

環境変異原によるDNA二重鎖切断の発生と発がん過程

Induction of DNA double strand break
by environmental genotoxic and carcinogenic agents

小松 賢志 (Komatsu Kenshi)
京都大学・放射線生物研究センター・教授



研究の概要

DNA二重鎖切断は電離放射線照射などによって発生することは知られていたが、従来の数百倍～数千倍の感度増加をもたらした検出法の技術革新により、紫外線やDNA鎖架橋剤などの環境変異原によってもDNA二重鎖切断が誘発されることが報告された。そこで本研究では、各種の環境変異原によるDNA二重鎖切断発生の検証、それらのDNA二重鎖切断に対する細胞の修復過程とチェックポイント制御機構の解明、により環境変異原の発がん過程（ゲノム不安定化）における役割を明らかにする。

研究分野：環境学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA修復、複製阻害、H2AXリン酸化、環境変異原

1. 研究開始当初の背景

DNA二重鎖切断の良い指標と言われるヒストンH2AXのリン酸化が、紫外線照射やDNA鎖架橋剤処理でも観測されたので、さらに多くの環境変異原で解析を行った。

2. 研究の目的

DNA二重鎖切断はかつて電離放射線照射により誘発される特殊なDNA損傷と思われていた。しかし、ATM/ATRキナーゼによるリン酸化を受けるヒストンH2AXのリン酸化抗体を用いた最新技術では、従来の生化学的方法の数百倍～数千倍の感度増加により、細胞内に発生したわずかなDNA二重鎖切断も検出可能になった。この結果、紫外線やDNA鎖架橋剤などの環境変異原もDNA二重鎖切断を誘発することが我々や他の研究者により次第に明らかとなった。そこで、本研究は各種の環境変異原によるDNA二重鎖切断発生の検証と防御機構の破綻によるゲノム不安定性、その解析結果を変異原性の検出と予防に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 生理学的濃度の電離放射線、紫外線(UVC, UVA)、多環芳香族化合物(1-ニトロピレン、1,8-ジニトロピレン、ベンゾ「a」ピレン、3-ニトロベンズアントロン、4-アミノビフェニル)トポイソメラーズ阻害剤(ゲニステン、エトポシド)、DNA架橋剤(ソラーレン、マイトマイシンC)、アスベスト(クリソタイル)等

処理後、細胞周期依存性を確認するためにH2AXリン酸化抗体を用いて免疫染色を行った。また、BrdUとの二重染色を行った。

(2) 環境変異原処理後の損傷乗り越え合成を酵素Pol etaのフォーカス形成能および本研究で開発された損傷乗り越え合成アッセイ系を用いて測定した。また、ゲノムDNAシークエンスによる遺伝子突然変異の性質を検討した。

(3) 環境変異原処理後のSMC1やChk1経由チェックポイントを検討した。

(4) ヒストンH2AXやH2Bの化学的修飾と相同組み換え能との関係を検討した。

4. これまでの成果

(1) 我々が調べた限り(紫外線UVAを除く)全ての環境変異原でH2AXリン酸化が起こり、しかもDNA複製期に特異的に発生した。また、DNA二重鎖切断の蛋白NBS1と共局在した。この結果から環境変異原の指標としてのH2AXリン酸化の有効性が示された。

(2) ソラーレンのDNAへの結合はUVA照射により促進されるので、複合的汚染によるDNA損傷の増加の可能性が示された。

(3) 紫外線に加えてDNA鎖架橋剤や多環芳香族化合物も損傷乗り越えDNA合成を誘導すること、その結果としてトランスバージョン変異を高率に誘導する事が明らかとなった。

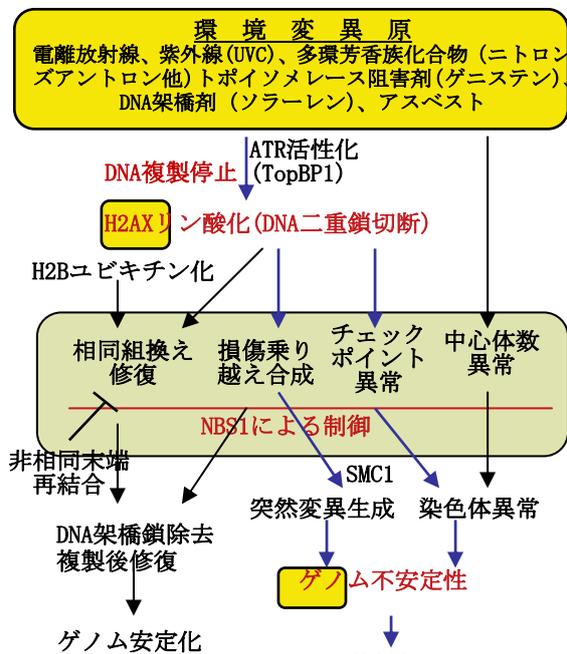
(4) 環境変異原処理によるゲノム不安定性の誘導機構には損傷乗り越えDNA合成、チェックポイント制御や細胞核外で起こる中心体数の異常などの複数経路が原因となることが

わかった。また、これらにはいずれも、DNA二重鎖切断蛋白 NBS1 が関与しており、NBS1 欠失が細胞に高感受性をもたらすことが判明した。

(5) DNA 複製時に重要とされる相同組み換え修復にヒストン H2B の化学修飾が必須であること、そして H2AX のリン酸化が相同組み換え蛋白の損傷部位への集結を促進する事が示された。

5. 今後の計画

環境変異原により H2AX が網羅的にリン酸化受けることが示されたので、変異原検出への有用性を検討する予定である。下図に示したように環境変異原によるゲノム不安定化は予想以上に複雑な経路で起こることが分かったので、それぞれについて解析を進める。特に H2AX リン酸化の生物学的な意義や損傷乗り越え合成と相同組換えの関係性を明らかにする事が重要である。



環境変異原による DNA 二重鎖切断(H2AX リン酸化) とゲノム不安定性

6. これまでの発表論文等 (研究代表者は太字、研究分担者は二重下線)

- 1) Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Bruma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, **Komatsu K**. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem Biophys Res Commun.*, in press, 2009.
- 2) Genotoxicity of 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, a novel mutagen in ambient air and surface soil, in mammalian cells in vitro and in vivo. Kawanishi, M., Watanabe, T., Hagio, S., Ogo, S., Shimohara, C., Jouchi, R., Takayama, S., Hasei, T., Hirayama, T., Oda, Y. and Yagi, T

Mutagenesis, in press, 2009.

- 3) Inactivation of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to excess centrosome duplication via the ATR/BRCA1 pathway. Shimada M, Sagae R, Kobayashi J, Habu T, **Komatsu K**. *Cancer Research*, 69:1768-75, 2009
- 4) NBS1 prevents chromatid-type aberrations through ATM-dependent interactions with SMC1. Antoccia A, Sakamoto S, Matsuura S, Tauchi H, **Komatsu K**. *Radiat Res*. 170:345-352, 2008.
- 5) NBS1 regulates a novel apoptotic pathway through Bax activation. Iijima K, Muranaka C, Kobayashi J, Sakamoto S, **Komatsu K**, Matsuura S, Kubota N, Tauchi H. *DNA Repair*, 7:1705-16, 2008.
- 6) Impaired removal of DNA interstrand cross-link in Nijmegen breakage syndrome and Fanconi anemia, but not in BRCA-defective group. Tsuchida K, **Komatsu K**. *Cancer Sci*. 99:2238-43, 2008.
- 7) Polyaromatic hydrocarbons cause histone H2AX phosphorylation in the S-phase of the cell cycle. Shimohara, C., Sawai, T. and Yagi, T. *Genes and Environment*, 30, 92-99, 2008.
- 8) Mutagenic specificity of N-acetoxy-3-aminobenzanthrone, a major metabolically activated form of 3-nitrobenzanthrone, in shuttle vector plasmids propagated in human cells. Nishida, H., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Yagi, T. *Mutation Research*, 654, 82-87, 2008.
- 9) Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. Sakamoto. S., Iijima. K., Mochizuki. D., Nakamura. K., Teshigawara. K., Kobayashi. J., Matsuura S, Tauchi H. **Komatsu K**. *Oncogene*. 查読あり, 26:6002-9, 2007.
- 10) TopBP1 associates with NBS1 and is involved in homologous recombination repair. Morishima K, Sakamoto. S., Kobayashi. J., Izumi. H., Suda. T., Matsumoto. Y., Tauchi. H., Ide. H., **Komatsu K**. Matsuura S. *Biochem Biophys Res Commun*. 362:872-9, 2007.
- 11) DNA adduct formation in human hepatoma cells treated with 3-nitrobenzanthrone: analysis by the ³²P-postlabeling method. Kanno, T., Kawanishi, M., Takamura-Enya, T., Arlt, V. M., Phillips, D. H., Yagi, T. *Mutation Research*, 634, 184-191, 2007.

ホームページ等
<http://www.rbc.kyoto-u.ac.jp/Genome/kiban/index.html>