

課題番号 94

突然変異蓄積を抑制する DNA 修復の制御メカニズムの解析

[1] 組織

代表者：柳原 晃弘

(東北医科薬科大学医学部)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 3 万円

[2] 研究経過

ゲノム DNA を安定的に維持することは、健康にとって、また生命の維持にとって重要である。ゲノム DNA は常に損傷を受けているが、その都度修復されており、そのため DNA は安定に保持されている。しかし、DNA 修復機構は DNA を化学的に切断・結合する過程を含むため、誤った生化学反応による突然変異生成のリスクも孕んでいる。生命は、このような誤りのリスクを極力減らすように進化してきたが、その分子メカニズムについて十分には理解されていない。

DNA 二重鎖切断 (DSB) は最も重篤な DNA 損傷であり、その修復は主に非相同末端結合 (NHEJ) と相同組換え (HR) によって行われる。DSB には二種類の構造が知られており、一つは、電離放射線などによって生じる、切断末端を二つ持つ DSB (two-ended DSB) で、もう一つは DNA 複製中の複製フォークで生じる、末端を一つしか持たない DSB (one-ended DSB) である。ホ乳類細胞では two-ended DSB の修復は主に NHEJ によって修復され、細胞が生存へと向かうが、one-ended DSB に NHEJ が働いてしまった場合、致死性の高い染色体構造異常を含む突然変異が生じてしまうと考えられている。したがって、NHEJ は一方の DSB (two-ended DSB) に対しては積極的に働くよう正に制御されるが、もう一方の DSB (one-ended DSB) には働かないよう負に制御されているはずである。しかし、その実態は明らかではない。DSB は一つの細胞内で一細胞周期あたり 10 個生成していると考えられており、そのほとんどは one-ended DSB だと考えられている。したがって、細胞はこれら自然

発生する one-ended DSB に対して、極めて効率よく NHEJ を負に制御しているはずである。このように、two-ended DSB と one-ended DSB では、DSB 修復機構が異なる制御を受けている可能性が高い (図 1)。本研究課題では、one-ended DSB に対して NHEJ が抑制されるようなメカニズムを解明するため、one-ended DSB への修復タンパク質の局在観察法構築を計画した。計画の実行にあたって、メールでの打ち合わせを行った。

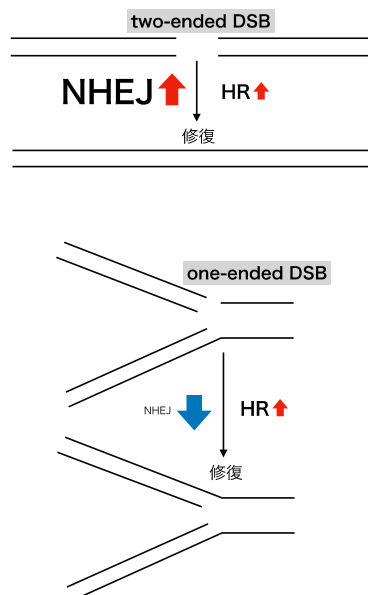


図1. two-ended DSB と one-ended DSB での異なる制御機構のモデル

[3] 成果

(3-1) 研究成果

これまで、放射線照射による多くの研究から two-ended DSB の修復制御機構について明らかにされてきている。修復タンパク質の DSB への局在は、核内フォーカスとして観察され、これらフォーカス形成の様々な遺伝子への依存関係を調べることで制御機構の一端が明らかにされてきた。one-ended DSB でも同様の手法で修復タンパク質の制御機構を明らかにするため、本共同研究では、DSB センサータンパク質として知られる NBS1 を指標として基礎的なデータ収集を行なった。細胞をカンプトテシン処理して one-ended DSB を発生させ、蛍光顕微鏡で GFP-NBS1 を観察した結果、明瞭な核内フォーカスの形成が観察された。DSB のマ

ーカーとして知られる γ H2AX に対する抗体を用いた蛍光免疫染色の結果、GFP-NBS のフォーカスは γ H2AX のフォーカスと一致することが確認され、カンプトテシン処理で生じた one-ended DSB の指標として GFP-NBS1 も利用可能であることが示された。

(3-2) 波及効果と発展性など

GFP-NBS1 の利点として、細胞を固定することなく生きてまま観察できるため経時変化の観察に適している点があり、また、煩雑な染色操作なしにフォーカスを観察できるので条件検討などでの手間が軽減される点が挙げられる。本研究で確認した GFP-NBS1 のフォーカス形成は、今後 one-ended DSB の修復制御機構を解析する上で利便性の向上・解析速度の向上につながると期待される。

本共同研究により、学外研究者との交流が活性化され、研究者ネットワークも拡大した。

[4] 成果資料

該当無し。