

## DNA 損傷修復タンパク質の UV レーザー・粒子線・X 線など 線種の違いによる細胞内挙動の分析

### [1] 組織

代表者：上坂充

(東京大学大学院工学系研究科)

対応者：安井明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

藤澤寛 (東京大学大学院工学系研究科)

研究費：物件費 13 万円，旅費 7 万円

### [2] 研究経過

我々の細胞内に存在する DNA は常に活性酸素・紫外線・放射線などの内外からの刺激に曝されており、DNA 損傷に起因するゲノム不安定性は、老化や発がんを引き起こす要因と考えられている。そのため細胞内にはこれらの DNA 損傷を修復する機能が備わっており、関連するタンパク質により速やかに修復されゲノム恒常性を維持している。DNA 損傷の中でも特に重大なのが DNA の二本鎖切断 (Double Strand Break: DSB) であり、DSB の修復経路は主に二つに分類される。近接する二つの DNA 切断末端を繋げる非相同末端結合 (non-homologous end-joining: NHEJ) と、姉妹染色分体を鋳型にして修復する相同組換え (homologous recombination: HR) であるが、このうち HR 修復は DNA 複製の途中に生じた複製フォーク切断の修復にも必要であり、高等動物細胞の増殖には必須の機能である。HR 修復の過程において、切断末端の一本鎖の削り込みによって生じた一本鎖 DNA 領域に RPA が結合し、続いて RPA が RAD51 へ置き換わり姉妹染色分体への一本鎖 DNA の侵入が進んでゆくことはよく知られている。しかしこの過程における各タンパク質の具体的な挙動に関しては不明な点が多く、損傷の構造や絶対数によって異なる進行を示す可能性がある。そこで、この過程で働くタンパク質 (RPA, RAD51 など) に着目し、DNA 損傷部位への集積および消失等を時間経過とともに追跡することで、異なる損傷構造や損傷量によって反応の

進行に違いが生じるかを検証する。

本研究の目的は、異なる放射線を用いて、様々な損傷量を与えた場合の HR 経路のタンパク質の挙動を比較・分析することにより、線種や線量に応じた DNA 修復過程の制御機構を解明することである。

以下、研究活動状況の概要を記す。東北大学加齢医学研究所 (加齢研) において GFP 融合 RPA70, DsRed 融合 RAD51 等のプラスミドベクターを作成して頂いた。ライブセルイメージングは加齢研の生細胞核局所照射装置を用いた。炭素線や X 線の照射実験や解析は独立行政法人放射線医学総合研究所において行った。6 月 24 日から 6 月 29 日にかけて加齢研を訪問し、生細胞核局所照射装置を用いた実験を行った。その際、実験結果に関する意見交換や情報収集を行った。また必要に応じて E メールによる研究内容の検討も行った。

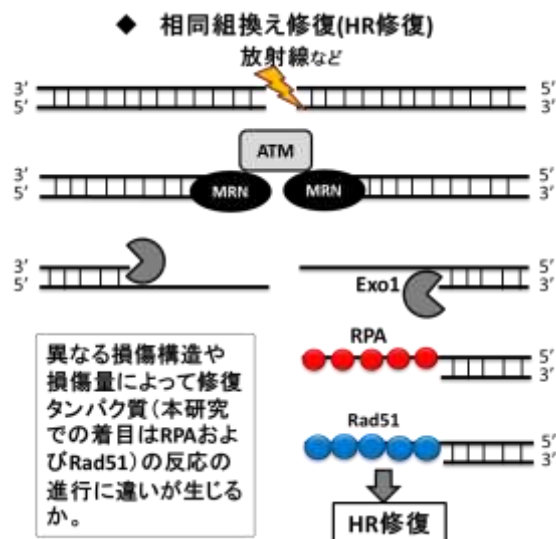


図1 相同組換え修復において、本研究で着目したタンパク質が働く箇所を示した図

### [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。

まず第1に、DNA 二本鎖切断の HR 修復に関与するタンパク質 (RPA, RAD51) に着目し、放射線照射後のフォーカスの時間変化を調べたところ、炭

炭素線270MeV/nとX線200kVpでは一部異なる挙動を示唆する結果が得られた。実験方法としては、チャンバースライドに播種した正常細胞に炭素線とX線を照射し、RPAとRAD51タンパク質を蛍光免疫染色で検出し、蛍光顕微鏡を用いて生じたフォーカスの数の計測を行った。X線ではRPAとRAD51のフォーカス数は1~2時間でピークを迎え、時間経過と共に減少した。炭素線ではRAD51はX線と同じような挙動を示すが、RPAは15時間経ってもフォーカスは残る結果となった。

そこで第2として、加齢研にある生細胞核局所照射装置を用いて、蛍光免疫染色によるDNA損傷箇所でのRPAとRAD51の共局在の観察、およびライブセルイメージングを行った。まず蛍光免疫染色法を用いた実験では、ガラスボトムディッシュに培養したU2OS細胞に対して405nmレーザーを照射し、1, 2, 4, 8, 15時間後に固定・染色を行った。図2に示すように1時間後で共局在が観察され、15時間後においても観察された。

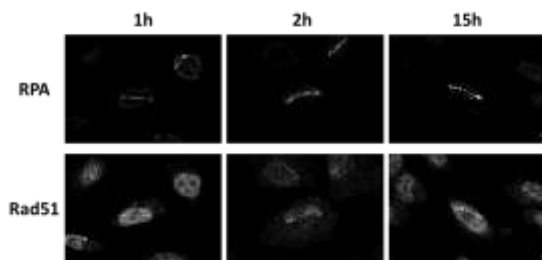


図2 蛍光免疫染色による各時間におけるRPAとRAD51の共局在の観察

ライブセルイメージングでは、ガラスボトムディッシュに培養したU2OS細胞に、GFP融合RPA70およびDsRed融合RAD51をトランスフェクションした。生細胞核局所照射装置を用いて405nmレーザー照射し、そのまま続けて撮影を行った。局所照射箇所へのタンパク質の集積は、時間変化に伴い集積する様子がGFP-RPA70では観察出来た。しかし、DsRed-RAD51では検出困難であったため、期待していたRPAからRAD51への置き換わる様子の観察は出来なかった。(図3)。細胞質に分布したRAD51を核に移行させること、観察する細胞の細胞周期を特定すること、観察時間間隔を調節することが今後の課題である。

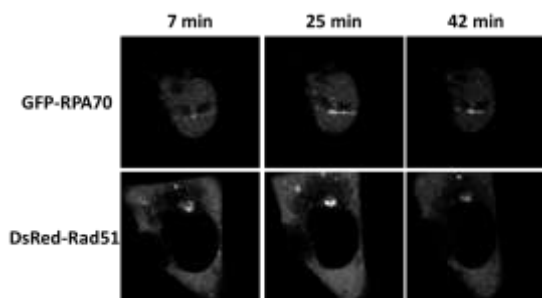


図3 GFP-RPA70とDsRed-RAD51をダブルトランスフェクションした時のライブセルイメージング

### (3-2) 波及効果と発展性など

どのようなDNA損傷がどのような修復経路によって修復されるか、また修復の過程でどのような仕組みによって損傷の質や量に対応した制御がなされるか、これらのメカニズムの解明はそれ自体が生命科学研究として重要である。さらにその結果は、癌の化学治療や放射線治療の飛躍的向上のために大きな意義を持っており、合成致死性を利用した癌治療へと繋がる。本研究による成果も、合成致死をはじめとするさらに高度な化学放射線治療への応用に繋がることが期待できる。

本共同研究により大学間での交流および研究所との交流が深まり、研究者、特に若手研究者にとって貴重な経験となった。現在、申請者の研究室において小型加速器を応用したナノサイズビーム細胞照射装置を開発中であり、本共同研究結果の知見を、将来の新システムの開発と利用に役立てることが出来ると考えている。

### [4] 成果資料

本共同研究による論文発表等の成果はまだない。