

令和 5 年 6 月 28 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(A)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19H01151

研究課題名（和文）生体環境からみたゲノム組換え修復に関する包括的理解

研究課題名（英文）Comprehensive Insights into DNA Recombinational Repair in the Human Genome

研究代表者

足立 典隆（Adachi, Noritaka）

横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科（八景キャンパス）・教授

研究者番号：30264675

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 29,100,000円

研究成果の概要（和文）：DNAの二本鎖切断は、細胞や個体にとって最も脅威となるゲノム損傷であり、速やかに修復される必要がある。本研究では、ヒトゲノム編集細胞を駆使した解析により、二本鎖DNA切断修復システムの全体像、特に2つのマイナーな修復経路alt-EJとSSAの分子機構と生理的意義を明らかにすることを目的として研究を行い、多くの新規知見を得た。また、組換え修復の個々の活性を定量的に評価できる系を利用して特定の化学物質が及ぼす影響を解析し、いくつかの興味深い知見を得るに至った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二本鎖DNAの切断は、細胞や個体にとって最も脅威となるゲノム損傷である。したがって、DNA切断の発生機構とその修復機構の解明は極めて重要であり、化学物質の影響評価においても優先的に考慮されるべき生命現象の一つである。本研究では、二本鎖DNA切断修復システムの全体像をヒトゲノム編集細胞を駆使して明らかにするとともに、生体環境の影響についても解析することでその包括的な理解を目指した。本研究の成果は、DNA修復機構の基本的理解や環境化学物質の評価にとどまらず、放射線や抗がん剤によるがん治療戦略など、幅広い分野への波及効果も期待できる。

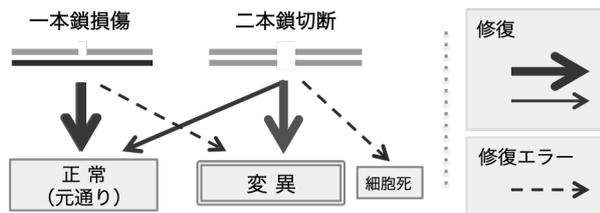
研究成果の概要（英文）：DNA double-strand breaks (DSBs) are the most threatening genomic damage to cells and individuals and must be repaired promptly. In this study, we aimed to elucidate the entire DSB repair system, especially the molecular mechanisms and physiological significance of two minor repair pathways, alt-EJ (aka TMEJ) and SSA, by utilizing human gene-knockout cell lines, which led us to obtain many novel findings. We also analyzed the effects of specific environmental chemicals by using a system that can quantitatively evaluate the individual activities of DNA recombinational repair, leading to several interesting findings.

研究分野：分子生物学

キーワード：組換え修復 DNA切断 生体環境 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

細胞のゲノム DNA はさまざまな内的・外的要因により絶えず損傷を受けており、とりわけ DNA 二本鎖切断 (double-strand break; 以下 DSB) は生体にとって最も脅威となる DNA 損傷である。DSB が危険である理由はその変異原性の高さにある。すなわち、無傷の相補鎖を鋳型に用いて行われる一本鎖損傷修復とは異なり、DSB の場合、相同組換え (homologous recombination; 以下 HR) で修復されない限り、たとえ正しいプロセスで修復が行われてもほぼ必ずゲノム DNA 中に変異が残る。通常 DSB は、HR もしくは非相同末端連結 (non-homologous end joining; 以下 NHEJ) によって効率良く修復されるが、これら主要経路とは全く異なる修復機構も存在する。一つは alternative end-joining (以下 alt-EJ と記すが最近では TMEJ と呼ばれる)、もう一つは一本鎖アニーリング (single-strand annealing; 以下 SSA) であるが、こうしたマイナーな修復経路のメカニズムや生理的意義についての詳細は不明である。また、これら4種類の組換え修復経路が細胞内でどのように使い分けられているのか、特に、どのような状況下でマイナーな経路が実際に修復に携わる(ことができる)のか等、未解決の課題が数多く残されている。これらの課題を明らかにしていくことは、創薬医療分野への応用に向けたゲノム DNA 切断修復機構の全容解明のみならず、環境化学物質が及ぼす生体への影響を正確に評価していくうえでも重要なテーマである。



2. 研究の目的

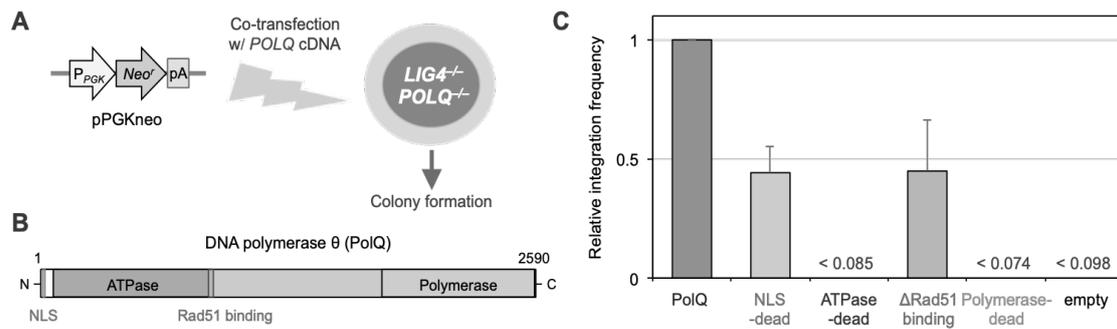
ゲノム DNA の二本鎖切断は、細胞や個体にとって最も脅威となる DNA 損傷であり、速やかに修復される必要がある。しかしその詳細なメカニズムには不明な点が多く残されている。本研究では、ヒトゲノム編集細胞を駆使した逆遺伝学的解析により、DNA 二本鎖切断修復システムの全体像、特に2つのマイナーな修復経路 alt-EJ と SSA の分子機構と生理的意義を明らかにすることを目的として研究を行った。また、組換え修復の個々の活性を定量的に評価できる系を利用して、重金属やその他の化学物質による影響を解析し、生体環境からみた組換え修復機構についての包括的な理解を目指した。

3. 研究の方法

上述の研究目的を達成するべく、本研究ではヒト Nalm-6 細胞を主材料に用いてゲノム編集細胞 (遺伝子ノックアウト変異株) を作製し、個々の遺伝子機能解析および組換え修復頻度の解析を行った。変異株の構築には人工ヌクレアーゼを使用せず、標的組換えによる遺伝子破壊を利用した。また必要に応じて各遺伝子の発現ベクターを構築し (種々の変異型発現ベクターも含む)、遺伝子ノックアウト変異株への add back を行った。表現型の検証には阻害剤を用いた解析や siRNA/shRNA を用いたノックダウン解析も必要に応じて行った。また、細胞内タンパク質の挙動についてはライブセルイメージングを用いてゲノム損傷部位への集積をリアルタイムで定量解析した。組換え部位の解析においては各アッセイで得られた組換え体における末端連結部位のシーケンス解析を網羅的に行い、MMEJ 型 (2~6 塩基対のマикроホモロジーを利用した連結) と非 MMEJ 型 (ヌクレオチド挿入を伴う連結)、SSA 型 (MMEJ 型よりも長い相同性を利用した末端連結) の3種に分類し特徴づけを行った。重金属やその他の環境ホルモン様化学物質の影響については、これらをゲノム編集ヒト細胞に曝露した際の表現型の変化をもとに調べた。薬剤感受性試験やレポーター遺伝子を用いた組換えアッセイに加え、独自の遺伝子挿入頻度解析系 (NHEJ と alt-EJ を同時に欠損させるとランダム挿入が全く起こらなくなるという自身の発見を利用したアッセイ系) により各組換え修復の効率を定量的に求めた。

4. 研究成果

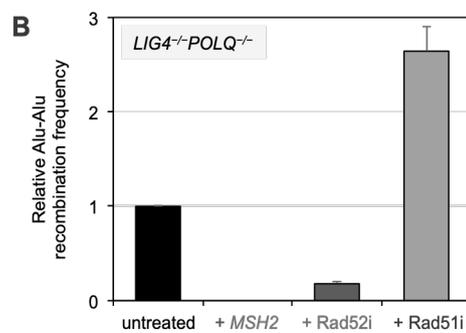
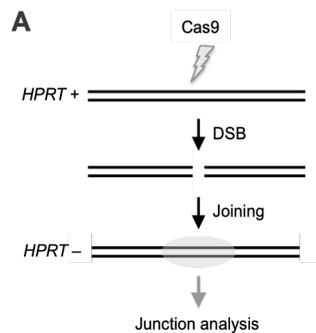
(1) alt-EJ の解析: alt-EJ の反応に必要なタンパク質として DNA ポリメラーゼ θ (以下 PolQ) が同定されている。この酵素は ATPase 活性を有する唯一の DNA ポリメラーゼであり、Polymerase domain に特殊な3つのインサート領域 (Ins1, Ins2, Ins3) を含むというユニークな特徴を有している。こうした活性や特殊領域が酵素活性や alt-EJ に重要かどうかはわかっていなかったが、本研究では、DNA ポリメラーゼ活性に加え、ATPase 活性が PolQ の機能に必要な役割を果たしていること、また Polymerase domain 中の3つのインサート領域は酵素活性に重要であるが、細胞内で欠損させても alt-EJ の一部にしか影響を与えないという興味深い結果を得ることができた (すなわち、MMEJ 型と非 MMEJ 型への影響に有意な違いが認められた)。さらに、こうした領域が他の DNA 修復経路の効率にも影響を及ぼしているという予想外の結果も得られた。こうした成果は国内外でいまだ報告されておらず、学術的価値はきわめて高い。細胞内での DNA 損傷に応じた PolQ タンパク質の集積を調べたところ、PARP1 依存性の



集積に加え、PARP1 非依存性の集積が起こることがわかったため、alt-EJ と他経路との関連についてのさらなる解析をつづけている。alt-EJ に必須な PolQ 以外のタンパク質の探索を試みているが、成功には至っていない。

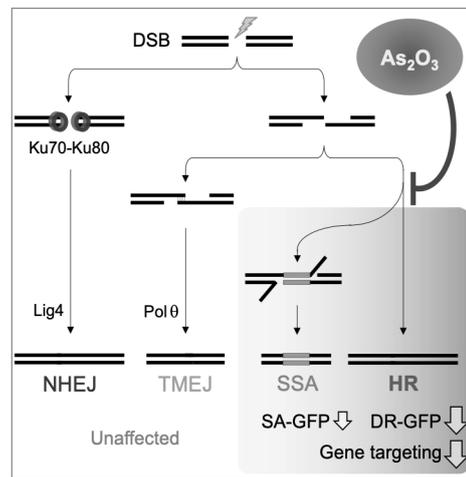
(2) SSA の解析：SSA 反応に必須なタンパク質として Rad52 が同定されている。本研究では Rad52 タンパク質がすべての SSA 反応に必須ではないという確固たる証拠を掴むことができた。また、欠損時に Rad52 よりも SSA 効率を著しく低下させる遺伝子を複数同定することができた。SSA の低下によって HR 頻度が上昇すること、また、NHEJ の欠損によって SSA 頻度が有意に上昇するなど、各修復経路のクロストークをヒト細胞で明らかにすることができたことの意義は大きい。一方、ミスマッチ修復の欠損によって SSA、特に Alu-Alu 組換え（離れた2つの Alu 配列の間で起こる“homeologous”な組換え反応）の頻度が著しく上昇することも突き止めた。

NHEJ と alt-EJ を同時に欠損した細胞ではさらに顕著な組換え頻度の上昇がみられた。また、HR を阻害した場合も 2~3 倍程度の上昇がみられた。Alu-Alu 組換えはがんや遺伝病の



直接的原因となる危険な組換えであるため、こうした組換えがどのような制御を受けているかを解明していくことは反復配列に富んだヒトゲノムがいかに安定に維持されているかを理解するうえで重要な課題であり、今後さらなる解析が必要である。

(3) 組換え修復への環境化学物質の影響：重金属による生体への影響については、古くからの公害問題などもあり一般人の関心も高い。近年では電子タバコの蒸気に相当量の重金属（ヒ素、カドミウムなど）が含まれていることも報告されている。本研究では、ヒ素 (As_2O_3) が、DNA 切断を誘発しない濃度において DSB 修復に影響を与えることを明らかにした。具体的には、SSA を弱く、HR を強く抑制することを突き止め、さらに PARP 阻害剤に対する感受性を増大させるという興味深い知見を得た。ヒ素と同様に、カドミウム ($CdCO_3$) にも濃度依存的な殺細胞効果がみられたが、HR ではなく他経路に影響を及ぼしており、特に SSA の促進に関わっている可能性が強く示唆された。



一方、各種ホルモンについての解析を進めたところ、女性ホルモン（エストロゲン）に DSB 誘発作用があること、また HR を抑制する効果も併せもっていることを見いだした。エストロゲンによる他の修復経路への影響はみられなかった。こうした研究成果は、HR 欠損が婦人科がんの原因になりやすい理由の一端を示しているだけでなく、DNA 損傷の発生そのものも含めた幅広い観点から環境化学物質の評価を行っていくことの必要性を示しており、現在さらに解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Suzuki T, Sassa A, Gruz P, Gupta RC, Johnson F, Adachi N, Nohmi T.	4. 巻 100
2. 論文標題 Error-prone bypass patch by a low-fidelity variant of DNA polymerase zeta in human cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 DNA Repair (Amst)	6. 最初と最後の頁 103052
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.dnarep.2021.103052	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 該当する

1. 著者名 Kurosawa A, Kuboshima H, Adachi N.	4. 巻 287
2. 論文標題 Complex genetic interactions between DNA polymerase and the NHEJ ligase.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 377-385
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/febs.15012	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kurosawa A, Saito S, Sakurai M, Shinozuka M, Someya Y, Adachi N.	4. 巻 290
2. 論文標題 Arsenic affects homologous recombination and single-strand annealing but not end-joining pathways during DNA double-strand break repair	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 FEBS J.	6. 最初と最後の頁 (in press)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 足立典隆、他
2. 発表標題 Functional analysis of human WHSC1 in DNA double-strand break repair
3. 学会等名 日本環境変異原学会第49回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 足立典隆、他
2. 発表標題 DNA polymerase theta is essential for alternative end-joining
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 足立典隆
2. 発表標題 Introduction & Defining the mutation signatures of DNA polymerase in cancers
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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		
韓国	UNIST		
米国	USC	UCI	