

## 放射線誘発ゲノム不安定性抑制への OXR1 の寄与

松井亜子<sup>1</sup>, 小林純也<sup>2</sup>, 菅野新一郎<sup>3</sup>, 橋口一成<sup>4</sup>, 鈴木雅雄<sup>5</sup>, 秋山(張)秋梅<sup>1</sup>

<sup>1</sup>京都大学大学院 理学研究科 生物科学専攻, <sup>2</sup>京都大学大学院 生命科学研究科 放射線生物研究センター, <sup>3</sup>東北大学 加齢医学研究所, <sup>4</sup>福岡歯科大学 生化学分野, <sup>5</sup>放射線医学総合研究所

ゲノム不安定性は、がんや神経変性疾患の発症または進行の原因と考えられている<sup>1</sup>。放射線照射により細胞内の ROS 産生が増加し酸化ストレスが生じる<sup>2</sup>。酸化ストレス条件下では、ROS による DNA 損傷が蓄積しやすいことがゲノム不安定性につながり得る<sup>1,2</sup>。これに対し、細胞内には DNA 修復や細胞周期 arrest を誘導することでゲノム不安定性を抑制する機構が備わっている<sup>1</sup>。

Oxidation Resistance 1 (OXR1)は真核生物に高度に保存されている遺伝子で、細胞内の酸化ストレスを抑制している<sup>3</sup>。運動失調モデルマウスである OXR1 欠損マウスでは、生後早期に小脳における 8-oxoG の蓄積がみられる<sup>4</sup>。また、大腸菌におけるヒト OXR1 の発現は酸化 DNA 損傷由来の突然変異を抑制する<sup>5-7</sup>。これらのように、OXR1 はゲノム安定性維持に寄与しているが、その分子メカニズムは未解明である。本研究では、OXR1 によるゲノム安定性防御メカニズムを明らかにすることを目的とし、OXR1 発現抑制 HeLa 細胞株を樹立し、ガンマ線照射後のゲノム不安定性およびそれに関する指標を調べた。

OXR1 発現抑制により細胞内 ROS レベルが増加することが知られている。本研究では、OXR1 発現抑制細胞ではコントロール細胞と比較し、10 Gy ガンマ線照射から 4 時間後のスーパーオキシドレベルが増加することが明らかとなった。放射線照射された細胞内で、OXR1 がゲノム不安定性抑制に貢献しているかを調べるために、染色体不安定性の一つである微小核 (MN) を観察した。10 Gy 照射後に、OXR1 発現抑制により MN 形成率が増加し、この MN 形成増加は、抗酸化剤である N-acetyl-L-cysteine (NAC) により部分的に緩和されたことは、OXR1 発現抑制によって ROS 依存的なゲノム不安定性が増加することを示している。これらの結果から、OXR1 は ROS 産生を抑制することで、ゲノム安定性を防御していることが示唆される。

放射線照射後、細胞周期が arrest を乗り越えることで MN が形成される<sup>8</sup>。OXR1 発現抑制細胞における放射線照射後の細胞周期を観察したところ、G2/M arrest 維持期間が短縮していた。MN 形成を部分的に緩和する効果のあった条件の NAC 処理で、OXR1 発現抑制細胞の G2/M arrest 短縮は回復しないことが確認された。ガンマ線照と同時に DNA 損傷応答阻害剤である Caffeine で処理することにより OXR1 発現抑制細胞とコントロール細胞の

G2/M arrest を抑制すると、これらの細胞の間にみられていた MN 形成率の差がみられなくなった。以上の結果は、OXR1 発現抑制細胞では G2/M arrest 短縮が MN 形成増加の原因であることを示している。尚、OXR1 発現抑制による G2/M arrest の短縮と MN 形成増加は、高 LET の重粒子線照射後でもみられる。OXR1 は、ガンマ線と重粒子線で共通する要因に対しゲノム安定性を防御していると考えられる。

G2/M arrest の制御には、細胞周期 arrest の誘導、維持、解除が含まれる<sup>9</sup>。OXR1 発現抑制細胞では G2/M arrest は誘導されるが、持続期間が短いことから、維持または解除に欠陥があると推測される。DNA 損傷応答機構では、MAPKAP kinase 2 がリン酸化されることが G2/M arrest を維持する<sup>10,11</sup>。ガンマ線照射後の MK2 リン酸化レベルを調べたところ、OXR1 発現抑制細胞とコントロール細胞との間に違いはみられなかった。次に、細胞周期を進行させる因子をみると、cyclin D1 の発現が放射線照射後の G2 arrest 維持期間を短縮させることが報告されている<sup>12</sup>。Cyclin D1 のタンパク質発現を調べたところ、OXR1 発現抑制細胞株ではコントロール細胞と比較し、ガンマ線照射から 1 時間後の cyclin D1 発現レベルが高いことが明らかとなった。さらに、OXR1 結合因子候補の中に、cyclin D1 発現制御因子である Glycogen synthase kinase-3 や Beta-catenin が含まれていることも見出されている。これらは、OXR1 が cyclin D1 発現制御に貢献していることを示唆している。OXR1 は cyclin D1 発現制御を介して G2/M arrest を維持している可能性がある。

以上から、本研究では、ガンマ線照射された細胞内において、OXR1 は酸化ストレス抑制だけでなく、G2/M arrest 維持を介してゲノム安定性維持に貢献していることが示された(下図)。



図. OXR1 による放射線照射誘発ゲノム不安定性抑制機構

#### 引用文献

1. Ciccia, A. & Elledge, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Mol. Cell* **40**, 179–204 (2010).
2. Sies, H., Berndt, C. & Jones, D. P. Oxidative Stress. *Annu. Rev. Biochem.* **86**, 715–48 (2017).

3. Finelli, M. J. & Oliver, P. L. TLDC proteins: new players in the oxidative stress response and neurological disease. *Mamm. Genome* **28**, 395–406 (2017).
4. Oliver, P. L. *et al.* Oxr1 Is Essential for Protection against Oxidative Stress- Induced Neurodegeneration. *PLoS Genet.* **7**, (2011).
5. Volkert, M. R., Elliott, N. A. & Housman, D. E. Functional genomics reveals a family of eukaryotic oxidation protection genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14530–14535 (2000).
6. Murphy, K. C. & Volkert, M. R. Structural/functional analysis of the human OXR1 protein: identification of exon 8 as the anti-oxidant encoding function. *BMC Mol. Biol.* **13**, 1 (2012).
7. Sanada, Y. *et al.* Oxidation resistance 1 is essential for protection against oxidative stress and participates in the regulation of aging in *Caenorhabditis elegans*. *Free Radic. Res.* **48**, 919–928 (2014).
8. Fenech, M. *et al.* Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. *Mutagenesis* **26**, 125–132 (2011).
9. Kousholt, A. N., Menzel, T. & Storgaard Sørensen, C. Pathways for Genome Integrity in G2 Phase of the Cell Cycle. *Biomolecules* **2**, 579–607 (2012).
10. Reinhardt, H. C., Aslanian, A. S., Lees, J. A. & Yaffe, M. B. p53-Deficient Cells Rely on ATM- and ATR-Mediated Checkpoint Signaling through the p38MAPK/MK2 Pathway for Survival after DNA Damage. *Cancer Cell* **11**, 175–189 (2007).
11. Reinhardt, H. C. *et al.* DNA Damage Activates a Spatially Distinct Late Cytoplasmic Cell-Cycle Checkpoint Network Controlled by MK2-Mediated RNA Stabilization. *Mol. Cell* **40**, 34–49 (2010).
12. Martin, J. M. C. *et al.* Cyclin D1 Overexpression Enhances Radiation-induced Apoptosis and Radiosensitivity in a Breast Tumor Cell Line. *Cancer Res.* **59**, 1134–1140 (1999).