

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：31305

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18481

研究課題名(和文) DNA二本鎖切断修復経路の選択におけるコアヒストンの役割

研究課題名(英文) Global analysis of core histones required for homologous recombination repair

研究代表者

中林 悠 (NAKABAYASHI, Yu)

東北医科薬科大学・薬学部・助手

研究者番号：10710361

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復反応はクロマチン構造上で開始するが、クロマチンを構成するコアヒストンがDNA修復にどのような働きをしているかは不明であった。本研究では、DNA二本鎖切断の修復経路である相同組換え修復(HR)に重要な役割を担うヒストン残基を、出芽酵母ヒストン点変異体ライブラリーを用いた網羅的な解析から同定した。これにより、HRが効率良く進むために必要な残基、およびHR経路に進むために必要と思われる残基を明らかにすることができた。いずれも非修飾残基の修復反応への重要性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：Damaged DNA is repaired on chromatin structure in a cell. However, it is remain unclear how core histones (H2A, H2B, H3, H4), major components of chromatin, regulate DNA repair pathway choice. In this study, I found that 1) an H2A residue on nucleosome acidic patch is required for efficient DNA resection, 2) H3 and H4 residues interact with each other have an important function on DNA repair pathway choice to promote homologous recombination repair. These results show that not only histone modifications but also unmodifiable histone residues play critical roles on DNA repair.

研究分野：DNA修復

キーワード：ヒストン クロマチン DNA修復

1. 研究開始当初の背景

DNA二本鎖切断 (DSB) の修復には、相同組換え修復 (HR) と非同末端結合 (NHEJ) の二つの経路が主に知られている。これら二つの修復経路の選択機構については、DSB 部位に結合する修復因子による制御が明らかにされつつあるが、その詳細な制御機構はいまだ不明な部分が多く残されていた。また、DSB 修復はクロマチン構造上で起こる反応であるにもかかわらず、DNA と結合したヒストンがその反応過程においてどのような役割を持つのかはほとんど解析されていなかった。これまでに、ヒストンの非修飾残基も DSB 修復に影響を与える可能性が報告されており、HR および NHEJ に必要なヒストン残基を網羅的に同定するスクリーニング系の構築ができれば、これまでの翻訳後修飾を中心とした研究とは異なる観点から、DSB 修復制御機構の詳細を解明できると考えた。

2. 研究の目的

DSB は重篤な損傷であり、これが正常に修復されないと細胞死やゲノム不安定性を引き起こす。本研究では、HR と NHEJ に異常を示す出芽酵母ヒストン点変異体をスクリーニング解析から同定することで、DSB 修復におけるコアヒストンの役割とその制御機構を解き明かすことを目的とした。コアヒストンは酵母からヒトまで高度に保存されているため、本研究により、DSB 修復の普遍的な制御機構を明らかにできると期待された。

3. 研究の方法

出芽酵母ヒストン点変異体ライブラリーを用いて、以下の解析を行った。

(1) *rad27* 欠損と合成致死性を示すヒストン点変異体のスクリーニング解析

HR に必要なヒストン残基を同定するために、*rad27* 欠損株の性質を利用した。*RAD27* は岡崎フラグメントの切り出しに関わる Fen1 ヌクレアーゼをコードし、その欠損株は、HR に必要な因子 (*RAD52* など) の欠損と合成致死性を示すことが知られている (*Nucleic Acids Res.* 26:5589-5595, 1998; *Cell* 124:1069-1081, 2006)。このことから、HR に必要なヒストン残基の変異体は *rad27* 欠損と合成致死性を示すと考えられた。これらの二重変異株を作製し、細胞増殖能をスクリーニング解析することで、HR に重要であるヒストン残基の候補を同定した。

(2) 同定されたヒストン点変異体の DNA 修復能の解析

(1) のスクリーニング解析により同定されたヒストン残基の点変異体について、DNA 修復能にどのような異常が生じているのかをパルスフィールドゲル電気泳動により確認した。また、DNA 修復チェックポイントの活性化が起きているかを、ウェスタンブロットによる Rad53 のリン酸化解析、さらにフロー

サイトメトリーによる DNA 複製の進行を指標として判断した。

(3) HO エンドヌクレアーゼにより人工的に DSB を誘発可能なヒストン点変異株の作製

出芽酵母の DNA 修復解析において、HO エンドヌクレアーゼにより人工的に DSB を誘導できる酵母株が使用されている (*EMBO J.* 9:663-673, 1990)。この株では、*MAT* 領域に生じた DSB が、相同的な配列である *HML α* 領域と組換えを起こすことで修復される。この株を元に、各ヒストン遺伝子を欠損させることで、HR の進行を解析できるヒストン点変異体を作製した。

(4) ヒストン変異が HR へ与える影響の解析

(3) で作製したヒストン点変異体について、HR の反応過程にどのような影響が生じるかを解析した。末端削りこみ、相同鎖侵入、組換え構造の解消の各段階について、それぞれの反応の進行度合いを PCR を利用した手法 (*Mol. Cell* 50:589-600, 2013) で解析した。各反応の進行に異常が観察されたヒストン点変異体については、それぞれの段階で働くことが知られている DNA 修復因子のクロマチン結合量を解析した。

4. 研究成果

(1) *rad27* 欠損と合成致死性を示すヒストン点変異体のスクリーニング解析

HR に異常を示す変異体の多くは、ヒドロキシ尿素 (HU)、メチルメタンスルホン酸 (MMS) に感受性を示す。そこで、これらの薬剤に感受性を示すヒストン点変異体 48 株について、*rad27* 欠損との二重変異株を作製し、増殖能の検定を行った。その結果、H2A 点変異体 2 株、H2B 点変異体 1 株、H3 点変異体 5 株、H4 点変異体 2 株が致死性、または顕著な増殖能の悪化を示した。

これらの残基は、ヌクレオソーム上の acidic patch、H3-H3' 結合領域、H3-H4 内部相互作用領域に位置した。

(2) 同定されたヒストン点変異体の DNA 修復能の解析

スクリーニングより同定されたヒストン点変異体について、DNA 修復反応にどのような影響を与えているのかを、パルスフィールドゲル電気泳動により解析した。MMS により染色体 DNA を損傷し、その後 DNA が修復されていく様子を観察したところ、H2A-L66A 変異体では、野生型に比べ DNA 修復反応が遅れることがわかった (図 1)。ただし、*rad52* 欠損ほどの修復異常は見られないことから、修復反応が完全に阻害されるわけではないと考えられた。驚くことに、H3-E97A などの H3-H4 内部相互作用領域の点変異体では、野生型よりも DNA 修復が速く進む傾向が観察された。

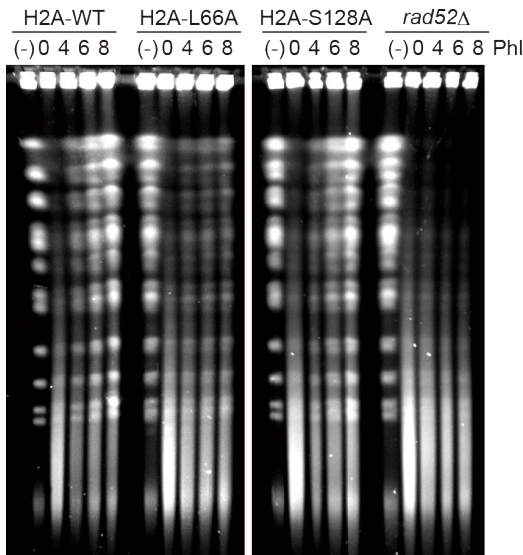


図1. パルスフィールドゲル電気泳動
フレオマイシン (Phl) により DNA を傷害し、その後薬剤を含まない培地で4~8時間培養することで DNA 修復反応を進行させた。rad52 は DNA 修復反応が阻害されるコントロールとして用いた。

ここで観察された DNA 修復反応の異常が、DNA 修復チェックポイントの異常に起因しているかどうかを調べた。DNA 修復チェックポイントの指標として、Rad53 のリン酸化および複製停止からの細胞周期再開が正常に起こるかを各ヒストン点変異体について解析した。その結果、いずれの点変異体でも Rad53 のリン酸化、細胞周期の再開が野生型と同様に起きたことから、DNA 修復チェックポイントは正常であることが確認された。

(3) HO エンドヌクレアーゼにより人工的に DSB を誘発可能なヒストン点変異株の作製

出芽酵母の DNA 修復解析において、HO エンドヌクレアーゼにより人工的に DSB を誘導できる酵母株が使用されている (*EMBO J.* 9:663-673, 1990)。この株では、3 番染色体上の *MAT* 領域に生じた DSB が、相同的な配列である *HMLα* 領域と組換えを起こすことで DSB が修復される。この株を元に、*HHT1-HHF1/HHT2-HHF2* あるいは *HTA1-HTB1/HTA2-HTB2* ヒストン遺伝子を欠損させ、変異型ヒストン遺伝子を発現させることで、DSB の修復進行を解析できるヒストン点変異体を作製した。

(4) ヒストン変異が HR へ与える影響の解析

H2A-L66A について

(2)の結果より、DNA 修復反応が低下していると考えられる H2A-L66A 変異体について、(3)で作製したヒストン点変異体を解析した。はじめに、HR の中間反応である相同鎖侵入が正常に起きているかを調べた。*MAT* 領域に DSB を誘導し、*HMLα* 領域と組換えが起きて

いれば、PCR により相同鎖侵入を検出できる。解析の結果、H2A-L66A 変異体では、相同鎖侵入反応が野生型よりも低下していることがわかった。

次に、この原因を探るために、HR の初期反応である末端削り込み反応への影響を調べた。DSB が生じると、DNA 末端がエキソヌクレアーゼによって削り込まれ、3'末端が露出した一本鎖 DNA が形成される。この一本鎖 DNA に Rad51 が結合することで、相同鎖侵入が進行する。H2A-L66A 変異体での DSB 部位周辺への Rad51 の結合量を解析したところ、野生型の半分程度まで減少していることがわかった (図2)。また、H2A-L66A 変異体では、一本鎖 DNA の形成量も低下していたことから、H2A-L66A は、HR の初期反応である末端削り込み反応に寄与していると考えられる。

H2A-L66A はヌクレオソーム上の acidic patch と呼ばれる酸性領域に位置し、ここには多くのクロマチン関連因子が結合することが知られている。このため、H2A-L66A は、エキソヌクレアーゼやクロマチンリモデリング因子が DSB 部位に効率良く集積することによって必要であると予想される。

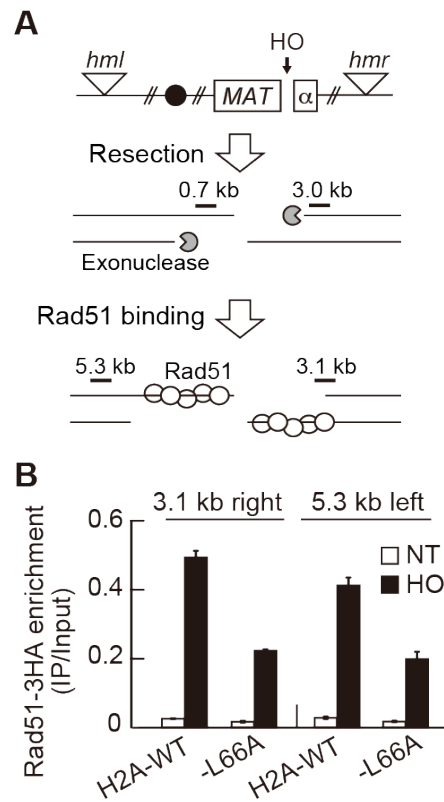


図2. DSB 部位への Rad51 の結合量解析
(A) 実験概略図。HO エンドヌクレアーゼを発現させ、DSB を生じさせる。DSB 部位から 3.1 kb、5.3 kb 離れた領域への Rad51 結合量をクロマチン免疫沈降法で解析した。(B) H2A 野生型および H2A-L66A 変異体での Rad51 の結合量。

H3-H4 内部相互作用領域について

H3-F54A, -I62A, -E97A, H4-R36A 変異体がこの領域に位置する。(2)の結果から、これらの変異体では野生型よりも速く DNA 修復反応が進行している傾向が観察された。この可能性として、HR が進まず NHEJ による DNA 修復反応が亢進していることが考えられた。そこで、これらの点変異体について、NHEJ 因子である Ku70 を欠損させ、NHEJ による DNA 修復反応を阻害した場合の増殖能への影響を調べた。その結果、*ku70* 欠損とこれらのヒストン点変異との二重変異株は合成致死、あるいは顕著な増殖能悪化を示した。このことから、H3-H4 内部相互作用部位への変異体では、HR が進行せず、NHEJ によって DNA が修復されていることが示唆された。このことは、DNA 修復経路選択機構の解明につながる成果と考えられる。

研究開始当初の背景でも述べたが、ヒストンの研究は主に、翻訳後修飾を中心とした解析が進められてきた。これに対して本研究は、非修飾残基を含めた網羅的な解析を行うことで、従来の解析戦略からは得ることのできない独創的な知見を得ることに成功したと言える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

中林 悠 (NAKABAYASHI, Yu)
東北医科薬科大学・薬学部・助手
研究者番号：10710361