

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15160

研究課題名(和文)複製因子Ctf4タンパク質が複製阻害に伴うDSBを正確に修復する分子機構の解明

研究課題名(英文) Understanding the mechanisms by which a replisome component Ctf4 promotes proper repair of DNA double-strand breaks at arrested replication forks

研究代表者

佐々木 真理子 (Sasaki, Mariko)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：50722013

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、複製装置の構成因子であるCtf4タンパク質が複製阻害時に生じるDNA二本鎖切断(DNA double-strand break, DSB)の修復を促進する分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。そして、複製因子や相同組換えによるDSB修復経路に関わる因子の中から、野生型と比べてctf4変異体において結合量が変化している因子を同定した。さらに、複製阻害時のDSB修復においてCtf4と一緒に作用するパートナー因子を同定することができた。今後これらの因子の作用機構を明らかにすることによって、Ctf4タンパク質がDSB修復を制御する分子機構を明らかにしていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA複製は、遺伝情報を正確に伝達するために必須である。しかし複製装置の進行はゲノム上の様々な障害によって止まる。複製阻害が起きると、最も危険なDNA損傷であるDNA二本鎖切断(DNA double-strand break, DSB)ができやすくなりゲノム不安定化が誘導されるが、その修復機構は不明である。申請者は先行研究から、複製装置の構成因子であるCtf4タンパク質がDSB修復に必要であることを明らかにした。本研究課題ではCtf4タンパク質の作用過程やDSB修復時に必要なパートナー因子を明らかにしたことから、Ctf4タンパク質の作用機構を探る上で重要な成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to understand the molecular mechanisms by which Ctf4 protein promotes proper repair of DNA double-strand breaks (DSBs) formed upon replication inhibition. To this end, I compared the levels of replisome factors and homologous recombination factors bound around DSBs by chromatin immunoprecipitation and identified factors whose association levels are altered in the absence of Ctf4. Furthermore, I identified the Ctf4-interacting protein that may function together with Ctf4 during DSB repair. I will examine in a future study how these factors collaborate together with Ctf4 to regulate DSB repair.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA複製阻害 DNA二本鎖切断 Ctf4 ゲノム再編成 ゲノム不安定化 rDNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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引き継ぐための生物の根源的機構である。しかし、DNA上にはDNA損傷、タンパク質、転写装置、DNAの異常な二次構造など様々な障害が存在するため、複製装置の進行は頻りに止まる(図1)。このような障害が解消されない状況が続くと、DNA二本鎖切断(DNA double-strand break; DSB)ができやすくなる。DSBは誤って直されると、ゲノム配列の重複、欠失、染色体転座などのゲノム再編成を誘導し、癌や多くのゲノム疾患を引き起こす。よって、DSB修復機構を理解することは、生物が健康に生きていくために獲得した戦略を理解する上で非常に重要である。

DSBは、細胞周期の進行において異なる頻度で生じる。G1期やG2/M期では、DSBは低い頻度でしか生じない。しかし配列特異的エンドヌクレアーゼを発現させて強制的にDSBを誘導させる実験から、G1期ではDSB末端を直接つなぎ合わせる非相同末端結合によって、G2/M期では非相同末端結合あるいは姉妹染色分体上の相同配列を用いた相同組換え経路によってDSBは修復されることがわかっている。しかしDSBはS期において複製障害によって最も頻りに生じるが、複製障害はゲノム上のランダムな場所で起こることが多くこの修復過程を解析することが困難であった。よってこの問題を解決するためには、複製障害によるDSBが高頻度で生じるゲノム領域を探さなければならない。

申請者は先行研究において、出芽酵母のリボソームRNA(rDNA)領域は部位特異的な複製障害及びDSBが高頻度で起きる、真核生物のゲノムの中でも非常に稀な領域であることに着目した。rDNAは、100コピー以上存在するリピート配列である。rDNA配列内には、リボソームRNA転写ユニットの他に複製開始点と複製障害点が存在する(図2A)。rDNAの複製は、Fob1タンパク質が複製障害点に結合することによって阻害され、その結果サザンブロットティングによって検出できるほど高い頻度でDSBが生じる(図2A)。さらに、DSB修復に伴ってrDNA配列の増幅や欠失が起こると考えられているが、その修復機構は十分に理解されていない。

申請者は先行研究において、異常なrDNAコピー数変動を起こす遺伝子欠損株を探索するスクリーニングを遂行した(Saka et al., Nucleic Acids Research 2016; Kobayashi and Sasaki, FEMS Yeast Research 2017)。その結果、複製装置の構成因子をコードするctf4遺伝子欠損株では、複製障害に依存したrDNA増幅が起きていることを明らかにした(図2B)。DSB修復過程を解析したところ、Ctf4タンパク質はS期では、相同組換え反応を開始するために起こるDSB末端の削り込みを抑制し、ゲノム再編成を誘導しやすい相同組換えによるDSB修復を抑制していることを明らかにした(Sasaki and Kobayashi, Molecular Cell 2017)。

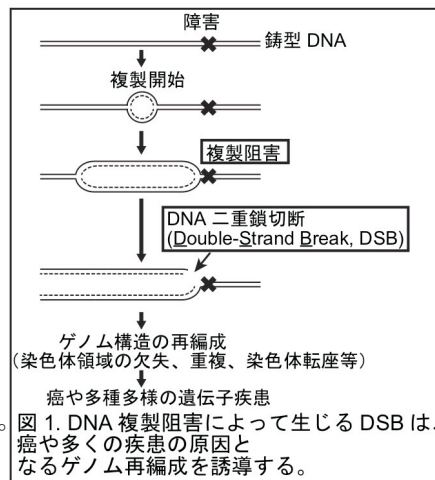


図1. DNA複製障害によって生じるDSBは、癌や多くの疾患の原因となるゲノム再編成を誘導する。

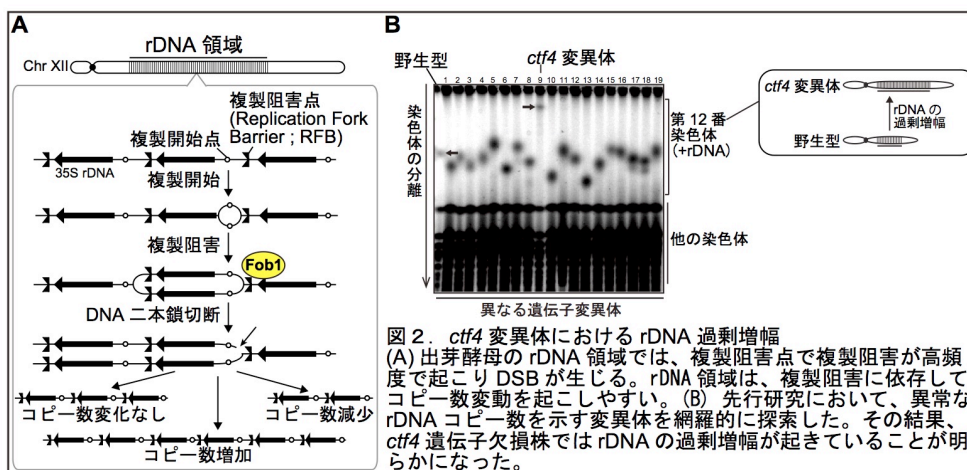


図2. *ctf4*変異体におけるrDNA過剰増幅 (A) 出芽酵母のrDNA領域では、複製障害が高頻度で起こりDSBが生じる。rDNA領域は、複製障害に依存してコピー数変動を起こしやすい。(B) 先行研究において、異常なrDNAコピー数を示す変異体を網羅的に探索した。その結果、*ctf4*遺伝子欠損株ではrDNAの過剰増幅が起きていることが明らかになった。

2. 研究の目的

本研究課題では、Ctf4タンパク質がどのような分子機構でDSB末端の削り込みを抑制しDSB修復を促進しているかを解明することを目指す。

3. 研究の方法

研究目標1: 野生型と*ctf4*変異体においてDSB部位に結合している複製因子および相同組換え因子の量を比較する

Ctf4タンパク質は、DNA複製において鋳型鎖を解離するヘリカーゼとラギング鎖合成の開始を担うDNAポリメラーゼαを共役させる役割が知られている(図3A)。よってCtf4タンパク質

は、これらの複製因子をDSB部位につなぎとめることによって、相同組換え因子がDSB末端に呼び込まれることを防いでいるという仮説を立てた(図3B)。この仮説を検証するために、クロマチン免疫沈降法を用いて、複製因子や相同組換え因子の結合量を解析する。

研究目標2: DSB修復に
与する Ctf4 タンパク質の相
互作用因子を同定する

Ctf4 タンパク質は、様々な機能を示すタンパク質と相互作用することが知られている。よってこれらの因子を複製装置に呼び込むことにより、DSB修復を促進している可能性が考えられる(図3B)。そこで、どの因子との相互作用がDSB修復に重要なのかを明らかにする。

4. 研究成果

研究目標1: 野生型と *ctf4*
変異体において DSB 部位に
結合している複製因子およ
び相同組換え因子の量を比
較する。

クロマチン免疫沈降法を用いて

DNAポリメラーゼε (Pol 2): リーディング鎖の合成を担う

DNAポリメラーゼα (Pol 1): 複製開始時およびラギング鎖合成時にプライマーを合成する

複製ヘリカーゼ (Cdc45): 鋳型DNAを解離する

Mre11: DSB末端の削り込みを開始する

Rad52: 相同組換え反応の中心的な役割を果たす

などの結合量を調べたところ、野生型と *ctf4* 変異体において結合量の変化が生じている因子がいくつか見つかった(未発表)。よって今後は、この変化が *ctf4* 変異体におけるDSB修復異常の直接的な原因となるのかについて解析していく予定である。

研究目標2: DSB修復に
与する Ctf4 タンパク質の相
互作用因子を同定する

Ctf4 タンパク質は、DNA代謝に関与する多くの因子と結合することがわかっている。そこで、これらの結合パートナーを欠損させたときに、*ctf4* 変異体で見られる rDNA 過剰増幅あるいはDSB修復異常が見られるかどうかを解析した。その結果、DSB修復異常を見せた変異体は同定されなかったが、rDNA過剰増幅を示した変異体を同定することに成功した。今後、この因子の作用機構について解析していく予定である。

引用文献:

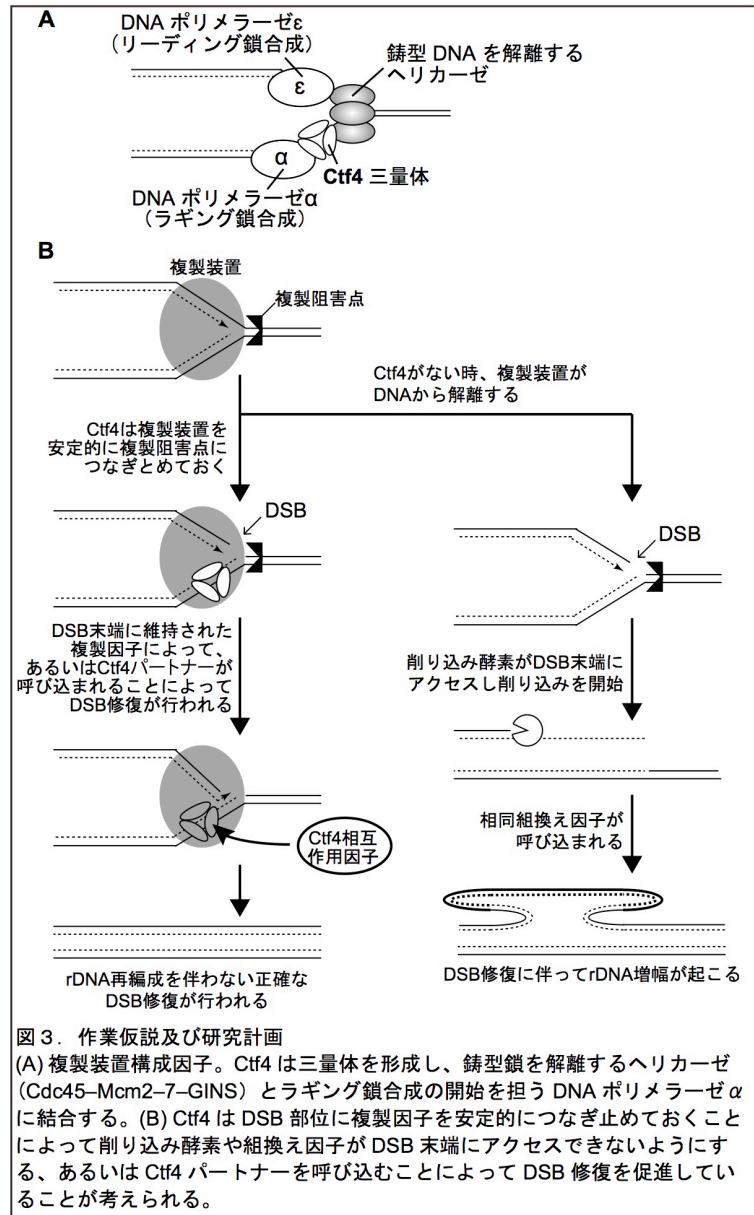
① Kimiko Saka, Akihiro Takahashi, Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi
More than 10% of yeast genes are related to genome stability and influence cellular senescence via rDNA maintenance. *Nucleic Acids Research* 44:4211-4221 (2016)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3件)

① **Mariko Sasaki** and Takehiko Kobayashi.

Ctf4 prevents genome rearrangements by suppressing DNA double-strand break formation and its end



resection at arrested replication forks. **Molecular Cell** 66:533–545 (2017) (査読あり) doi: 10.1016/j.molcel.2017.04.020.

②Takehiko 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). (査読あり) doi: 10.1093/femsyr/fox001.

③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 Authors、ライフサイエンス新着論文レビュー (2017) (査読なし) doi: 10.7875/first.author.2017.051

[学会発表] (計 5 件)

①**Mariko Sasaki** and Takehiko Kobayashi.

A replisome component Ctf4 suppresses end resection of DNA double-strand breaks at arrested replication forks. The 11th 3R+3C Symposium, Japan. (2018) (ポスター発表)

②佐々木 真理子

DNA 複製阻害時の DNA 二重鎖切断修復機構の解明
第 41 回日本分子生物学会、神奈川 (2018) (招待講演)

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 90 回大会、奈良 (2018) (口頭発表)

④**Mariko Sasaki** and Takehiko Kobayashi.

A replisome component Ctf4 suppresses end resection of DNA double-strand breaks at arrested replication forks. Gordon Research Conference Genomic Instability, Hong Kong. (2018) (ポスター発表)

⑤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、岡山 (2017.09) (口頭発表)

[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)研究分担者 なし

(2)研究協力者 なし

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。