用し、放医研にてウェスタン・ブロットや蛍光抗体法による細胞染色などを行った。研究計画に関しては、必要に応じて電子メールによる議論をした他、学会会場にて直接会い議論を重ねた。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

ヒト細胞に重粒子線を照射すると、同じ線量では X 線よりはるかに多くの CtIP と RPA のリン酸化が観察され、より多くの HR へと進行するシグナルが実際に流れていることが初めて分子レベルで確認できた。炭素線と鉄線を比べると、より LET の大きな鉄線で炭素線よりも強いシグナルが観察され、LET に依存して HR へのシグナルが上昇していくことが示唆された。また、これらの反応が完全に ATM 依存的事であること、Brca1 やユビキチン結合因子 RNF の経路が関与していることを示す結果も得られた。

蛍光抗体法によって、抗 RPA 抗体を用いても抗 pRPA 抗体を用いても、明瞭なリセクションの活性が観察できた。細胞周期マーカーを使った実験により、X 線同様に重粒子線照射後でもリセクション反応は S/G2 期に限られることが確認できた。一方で X 線と異なり、ヘテロクロマチン内に限らずユークロマチンに生じた DSB でもリセクション反応を受けていることが明らかになった。

(3-2) 波及効果と発展性など

本研究により、重粒子線によって生じる複雑な DSB が特異的に誘発する強いリン酸化反応が明らかになった。どのようにして高い効率でリセクション活性を引き起こすのかを明らかにすることが、今後の重要課題の一つとなる。さらに、重粒子線照射直後に CtIP 分子が多様な修飾を受けていることが本研究で明らかになっており、まずは質量分析によってその修飾の実態や機構を明らかにしていく計画である。また、リン酸化型 CtIP に特異的に結合する

新規タンパク質を探索するため、必要なプラスミド構築などを共同研究によって始めている。新規の因子が発見・同定できれば、DSB 認識から修復経路の選択へと至る機構の解明に大きく寄与すると考えられ、重粒子線の研究領域のみならず、DDR 研究全般への波及効果は大きい。放医研内組織の「国際オープンラボラトリー」でも本研究を推進し、海外著名研究者との共同研究も展開していく計画である。

また、重粒子線損傷の修復においては HR 経路の寄与が多きことが明瞭になったため、この経路が特に重粒子線治療で有効な増感標的となる可能性が示された。臨床への応用を展望した基礎研究への発展も期待される。

[4] 成果資料

本研究の成果は放射線影響学会や分子生物学会などで発表しているが、論文は未発表である。早い時期での論文投稿へ向けて、研究を進めている。