

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11648

研究課題名（和文）転写は相同組換え経路のスイッチになりえるか

研究課題名（英文）Analysis of the contribution of transcription to homologous recombination pathway

研究代表者

逆井 良（SAKASAI, Ryo）

金沢医科大学・医学部・講師

研究者番号：10549950

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）：DNA二本鎖切断（DSB）の修復は、相同組換え（HR）と非相同末端連結（NHEJ）の2つが主要経路として知られる。修復経路の選択機構はいまだ不明な点が多いが、研究代表者らは、DNA切断端での一本鎖DNAが露出すること（DNA end resection）が、HR経路への重要な段階ととらえ、転写がresectionを促進している可能性を検討したところ、転写阻害によりHR関連因子のDNA損傷への集積が抑制された。しかし一方、anti-resection因子である53BP1の局在にも影響が認められ、単に転写がHRの促進に働くだけでなく、DNA損傷応答に広く関与している可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の細胞に含まれるDNAが放射線や抗がん剤によって切断されると強い毒性を引き起こすが、細胞はDNAを修復する機能を持つ。DNA切断の修復には「連結」と「組換え」の経路が知られているが、その使い分けについては不明である。DNA切断修復は、がん治療における放射線や抗がん剤の有効性や、将来の医学応用が期待されるゲノム編集機構と密接に関係しており、その理解が重要であると考えられる。研究代表者らは、転写が組換え経路を促進する可能性を考えて解析したところ、組換え関連因子のDNA切断への集積が抑えられた。また、組換えの抑制因子にも影響が認められ、転写がDNA損傷応答に広く関与している可能性が考えられる。

研究成果の概要（英文）：Two major pathways are known to repair DNA double-strand breaks (DSBs): the homologous recombination pathway (HR) and the non-homologous end joining pathway (NHEJ). Although the selection mechanism of the repair pathways is still unclear, we considered that the exposure of single-stranded DNA at the end of a DNA break (DNA end resection) is an important step toward the HR pathway, and that transcription or transcripts may promote resection. Analysis using transcription inhibitors showed that the accumulation of HR-related proteins in DSB sites was suppressed, suggesting that transcription is one of the regulatory factors of the HR pathway. In addition, the localization of 53BP1, an anti-resection factor, was also affected, suggesting that transcription is not only involved in promoting HR, but may also be widely involved in the DNA damage response.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DNA二本鎖切断 組換え修復 非相同末端連結 転写

1. 研究開始当初の背景

DNA二本鎖切断 (DSB) は、放射線や抗がん剤による癌治療やゲノム編集とも関連し、DSBの細胞内代謝機構を理解することは、DNA損傷応答研究のみならず、これら関連分野の研究においても重要となる。

DSBはHRとNHEJの大きく2つの経路で修復されるが、両経路の選択機構は未だに明確な答えは出ていない。NHEJは細胞周期による制御を受けないと考えられている一方、HR経路はS期からG2期で機能するため、SからG2期では経路を選択することになる。HRが進むためには、DNA切断端で一本鎖DNAを露出させるresectionが必要であり、resectionが起こるかどうか、経路選択の分かれ道になると考えられる(図1)。しかし、何がきっかけでresectionが起こるのかについては不明である。

研究代表者らは、転写およびR-loopがHRへ関与することを示唆するデータをすでに持っており、転写に依存したHR経路があると想像される。これに関連して、DSB周辺でsmall RNAの転写が起こることや、DSB周辺にDNA-RNA hybridが形成されていることが報告されている。また、クロマチンリモデリング因子の関与も報告されており、これらを合わせると、DSB周辺のクロマチン構造が緩むことで転写が促進され、一時的に形成されるR-loopや転写産物がresectionを促進し、HR因子がリクルートされる、という仮説が考えられる。

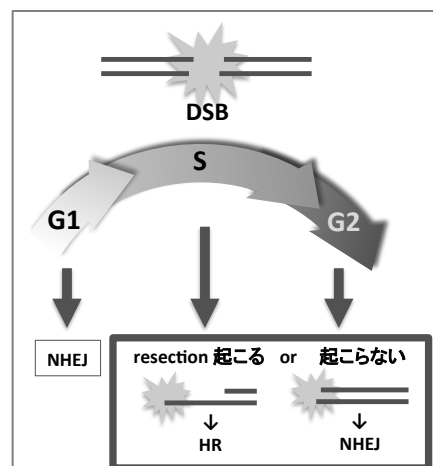


図1 細胞周期とDSB修復経路

SからG2期では、HR-NHEJ経路選択はresectionの有無で決まるが、resectionが起こるきっかけは分かっていない。

2. 研究の目的

近年のDSB修復の研究により、resectionの制御機構が詳細に解析されてきた。しかし、resectionがいつ、どのような機序で起こり、HRへと進むのかについてはほとんど明らかとなっていない。本研究では、DSB周辺での「転写」が、一時的なR-loopの形成を促し、loop構造をきっかけにresectionが起こるといった仮説を検証し、転写がHR経路へのスイッチになっているかどうかを明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

DSB周辺での転写がHR経路のスイッチになりえるかどうか検証するため、具体的には、Q1: R-loopはresectionの引き金になるのか? Q2: R-loopはどのようにして誘導および解消されるのか?の2点に関して、以下のような実験を計画した。

(1)-① 転写およびR-loopによるHR因子のリクルート

研究代表者らはすでに、転写阻害剤およびDNA-RNA hybridを排除するRNaseH1の過剰発現により、HRの責任因子Rad51のDSBへの集積が抑制されることを見出し、Rad51のリクルートがR-loop依存的であると考えられる。

そこで、Rad51より上流の、resectionに関わる因子や、転写やR-loopとの関連が言われているHR関連因子群について、DSBへの集積がR-loopに依存するかどうか、転写阻害細胞、および、RNaseH1過剰発現細胞において解析する。DSBへの集積は、DSB誘導後の免疫染色に加え、染色体内に導入された制限酵素I-SceIサイトにおけるChIP assayによっても解析する。申請者らは、I-SceIサイトをテトラサイクリン誘導型プロモーターとGFPの間に挿入した構造を持つ細胞(TetON-DSB細胞)をすでに樹立している。これにより、DSB周辺で転写のオン(GFP+)/オフ(GFP-)を制御でき、人為的に転写を活性化した場合の影響も、ChIP assayで解析する。

(1)-② R-loopによるDNA end resectionの促進

R-loopがresectionを促進するかどうか、転写阻害細胞、および、RNaseH1過剰発現細胞において解析する。resectionの解析は、あらかじめBrdUをゲノムDNAに取り込ませておき、resectionにより露出したssDNA領域だけを抗BrdU抗体による免疫染色によって行う。

さらに、R-loop構造が本当にresectionを促すのかどうか、in vitroでも解析する。R-loopを持つ基質と持たない基質をオリゴDNAおよびRNAを用いて合成し、核抽出液を用いて、resection反応が促進されるかどうか検討する。CtIPのノックダウンやRNaseH処理を組み合わせることで、R-loop依存的にCtIPによるresectionが進むかどうか、明らかにする。

(2)-① クロマチン構造変化による、転写およびR-loop形成の促進

研究代表者らは、DSB周辺でのクロマチン構造の変化が転写とR-loop形成を促し、resection

が起こるといふ仮説を考えている。そこで、クロマチン構造の変化が転写および R-loop の形成を促すかどうか、resection への関与が知られているクロマチンリモデリング因子を TetON-DSB 細胞でノックダウンし、RNA ポリメラーゼ II および DNA-RNA hybrid に対する抗体 (S9.6) により ChIP assay で解析する。

(2)-② R-loop プロセシング因子による HR への影響

BRCA2 の R-loop プロセシングへの関与が報告され、BRCA2 が DNA-RNA hybrid を解消させて過剰な resection を抑えていると考えられる。そこで、BRCA2 が DSB 周辺の DNA-RNA hybrid の解消に関わるのかどうか、BRCA2 ノックダウン細胞で、DNA-RNA hybrid に対する ChIP assay で解析する。また、DDX1 や Aquarius といった R-loop を解消する RNA ヘリカーゼ群のリクルートへの BRCA2 の関与についても同様に ChIP assay で解析する。

4. 研究成果

(1) 転写による HR 因子のリクルートおよび DNA end resection への影響解析

転写阻害剤を用いて検証した結果、HR 経路の責任因子 Rad51 の DNA 損傷への集積に、DSB に加え、シスプラチンでも強い影響が見られた。さらに、DNA 損傷応答因子である 53BP1 の集積にも影響が見られたことから、シスプラチンによる DNA 鎖間架橋 (ICL) に対しては、HR のみならず損傷応答のものにも転写が影響しうることが示唆された。そこで、ICL 応答への転写阻害剤による影響の解析を進めたが、転写阻害剤が DNA 複製を抑制してしまうことが明らかとなり、転写阻害剤を用いた複製ストレスへの細胞応答解析が困難となったため、複製ストレスに対する解析はこれ以上進めていない。DSB 応答においては、Rad51 以外の因子の集積も転写依存的であることを示唆するデータを得ている。また、DNA 損傷応答因子の集積をより明確に検討するため、laser microdissection を用いた核内局所への DSB 誘導系の確立を試み、現段階では DDR 因子の集積まで確認できており、この系を用いて転写の影響、および、転写装置自体のリクルートについて検証する予定である。これらの影響が R-loop の形成に依存するか検証するため、RNaseH1 を人為的に発現誘導できる細胞株を樹立した。テトラサイクリンによる RNaseH1 の発現誘導系は、RNaseH1 を内在性の 10 倍程度まで誘導できているが、それによる HR への影響は現段階では認められず、結論はできていない。

Tet プロモーターと I-SceI を組み合わせた DSB 誘導系による実験は、I-SceI-GFP カセットの挿入は済んでいるが、I-SceI の誘導系が未確立である。したがって、別のヌクレアーゼである I-PpoI を用いて誘導される DSB において、DDR 因子の ChIP assay の実験条件を検討しており、結果を得るにはもう少し検討が必要である。

DNA end resection が転写により促進されるかどうかは、本研究課題の中心的な問いであるが、BrdU による resection 検出については、実験条件を検討中である。Laser による DSB 誘導系が確立されれば、そちらでも検討可能だと考えている。研究の進展状況から、in vitro での resection の解析にはまだ至っていない。

(2) クロマチン構造および R-loop プロセシング因子による HR への影響解析

クロマチン構造と転写を介した DSB 応答の関係については、転写による影響解析が十分に進んでいないことから、まだ解析には至っていない。しかし、転写とクロマチン構造との関連を示唆する結果は出つつある (後述)。

R-loop プロセシング因子としては様々な因子がすでに報告されているが、BRCA1/2 もその中に含まれる。BRCA1 は 53BP1 との排他的な関係から、resection の制御のものにも関与すると考えられており、BRCA2 は従来の Rad51 のローディングに加え、R-loop のプロセシングという機能が言われ始めている。BRCA1 機能不全で且つ 53BP1 機能不全の細胞では、HR が回復し、PARP 阻害剤を含む抗がん剤が効かなくなることが知られている。これらの細胞では、BRCA1 非依存的な resection が起こるはずであり、転写が resection を促進するのであれば、転写依存度が上がっていると予想された。少なくとも現段階では、BRCA1/53BP1 ダブルノックダウン細胞では、Rad51 の集積に転写阻害剤による抑制が観察されている。ただ、細胞腫間で結果が一致しないものもあり、断定的な結論には至っていない。BRCA2 に関する研究にはまだ着手できていない。

R-loop プロセシング因子ではないものの、53BP1 についても解析を進めている。53BP1 は DSB に集積するが、時間経過とともに resection 部位を囲むようにドーナツ状に形態を変化させることが知られ、この現象が BRCA1 依存的であることも報告されている。そこで、転写が 53BP1 の局在に及ぼす影響を解析したところ、転写を抑えることで 53BP1 の集積が拡散するような像が観察された。BRCA1 ノックダウン細胞でも観察されることから、BRCA1 依存的な局在変化とは別の現象であると考えられる。また、RNaseA で処理しても 53BP1 の集積に影響はなかった。したがって、転写産物である RNA というよりは、転写を阻害することによるクロマチン構造への影響が、53BP1 の集積を不安定化させているという可能性が考えられた。そのような状況では、resection が起こりやすくなり、HR が促進されることが想像されるが、HR は転写阻害により抑制されることがわかっているため、転写が及ぼす 53BP1 の集積に対する影響と resection への影響を関連づけることは、現段階では難しいと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Misaki Matsui, Ryo Sakasai, Masako Abe, Yusuke Kimura, Shoki Kajita, Wakana Torii, Yoko Katsuki, Masamichi Ishiai, Kuniyoshi Iwabuchi, Minoru Takata, Ryotaro Nishi | 4. 巻 9 |
| 2. 論文標題 USP42 enhances homologous recombination repair by promoting R-loop resolution with a DNA-RNA helicase DHX9 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncogenesis | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-020-00244-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Okamoto Y, Iwasaki WM, Kugou K, Takahashi KK, Oda A, Sato K, Kobayashi W, Kawai H, Sakasai R, Takaori-Kondo A, Yamamoto T, Kanemaki MT, Taoka M, Isobe T, Kurumizaka H, Innan H, Ohta K, Ishiai M, Takata M. | 4. 巻 46 |
| 2. 論文標題 Replication stress induces accumulation of FANCD2 at central region of large fragile genes | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Nucleic Acids Research | 6. 最初と最後の頁 2932-2944 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky058. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 逆井良、松井理、砂谷優実、篠原彰、岩淵邦芳 |
| 2. 発表標題 Top1-DNAクロスリンクによる転写ストレス応答とその破綻 |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第63回大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 逆井 良、松井 理、砂谷優実、篠原 彰、岩淵邦芳 |
| 2. 発表標題 転写を介したDNA鎖切断に対するRecQL5の機能解析 |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 逆井 良、松井 理、砂谷優実、篠原 彰、岩淵邦芳 |
| 2. 発表標題 カンプトテシンによる転写ストレスに対するRecQL5の機能解析 |
| 3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Ryo Sakasai, Yumi Sunatani, Tadashi Matsui, Kuniyoshi Iwabuchi |
| 2. 発表標題 Repair pathways for one-ended DNA double-strand breaks caused by camptothecin |
| 3. 学会等名 Gordon Research Conference, Genome Instability (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 逆井 良、砂谷優実、松井 理、岩淵邦芳 |
| 2. 発表標題 One-ended DSBの修復経路の解析 |
| 3. 学会等名 第90回日本遺伝学会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 逆井 良、松井 理、砂谷優実、岩淵邦芳 |
| 2. 発表標題 One-ended DNA二本鎖切断の修復経路解析 |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会 第61回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢医科大学 医学部 生化学I
<https://kmu-bc1.jimdo.com/>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|