

平成 30 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18581

研究課題名(和文) Ctf4タンパク質がrDNA複製阻害に伴うDSB修復を促進する分子機構の解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanisms by which Ctf4 protein promotes proper repair of DSBs formed upon inhibition of rDNA replication

研究代表者

佐々木 真理子 (Sasaki, Mariko)

東京大学・分子細胞生物学研究所・助教

研究者番号：50722013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、複製装置の構成因子であるCtf4タンパク質が、複製阻害時のDNA二重鎖切断(DNA double-strand break, DSB)の削り込みを抑制し相同組換えを抑制することによって、DSBを正しく修復するために必要であることを明らかにした。さらに複製阻害時のDSBは、これまでG2/M期でのDSB修復に必要な相同組換え経路によって修復されると考えられてきた。しかし、複製阻害時のDSB修復には相同組換え因子は必要ではなかった。よって、複製阻害時のDSBは、これまで知られていない新規の経路によって修復されることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to understand the mechanisms by which Ctf4 protein functions to promote proper repair of DNA double-strand breaks (DSBs) at the arrested replication forks. It has been believed that DSBs at arrested forks are repaired by homologous recombination, which is required for repair of DSBs formed in the G2/M phases of the cell cycle. However, I found that DSBs at arrested forks are repaired by the novel pathways that are independent of homologous recombination. I also showed that Ctf4 protein, a component of replication machineries, plays an important role for proper repair of DSBs at arrested forks, by suppressing the initiation of homologous recombination upon DSB formation.

研究分野：分子生物学

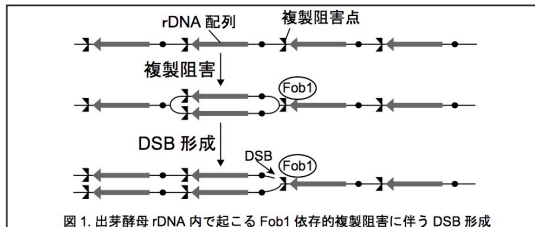
キーワード：DNA複製阻害 DNA二重鎖切断 Ctf4 ゲノム再編成 rDNA ゲノム不安定化

1. 研究開始当初の背景

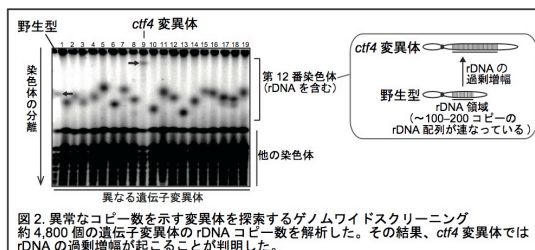
DNA複製は、遺伝情報を正確にコピーし娘細胞に伝達するための生物の根源的機構である。しかし、複製の鋳型鎖上には様々な障害が存在するため、複製装置の進行は頻繁に停止する。このように複製阻害が起こった場所では、DNA二重鎖切断[DNA double-strand break (DSB)]が起こりやすい。DSBは誤って修復されると、染色体再編成を引き起こしゲノム不安定化を誘導し、癌、多くのゲノム疾患、老化の原因となる。よって複製阻害時のDSB修復機構を解明することは重要である。

複製阻害は、ゲノム上のランダムな場所で起こることが多い。よって複製阻害に伴うDSBが高頻度で検出され、その修復過程をDNAレベルで解析できるような領域は見つかっていなかった。そしてこのことが原因で、複製阻害時のDSB修復機構に関する研究は十分な進展を見せていなかった。

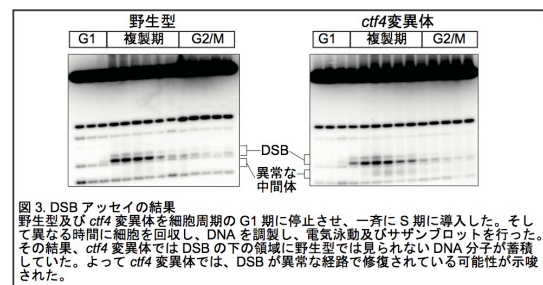
出芽酵母のリボソームRNA遺伝子(rDNA)領域は、100-200個のrDNA配列が連なった領域である。この領域内では、Fob1タンパク質が複製阻害点に結合することによって、高頻度で複製阻害が起こる(図1)。そしてその結果、DSBが生じることも分かっていたが、その修復機構は不明であった。そこで申請者は、rDNAをモデル領域として、複製阻害時のDSB修復機構を明らかにすることを目指している。



rDNA領域は、複製阻害に依存してコピー数変動を起こしやすいことが知られている。先行研究において、出芽酵母の約6,000個の遺伝子の中の約4,800個の非必須遺伝子をノックアウトした変異株ライブラリーを用いて、異常なrDNAコピー数変動を示す変異株を探索するスクリーニングが行われた(Saka et al., Nucleic Acids Research 2016)。そして、複製装置の構成因子をコードするCTF4遺伝子の欠損株では、異常なrDNAコピー数増幅が起こることが明らかとなった(図2)。



申請者は先行研究において、ctf4変異体でのrDNA増幅は、複製阻害に依存して起こることを確かめた。このような複製阻害依存的なrDNAコピー数増幅が起こる理由として、複製阻害の結果生じるDSB形成あるいはその修復過程で異常が生じている可能性が考えられた。そこで、rDNA内で生じるDSB形成およびその修復過程を解析するためのDSBアッセイを立ち上げた。そして野生型とctf4変異体において、このDSBアッセイを行った。すると、ctf4変異体ではDSB修復過程で野生型ではほとんど見られない中間体が蓄積していることが明らかとなった(図3)。このDNA分子を同定することにより、ctf4変異体で起こる異常なrDNAコピー数増幅の原因を明らかにすることができると考えた。



2. 研究の目的

ctf4変異体において、野生型では検出されないDSB修復中間体が蓄積していた(図3)。このことから、ctf4変異体ではDSBが異常な経路で修復されている可能性が示唆された。よって本研究課題では、この新規のDNA分子を同定することによって、Ctf4タンパク質が複製阻害時のDSB修復を促進する分子機構を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

上記の研究目標を達成するため、二次元電気泳動を用いて目的のDNA分子の鎖構成を調べた。

(1) Neutral/neutral な二次元電気泳動  
ゲノムDNAを制限酵素Bgl IIで切断し、一次元目の電気泳動を行った。次に、目的DNA分子を含む領域を切り出し、角度を90°変え、二次元目の電気泳動を中性条件下で行った。そして、サザンブロットングによってDNA分子を解析した。

(2) Neutral/alkali な二次元電気泳動  
ゲノムDNAを制限酵素Bgl IIで切断し、一次元目の電気泳動を行った。次に、目的DNA分子を含む領域を切り出し、角度を90°変え、二次元目の電気泳動をアルカリ条件下で行った。そして、鎖特異的なプローブを用いてサザンブロットングを行った。

#### 4. 研究成果

*ctf4* 変異体において蓄積していた異常な DNA 分子を neutral/neutral な二次元電気泳動によって解析したところ、この分子は完全な二本鎖 DNA よりも早い泳動度を示した (図 4)。この結果から、この分子は一本鎖 DNA 領域を含んでいる可能性が示唆された。

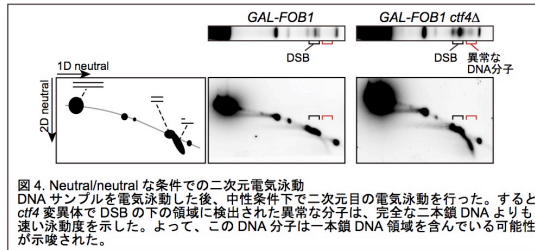


図 4. Neutral/neutral な条件での二次元電気泳動 DNA サンプルを電気泳動した後、中性条件下で二次元目の電気泳動を行った。すると *ctf4* 変異体で DSB の下の領域に検出された異常な分子は、完全な二本鎖 DNA よりも早い泳動度を示した。よって、この DNA 分子は一本鎖 DNA 領域を含んでいる可能性が示唆された。

次に、この分子の鎖構成を調べるために、neutral/alkali 条件下で二次元電気泳動を行った。まず二本鎖 DNA プローブで検出すると、この分子は DSB と同じ長さの鎖とそれよりも短い鎖から構成されていることが判明した (図 5)。次に、鎖特異的にアニールする一本鎖 DNA プローブを用いて解析をしたところ、この分子の 3'鎖は DSB と同じ長さを示し、5'鎖はそれよりも短い鎖であった (図 5)。これらの結果から、この分子は DSB の 5'鎖が削られてできた分子であることが明らかとなった。

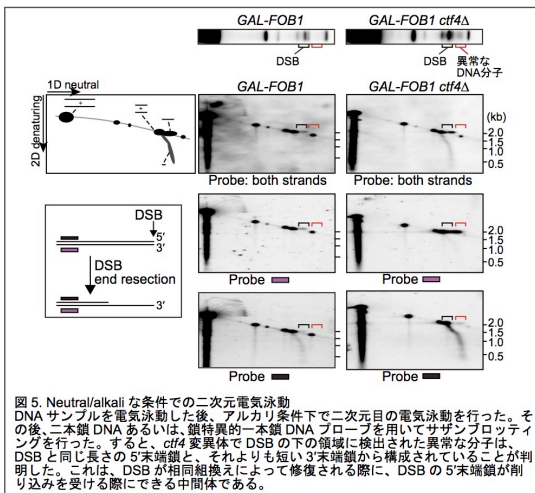


図 5. Neutral/alkali な条件での二次元電気泳動 DNA サンプルを電気泳動した後、アルカリ条件下で二次元目の電気泳動を行った。その後、二本鎖 DNA あるいは鎖特異的な一本鎖 DNA プローブを用いてサザンブロットングを行った。すると、*ctf4* 変異体で DSB の下の領域に検出された異常な分子は、DSB と同じ長さの 5'末端鎖と、それよりも短い 3'末端鎖から構成されていることが判明した。これは、DSB が相同組換えによって修復される際に、DSB の 5'末端鎖が削り込みを受ける際にできる中間体である。

このような分子は、DSB が相同組換えによって修復される際に産生される中間体である。*ctf4* 変異体においてこのような削り込みを受けた DSB が蓄積していたということは、DSB は相同組換えによって修復される可能性を示唆している。対照的に、野生型では削り込みを受けた DSB がほとんど産生されていない。このことは、野生型では相同組換えに依存しない経路によって DSB が修復されていることを示唆している。

これらの可能性を調べるために、野生型と *ctf4* 変異体において、相同組換え因子が DSB 修復に必要なかどうかを調べた。すると、DNA 損傷応答機構の中心的役割を果たす

Mre11-Rad50-Xrs2 複合体が欠損すると、野生型でも *ctf4* 変異体においても DSB 修復欠損が見られた (図 6)。よって、Mre11-Rad50-Xrs2 複合体は Ctf4 タンパク質の有無に関わらず、DSB 修復に必要なであった。次に、DSB 末端の削り込みを制御し相同組換えを開始する際に必要である Sae2 タンパク質の必要性を調べた。すると野生型は Sae2 を欠失しても正常に DSB を修復していたが、*ctf4* 変異体は Sae2 が欠失すると DSB 修復欠損を示した。よって、野生型では相同組換えに依存していない経路によって DSB は修復されているのに対して、*ctf4* 変異体では相同組換えに依存する経路で DSB は修復されることを明らかにした。

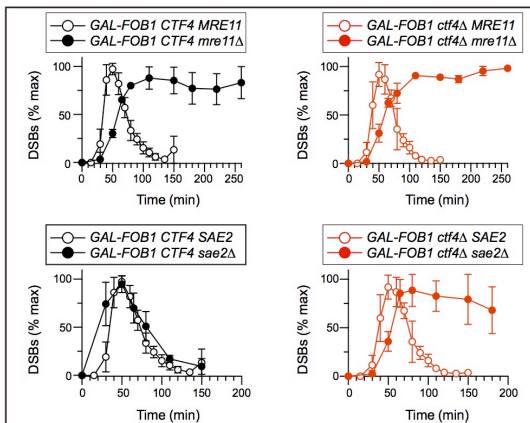


図 6. 野生型 (*CTF4*) と *ctf4* 変異体における DSB アッセイの結果 野生型 (*CTF4*) と *ctf4* 変異体において、DNA 損傷応答の中心的因子である Mre11-Rad50-Xrs2 複合体や相同組換え経路において DSB の削り込みを制御する Sae2 タンパク質が必要かどうかを調べた。

これらの結果から、(1) 複製阻害時の DSB は、通常、相同組換えに依存しない新規の経路によって修復される。今後、この新規 DSB 修復機構を明らかにしていくことが非常に重要であると考えている。(2) Ctf4 タンパク質が欠損したときのように DSB が相同組換えによって修復されると、rDNA の過剰増幅が起きた。よって、複製阻害時の DSB が誤って相同組換えによって修復されると、ゲノム不安定化が誘導される。(3) Ctf4 タンパク質は、複製装置の構成因子であり、これまで DSB 修復に関与するとは考えられていなかった。しかし本研究から、Ctf4 タンパク質は複製阻害時の DSB 形成時、その削り込みを抑制し相同組換え経路を抑制することによってゲノム安定性を守る重要な因子であることを明らかにすることができた。よって、複製阻害時の DSB 修復機構を明らかにするための重要な一歩を踏み出すことができたと考えている。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 4 件)

① 佐々木 真理子、小林 武彦

「レプリソームの構成タンパク質である Ctf4 は複製が阻害された際に生じる DNA 2 本鎖

切断の修復に重要である」  
First Author's、ライフサイエンス新着論文レ  
ビュー (2017)  
doi: 10.7875/first.author.2017.051 査読無し

② Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi  
Ctf4 prevents genome rearrangements by  
suppressing end resection of DNA double-strand  
breaks at arrested forks.  
Molecular Cell 66:533-545 (2017)  
doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.020 査読有り

③ Takehiko Kobayashi and Mariko Sasaki  
Ribosomal DNA stability is supported by many  
"Buffer genes" -Introduction to the Yeast rDNA  
Stability Database. FEMS Yeast Research 17:1-8  
(2017)  
doi: 10.1093/femsyr/fox001 査読有り

④ Kimiko Saka, Akihiro Takahashi, Mariko  
Sasaki and Takehiko Kobayashi.  
More than 10% of yeast genes are related to  
genome stability and influence cellular  
senescence via rDNA maintenance.  
Nucleic Acids Research 44:4211-4221 (2016)  
doi: 10.1093/nar/gkw110 査読有り

[学会発表] (計 8 件)

① 佐々木 真理子  
DNA 複製阻害時の DNA 二重鎖切断修復機構  
国立遺伝学研究所・研究集会「染色体機構と  
安定化を担う分子機構」、2017

② 佐々木 真理子  
DNA 複製阻害時の DNA 二重鎖切断修復機構  
東京大学分子細胞生物学研究所シンポジウ  
ム「生命科学の若手フロンティア」、2017

③ 佐々木 真理子、小林 武彦  
DNA 複製阻害時の DNA 二重鎖切断修復機構  
の解明  
日本遺伝学会第 89 回大会、2017

④ Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi.  
A replisome component Ctf4 suppresses end  
resection of DNA double-strand breaks at the  
arrested forks to prevent chromosome  
rearrangements. The 10th 3R International  
Symposium. 2016

⑤ 佐々木 真理子、小林 武彦  
DNA 複製阻害によって生じる DNA 二重鎖切  
断修復機構の解明  
日本遺伝学会第 88 回大会、2016

⑥ Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi.  
A replisome factor Ctf4 protects  
replication-associated DNA double-strand breaks  
from rearrangement-prone homologous  
recombination. Mechanisms of Recombination.  
2016

⑦ 佐々木 真理子、小林 武彦  
出芽酵母 Ctf4 による複製阻害に伴う DNA 二  
重鎖切断形成及び修復制御  
第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショ  
ップ、2015

⑧ Mariko Sasaki, Kimiko Saka and Takehiko  
Kobayashi.  
Mechanism by which the *Saccharomyces  
cerevisiae* Ctf4 protein prevents rDNA  
hyper-amplification. FASEB Genetic  
Recombination & Genome Rearrangements.  
2015

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://lafula-com.info/kobayashiken/CytoGen/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

佐々木 真理子 (Sasaki, Mariko)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・助教  
研究者番号: 5 0 7 2 2 0 1 3

(2)研究分担者 なし

(3)連携研究者 なし

(4)研究協力者 なし