

課題番号 34

DNA二本鎖切断の修復反応における新規機構の研究

[1] 組織

代表者：矢島 浩彦
(量研機構 放射線医学総合研究所)

対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)

分担者：
菅野 新一郎 (東北大学加齢医学研究所)

研究費： 35万円

[2] 研究経過

X線等に比べると、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)。そのため、重粒子線によって生じたDNA二本鎖切断(DSB)は近傍に複数の損傷が同時に生じている場合が多く、complex DSBなどと呼ばれる。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)と相同組換え(HR)によるものだが、complex DSBはNHEJによる修復の効率が低いことが知られている。代表者らは、複雑なDSB構造はHRの初期反応として知られるDNA end resectionを誘発する要因となる事を明らかにし、その過程の重要因子の一つであるCtIPが重粒子線照射で高度にリン酸化される事を示した。また、G1期細胞でもヒト細胞はcomplex DSBに対してCtIP依存的なresection活性を示すことを明らかにした。本研究の目的は、DSB修復において重要な機能を持つCtIPに着目し、その働きを解明する事で修復過程の新しい機構を明らかにする事である。これまでに、resectionの始動後にもCtIPが何らかの役割を担っている可能性を見出している。さらに、resectionによって生じる一本鎖DNAがATR活性化の構造基盤となるため、高LET線照射を受けた細胞ではATR依存的なG2/Mチェックポイントが高度に活性化していることを確認している。ATR活性化によって高LET線に特有な細胞運命シグナルが機能している可能性についても検証を進めた。共同研究の遂行に關

しては、通常の電子メールでのやり取りの他に代表者が加齢研を訪問して議論をした。さらに学会参加時にも議論を重ねた。研究材料のやりとりなど、密接な共同研究を遂行している。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

CtIP分子の相互作用タンパク質を解明するために、加齢研においてプロテオミクス解析を進めた。照射前後のヒト細胞から内在性CtIPを免疫沈降させて相互作用タンパク質を分離し、質量分析による解析を試みた。CtIPは、放射線照射後にリン酸化制御の他にユビキチン化による複雑な分解制御も受けている。そのために照射後のサンプルからの沈降に難点があり、まず非照射サンプルを用いて相互作用タンパク質を解析した。その結果、CtIPと共に沈降する多くの相互作用タンパク質候補を同定することが出来た(図1)。その中には、いくつものRNA代謝タンパク質が含まれていた(タンパク質名は未公表)。近年の研究により転写等のRNA関連活性とDSB

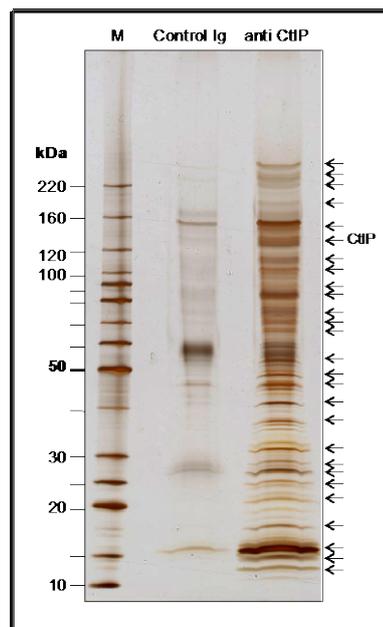


図1. 抗 CtIP 抗体によって核画分から免疫沈降された CtIP と相互作用タンパク質。

修復経路選択との関連が注目されており、本研究の結果は CtIP がそうした反応の制御に関与している可能性を示唆する興味深いものだと考えられる。

一方、修復経路選択が resection と ATR 活性化を介して細胞運命に影響を及ぼしている可能性を検証するため、p53 が ATM と ATR によって異なった制御を受けることが示されている MCF7 細胞 (ヒト乳癌由来) を用いて解析を進めた。MCF7 細胞でも高 LET 重粒子線照射によって高度に resection 反応が惹起され、LET と線量に依存した形で ATM 活性に依存しない G2/M チェックポイントが活性化していた。また、X 線に比べて高い頻度で細胞老化が誘発されていた (図 2)。

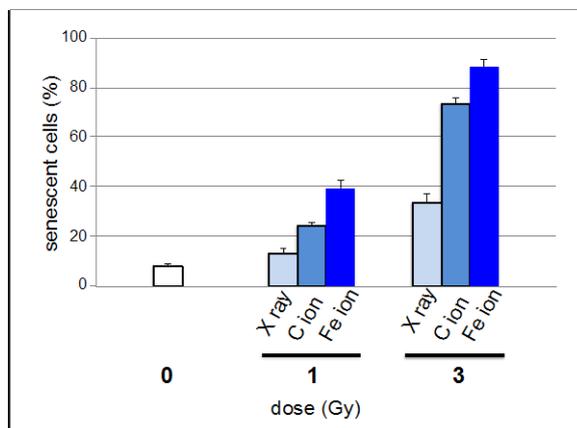


図 2. 放射線核種による細胞老化誘導能の違い。
(C ion: 炭素線 70 keV/ μ m; Fe ion: 鉄線 200 keV/ μ m)

さらに、p53 依存性に転写されることが知られている細胞老化、細胞死制御因子の発現量変動を定量 PCR (qPCR) によって検証したところ、LET 値による差が見られた (未公表)。この結果は、complex DSB に対する各修復経路の修復能とは別に、ATR 活性化による細胞運命の変化が起きている可能性を示唆している。

(3-2) 波及効果と発展性など

これまで、DSB 構造の複雑さが修復経路選択に影響を及ぼす重要な要因であることを示してきた。本研究は CtIP の新規の機能や制御機構、関連因子の解明に発展するものである。DSB 修復経路選択から細胞運命へとつながるシグナルの新しい流れを明らかに出来れば、この研究領域における新しい切り口となり波及効果は大きい (図 3)。また本課題の成果は、高齢化社会において低侵襲の先進的なガン治療として期待される重粒子線治療の高度化にも貢献す

ることができると同時に、高 LET 線を多く含む宇宙線による生物影響研究の基礎としても重要な役割を果たすことが出来ると考えられる。

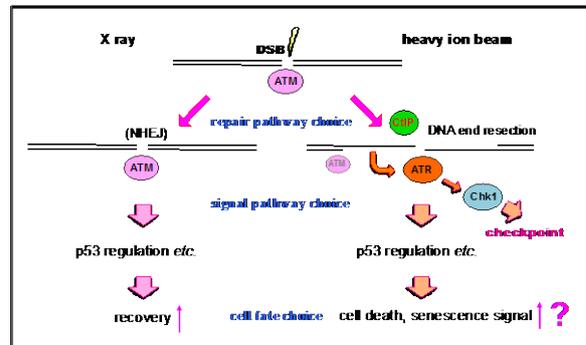


図 3. DSB の質の違いから修復経路選択を経て細胞運命の違いまでを示すモデル。

[4] 成果資料

学会発表

(1) 矢島 浩彦、劉 翠華、薛 蓮、中島 菜花子、河合 秀彦「DNA 二本鎖切断の修復経路選択と細胞応答」日本放射線影響学会 第 59 回大会。(広島市) 2016.10.26~28

(2) 矢島 浩彦、劉 翠華、薛 蓮、中島 菜花子、河合 秀彦「DNA end resection の誘発と細胞の応答」第 39 回日本分子生物学会年会。(横浜市) 2016.11.30~12.2

(3) 中島 菜花子、矢島 浩彦「休止期細胞の DNA 修復機構」第 19 回癌治療増感研究シンポジウム。(奈良市) 2017.2.3~4