



28 放射線標的の可視化と線量率効果の新規モデル

Visualization of Biological Target of Radiation and a Novel Model for Dose-rate effects.

小松 賢志

K. Komatsu

京都大学 放射線生物研究センター ゲノム動態研究部門

Department of Genome Repair Dynamics, Radiation Biology Center, Kyoto University

概要

放射線により細胞ならびに生体に誘発される障害には DNA 修復および細胞増殖を制御するチェックポイント機能が大きく寄与していることが知られている。本研究では、修復蛋白およびチェックポイント蛋白は放射線により誘発された DNA 二重鎖切断を認識しているのではなく、代わりに損傷部位のリン酸化されたヒストンを認識していることを明らかにした。また、このリン酸化ヒストンは約 2 時間の半減期で消失することから、リン酸化ヒストンフォーカス内での DNA 二重鎖切断の相互作用とゲノム不安定化の実証により、線量率効果を考慮した数値モデル化実現の可能性が示された。

1 研究目的

放射線の線量—効果関係をモデル化(数式化)することは、放射線リスクの推定ならびに癌の放射線治療計画をたてるために極めて重要である。このため、1940年代に Lea らの物理学者が中心となって放射線標的論が提唱された。この理論では細胞のなかに特に放射線感受性の標的を想定して、この標的が放射線でヒットされると傷が出来て細胞死に至ると考えた。しかしながら、このモデルは低線量での生物効果を過小評価する欠点と標的の生物学的裏付けに欠けていた。続いて、細致死の原因は DNA 二重鎖切断であるので、一本の放射線によって作られる場合(一次項)と二本の放射線が独立に単鎖切断を作りそれが接近して二重鎖切断になる(二次項)と考える直線—二次曲線モデルが提案された。しかしながら、このモデルでは線量—効果関係を良く近似する反面、時間の概念がないために低線量率照射の放射線効果を推定出来ない事や、実際に細胞に発生する二重鎖切断数とは実体が大きく相違するなどの欠点があった。このような既存の放射線効果関係モデルの欠点は、モデルが生物学的実験に基づいていないことに原因すると思われる。

近年の分子生物学の進歩により放射線の初期過程が分子レベルで解析可能になった。我々は放射線感受性遺伝病のナイミーヘン症候群の原因遺伝子 NBS1 のクローニングに成功して(Nature Genet., 1998)、NBS1 が放射線照射によって発生した DNA 二重鎖切断部位に数千の蛋白が集結したフォーカスを形成すること、そして切断された DNA 端をプロセッシングする Mre11ヌクレアーゼを DNA 二重鎖切断部位にリクルートすることが明らかになった。これらの事実から、フォーカスが放射線標的の生物学的実体と強く関連していると考えられる。また、このフォーカスは数時間で消失することから、放射線標的は空間的な広がりを持つとともに時間の関数でもある。そこで本研究は、各種線量や低線量率照射などによるリン酸化ヒストンの大きさと消失を実測して、既存のモデルで考慮されなかった生物学的根拠に基づいた線量率効果のモデル化を目的とする。

これらの成果は、広島・長崎の原爆生存者の一回被ばくの疫学資料から放射線作業者にみられる繰り返し被ばく(低線量率被ばく)へのリスク推定、ならびにイリジウム線源などによる舌癌や子宮癌の低線量率照射の治療計画などに新機軸をもたらすと期待される。

2 方法と結果

a) 放射線照射によるヒストン H2AX のリン酸化と NBS1 との相互作用

DNA 修復の開始にあたってリモデリングなどヒストンの何らかの修飾がなされる必要がある。H2A, H2B, H3, H4 の各 2 量体から構成されるヒストンに DNA が巻き付いてヌクレオゾームが形成される。H2A はさらに H2A1, H2A2, H2AX, H2AZ, macroH2A1, MacroH2A2, H2A-Bbd の 7 種類のバ

リアントから構成されている。このうち H2AX は他のバリエーションに比較して C 末側が長く、ヒストン構造から外側にはみ出しているために外的因子による修飾を受けるとされている。H2AX のこの長い C 末には、真核生物を通じて良く保存されている S Q (セリン/グルタミン) モチーフが存在する。我々はこのセリンのリン酸化抗体を作製して、放射線照射によるリン酸化をウェスタン法で検討した結果、照射数分以内にリン酸化型 (γ -H2AX) が出現して 20 分程度でピークに達した後に約 2 時間の半減期で消失した。毛細血管拡張性運動失調症 (AT) の患者由来の細胞では顕著なリン酸化が見られないことから、H2AX のリン酸化は ATM キナーゼによると思われる。続いて、ナイミーヘン症候群 (NBS) 患者細胞を用いて同様にアッセイした結果、正常に γ -H2AX が形成されることからヒストンが修飾された後に、NBS1 蛋白が hMre11/hRad50 を細胞質から同部位にリクルートして来るとされる。この γ -H2AX は免疫染色によるフォーカスとして観測されるが、 γ -H2AX フォーカスはまた NBS1 フォーカスとも共局在していた。さらに、リン酸化 H2AX の抗体による免疫沈降物 (IP) には NBS1 蛋白が存在しており、NBS1 は放射線照射後に γ -H2AX と結合することが示された。また、この IP 複合体には hMre11 も存在するが、NBS1 が欠失した NBS 細胞の IP 複合体では hMre11 が見られないことから、hMre11 は NBS1 を介して γ -H2AX に結合していると思われる。この事は、hMre11 結合領域を欠失した NBS1 変異蛋白でも NBS1 が H2AX に結合して、照射によるフォーカスも形成することからも確認できた。

興味深い事にこの実験では、NBS1 の N 末側を欠失した変異細胞では NBS1 のフォーカス形成も H2AX への結合も見られなかった。この事は、NBS1 の γ -H2AX への結合は N 末側の FHA/BRCT ドメインを介していることを示唆する。このため、NBS1 の N 末側、ならびに C 末側の欠失した変異リコンビナント蛋白を作製して H2AX との結合領域を解析した。初めに、全長 NBS1 リコンビナント蛋白と (非リン酸化型) H2AX の混合物を H2A 抗体 (H2AX と γ -H2AX の両方を認識) で IP したが、両蛋白の結合は見られなかった。続いて、H2AX を ATM でリン酸化後に同様の操作をした結果、IP 複合体に NBS1 蛋白の存在が確認された。この事は、NBS1 蛋白は H2AX のリン酸化型 (γ -H2AX) に特異的に結合することを意味する。同様に、C 末側の NBS1 リコンビナント蛋白ではこの結合は見られなかったが、N 末側の FHA/BRCT 領域のリコンビナント蛋白では γ -H2AX との結合が確認された。この事は、NBS1 蛋白は補助因子を介さずに直接 FHA/BRCT ドメインで H2AX と結合していることを示している。さらに、H2AX との結合が放射線照射後のフォーカス形成の原因であることを確認するために、 γ -H2AX 抗体の細胞への注入による H2AX リン酸化部位をマスクする実験を行った。抗体導入によるマスクの結果、NBS1 と H2AX の結合は消失、そして同時に NBS1 フォーカスも阻害されたことから、放射線照射後に見られる NBS1 フォーカスは H2AX との結合によるものであることが明らかになった。

b) DNA 修復蛋白のフォーカス形成

従来、NBS1 は BASC (BRCA1-associated surveillance complex) のメンバーであることから、BRCA1 を介して DNA 二重鎖切断部位に結合していると思われていた。このような間接的な結合でないことを確認するために、BRCA1 欠損の HCC/1937 細胞を用いて NBS1 と H2AX との結合を検討した。結果は、NBS1 は BRCA1 が存在しなくても H2AX と結合が出来、また放射線照射によるフォーカスも形成できることが示された。逆に、NBS 細胞でも BRCA1 はフォーカスを形成出来ることから、損傷応答初期には NBS1 と BRCA1 は独立に H2AX と結合してフォーカスを形成すると考えられる。続いて、上記の NBS1 欠失変異体を用いて NBS1 と BRCA1 および SMC1 (structural maintenance of chromosome 1) との相互作用を免疫共沈法で解析した。正常細胞では BRCA1 抗体を用いた免疫複合体の中に NBS1 および Mre11・Rad50 が含まれており、この結合は 1.2 Gy 放射線照射後 2 時間で有意に増加した。逆に Mre11 抗体を用いた複合体中にも BRCA1 蛋白が存在すること、そして 50 μ g/ml EtBr 存在下でもこの結合は阻害されないことから両蛋白は DNA を介さずに相互作用することが確認された。A-T 細胞では BRCA1 と NBS1 および Mre11・Rad50 との相互作用の放射線線量依存性が見られないことから、これらの結合には ATM キナーゼによる蛋白リン酸化が必要であると思われる。一方、全長 NBS1 相補クローンおよび S343A クローンは放射線照射によるこれら蛋白結合の増加が見られるが、FH3 クローンならびに BRCT-d クローン、del670 クローンは放射線照射による結合の増加は見られなかった。さらに、Rad50 の蛋白発現が低下している患者細胞 96B453 では、NBS1 の結合は放射線照射により増加するが、Rad50 の結合の放射線照射による増加は見られなかった。これらのことから、NBS1 は N 末側で BRCA1 と結合、そして C 末側で Mre11・Rad50 と結合している事が示唆された。また、ATM キナーゼの活性化に必要とされる Mre11 が損傷部位にリクルートされることも BRCA1 と NBS1 の結合に必須であると思われるので、Mre11 の欠損した A-T L D 細胞を用いての確認が必要である。

次に、SMC1 と NBS1 複合体との結合を SMC1 抗体による免疫共沈法で検討した。放射線 4 Gy 照射した正常細胞では SMC1 と NBS1 複合体との結合が見られるが、A-T 細胞ではこの結合が消失した。一方、BRCA1 と同様に、NBS1 は全長 NBS1 相補クローンおよび S343A クローンは正常細胞と同程度に SMC1 と結合するが、FH3 クローンならびに BRCT-d クローン、del670 クローンはこ

の結合はみられない。また、96B453 患者細胞では、NBS1 の結合は放射線照射により増加するが、Rad50 の結合の放射線照射による増加は見られなかった。これらのことから、NBS1 と SMC1 の結合には BRCA1 が必要であること、そして NBS1 は N 末側を介して SMC1 に結合している事が示唆された。ATM により、SMC1 の Ser-957 および Ser-966 部位がリン酸化を受けるが、このリン酸化には SMC1 が NBS1 あるいは BRCA1 と結合することが必要である。これらの事から、損傷応答初期に独立にフォーカス部位に集結した修復・チェックポイント蛋白がやがて相互に結合して、誤りの少ない修復を完了すると思われる。

c) フォーカス形成と染色体不安定性

毛細血管拡張性運動失調症やナイミーヘン症候群の患者細胞の放射線感受性の原因は不明である。これらの患者細胞では放射線照射後に高頻度に染色体異常が誘発されることから、染色体異常すなわち誤りの多い修復が細胞致死を誘発していると考えられる。そこで、染色体異常とフォーカス形成との関係を明らかにするために、上記のフォーカス形成能に欠けている FH3 クローンならびに BRCT-d クローン、del670 クローン、そして蛋白中央部分の ATM によってリン酸化される 343-Ser をアラニンに置換した S343A クローンを用いて染色体異常頻度を測定した。これらのクローンならびに親細胞の NBS7166 細胞を γ 線 2 Gy で照射した結果、NBS 細胞に 3 時間後に誘発される染色体異常は正常細胞の約 2 倍で、特に染色体型異常頻度が有意に増加した。全長 NBS1 により相補した変異体および S343A クローンの染色体異常頻度は正常細胞のレベルにまで低下するが、FH3 クローンならびに BRCT-d クローン、del670 クローンのいずれも親 NBS 細胞と同程度の高い染色体異常頻度を示した。この事から、NBS1 の N 末側および C 末側の両方がゲノムの安定化に必須であることが明らかとなった。また、同時に行ったコロニー法による生存率測定でもフォーカス形成能と一致して、FH3 クローンならびに BRCT-d クローン、del670 クローンのいずれもが放射線高感受性を示した。

3 考察

我々の研究から修復蛋白が認識する放射線損傷の領域（放射線の生物学的標的）は、従来考えられていた物理標的サイズの数百万倍であることが示された。すなわち、放射線により誘発された一つの DNA 二重鎖切断により 0.03% のヒストン H2AX がリン酸化されるので、計算上はヒトゲノム $6 \times 10^9 \text{ bp} \times 0.0003 = 1.8 \text{ Mbp}$ 相当になる。しかし実際には、ヒストンが連続的にリン酸化される訳ではないのでこの数十倍、細胞核全体の 1/100 程度、の大きさで予想される。この大きさはリン酸化ヒストンが顕微鏡で観測可能の事実と一致する。放射線 2 Gy 照射では細胞一個に約 100 個の DNA 二重鎖切断が発生するので、一つの放射線標的内に複数個の DNA 二重鎖切断が発生した細胞が存在する事になる。このような細胞では、中性子や α 線で見られるように DNA 二重鎖切断が標的内で近接したクラスター状態になり大きな放射線障害を引き起こす。一方、この放射線標的は時間とともに消失する。照射後直ちにヒストンはリン酸化されるが、約 5 時間後にはほぼ脱リン酸化を受ける。従って、低線量率照射の場合には発生した放射線標的が次々と消失する事から、例えば 2 Gy 照射でも DNA 二重鎖切断がクラスターを形成する事はない。この結果、低線量率照射の場合には発生した DNA 二重鎖切断数、つまり放射線線量と生物効果は単純な直線関係（一次式）になると予想される。一方、高線量率照射の場合には、この一次項に加えて、DNA 二重鎖切断の相互作用による放射線線量の 2 乗かそれに近い関数とが積算された直線—二次曲線になると予想される。今後は、フォーカス内での DNA 二重鎖切断の相互作用とゲノム不安定化を実証して、線量率効果を考慮した数値モデル化が必要である。

関連論文

- (1) S. Matsuura, J. Kobayashi, H. Tauchi, and K. Komatsu: Nijmegen breakage syndrome and DNA double strand break repair by NBS1 complex. *Advance in Biophysics*, in press, 2003
- (2) J. Kobayashi, A. Antocchia, H. Tauchi, S. Matsuura, K. Komatsu: Nbs1 and its Functional Role in the DNA Damage Response, in press, 2004
- (3) Y. Kajiwara, K. Morishima, J. Kobayashi, H. Tauchi, E. Ito, M. Shinohara, H. Tahara, S. Hama, K. Kurisu, Y. Sugio, M. Tsukahara, Y. Murakami, M. Oshimura, T. Ikeuchi, K. Komatsu, T. Kajii, and S. Matsuura: Reduced level of BubR1 causes mitotic spindle checkpoint defect in chromosomal instability syndrome of premature chromatid separation (PCS). Submitted to *Am. J. Hum Genet.*, 2004
- (4) 中村麻子、大羽玲子、小松賢志：DNA 二重鎖切断によって生じるヒストン H2AX のリン酸化、*遺伝子医学*、7：367-373, 2003
- (5) 植田謙、小松賢志：ファンコニー貧血と染色体不安定性、「DNA 複製・修復がわかる」羊土社、pp117-123, 2004

- (6) 坂本修一, 小松賢志: ナイミーヘン染色体不安定症候群と発がん. 医学のあゆみ, 208 : 858-862, 2004
- (7) 大羽玲子, 小松賢志: ゲノム修復とがん. 血液・腫瘍科, 48(2), :123-130, 2004