

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06760

研究課題名(和文) 遺伝学によるBLM-TOP3alpha-RMI1-RMI2複合体の作用機序の解明

研究課題名(英文) Genetic analysis of BLM-TOP3alpha-RMI1-RMI2 complex

研究代表者

阿部 拓也 (Abe, Takuya)

東京都立大学・理学研究科・助教

研究者番号：50779999

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)：本研究では相同組換え機構において生じるDNA鎖の絡まりを解消する「BLM-TOP3alpha-RMI1-RMI2 (BTR) 複合体」の遺伝学的関係性を明らかにすることで相同組換え機構の理解を深めることを目指した。その結果、RMI1/RMI2間での合成致死性を発見し、さらにその合成致死性がBLMを欠損させることで抑制されることを見出した。既に酵母を用いた研究で得られている結果も踏まえると、BTR複合体による相同組換え制御機構は、酵母から高等真核生物まで高度に保存された機構であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BTR複合体を構成するタンパク質をコードする遺伝子の変異はブルーム症候群などの遺伝病の原因となる。これらの遺伝病ではありとあらゆる癌の発生頻度が上昇することから、BTR複合体の機能を理解することは、癌の発生メカニズムの解明、そしてその予防にとっても重要である。本研究で明らかにしたBTR複合体における遺伝学的関係性は今後さらにBTR複合体の機能の詳細を解明するための基盤となるものである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to understand the mechanism of homologous recombination by clarifying the genetic relationship of the BLM-TOP3alpha-RMI1-RMI2 (BTR) complex, which resolves the DNA strand entanglements produced during homologous recombination process. As a result, we found synthetic lethality between RMI1/RMI2 and revealed that the synthetic lethality was suppressed by deletion of BLM. Considering the results obtained in yeast, it became clear that the regulation of homologous recombination by the BTR complex is a highly conserved mechanism from yeast to higher eukaryotes.

研究分野：分子生物学、遺伝学

キーワード：染色体安定性 DT40 BLM RMI1 RMI2

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

相同組換えは、相同性の高い塩基配列を持つ DNA の間で起こる DNA の組換えで、DNA 二本鎖が断裂した際の修復や、減数分裂時に起こる遺伝的組換えなど、生体内で遺伝情報の保持や組換えに関わっている。相同組換えでは、反応の途中で DNA 鎖同士が交換する形となるため、この構造の解消のされ方により DNA 鎖の交差が起こる場合と起きない場合がある。交差は、場合によってはヘテロ接合性の消失による、がん抑制遺伝子の喪失にもつながるため適切に制御される必要がある。この DNA 鎖の交差を抑制する主要な因子と考えられているのが BLM-TOP3 α -RMI1-RMI2 複合体 (BTR 複合体) である (図 1)。BTR 複合体の TOP3 α は DNA の切断と再結合を行い、RMI1/RMI2 は、BTR 複合体の DNA への結合に関わることが報告されている。酵母で BTR 複合体に対応するのは Sgs1-Top3-Rmi1 複合体である。Top3 や Rmi1 を欠損すると著しい細胞増殖能の低下や染色体不安定性が観察されるが、興味深いことにこれらの異常は Sgs1 を同時に欠損すると抑制される (Gangloff et al., Mol Cell Biol 1994)。このことから Top3-Rmi1 が機能するためには、それに先立って Sgs1 ヘリカーゼが DNA をまき戻す必要があり、Sgs1 がなければ Top3 は働くことができず、代わりに Mus81 などのヌクレアーゼが DNA を切断し、組換え中間体を解消すると考えられている。しかしながら高等真核生物における組換え中間体の解消機構が酵母のそれと同じなのか、否かについては未解明なままであった。

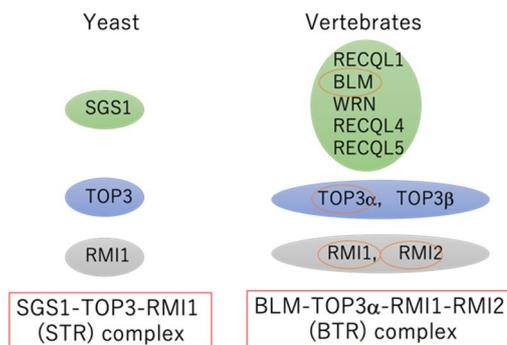


図1
酵母と高等真核生物におけるBTR複合体構成タンパク質、及びそのファミリータンパク質の相対関係を示した。本研究において遺伝学的関係性を確かめた4つのタンパク質について赤丸で囲った。

2. 研究の目的

酵母において *Sgs1* の欠損が *Top3* 欠損株の表現型を抑制することが発見されたのは 25 年前であったにもかかわらず、動物細胞では、BTR 複合体を形成する因子の機能的関係に関する遺伝学的な解析があまり進んでいなかった。その原因としては *TOP3 α* が動物細胞では生存に必須の遺伝子であり、ニワトリ DT40 細胞でしか条件欠損株が作製されていなかったこと、*RMI1* に関してはいずれの動物細胞においても条件欠損株が作製されていなかったことが挙げられる。そのため本研究では **DT40 細胞の多重遺伝子欠損株を用いた遺伝学によって BTR 複合体の構成因子の機能的関係を明らかにし、相同組換えにおける DNA 鎖の交差抑制機構を明らかにすることを目的とした。**

3. 研究の方法

私は本研究の準備段階において、目的タンパク質の分解を誘導するオーキシンドグロンシステム (AID システム, Nishimura et al., Nat methods 2009) を用いて *RMI1* 条件欠損株の作製に成功した。この *RMI1* 条件欠損株にさらに *RMI2* 遺伝子や *BLM* 遺伝子の破壊を行うことで多重遺伝子欠損株を作製し、それらの細胞株の表現型解析を行った。

4. 研究成果

(1) *RMI1* と *RMI2* の同時欠損による合成致死性の発見

RMI1/RMI2 条件二重欠損株の作製により、この両者を欠損した細胞が合成致死となることを見出した (図 2A)。また二重欠損細胞が死にゆく際には、細胞周期の G2/M 期への蓄積、染色体分配の異常、DNA 二本鎖切断・染色体異常の増加 (図 2B) が観察され、これらの異常が合成致死の原因となっていると考えられた。*RMI1/RMI2* 条件二重欠損株の表現型は *TOP3 α* 欠損株の表現型と酷似しており、*RMI1/RMI2* が同時に欠損することと *TOP3 α* が欠損することがほぼ同義であることが示された。一方、*RMI1/RMI2* 二重欠損細胞株の致死性は相同組換え因子の一つである *XRCC3* を欠損させることにより部分的に抑制された。このことから *RMI1/RMI2* は *XRCC3* を含む相同組換え経路の下流で機能することが示された。

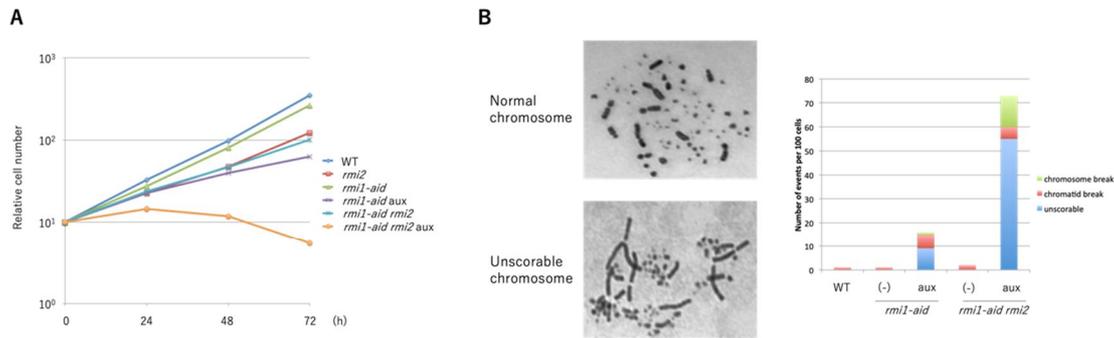


図2
A, 細胞の増殖曲線。RMI1/RMI2 二重欠損細胞では細胞が増殖しなくなり、致死となる。
B, RMI1/RMI2 二重欠損細胞で観察される染色体異常の例 (左) とその定量結果 (右) を示した。二重欠損細胞では染色体の断裂に加え、定量化することのできない複雑な染色体構造が観察される。

(2) BLM 欠損による RMI1/RMI2 の合成致死性の抑制の発見

酵母において *Sgs1* (BLM のホモログ) の変異が RMI1 欠損細胞の表現型を抑制するサプレッサーとなることが報告されている。そこでこの遺伝学的関係性が高等真核生物においても保存されているかどうかを確かめるために RMI1/RMI2 二重条件欠損株においてさらに BLM を欠損させ、三重欠損株を作製した。その結果、この三重欠損株は生存可能であり (図 3)、さらに RMI1/RMI2 二重欠損株において観察された染色体異常もまったく見られなくなった。このことから RMI1/RMI2 の非存在化では BLM が細胞にとってトキシックな DNA 構造を作り出していること、RMI1/2 と BLM の関係性は酵母から高等真核生物まで高度に保存されていることが明らかになった。

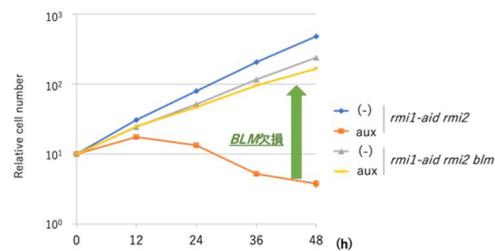


図3
細胞の増殖曲線。RMI1/RMI2 二重欠損細胞が致死なのに対し、RMI1/RMI2/BLM 三重欠損細胞は生存可能となる。

(3) BLM の毒性発現機構の解明

RMI1/RMI2/BLM 三重欠損株の解析から BLM の細胞に対する毒性が示唆された。そこで RMI1/RMI2 二重欠損株において、逆に BLM を過剰に発現することによる細胞への影響を確認した。その結果、BLM 過剰発現によって、細胞数の低下 (図 4)、染色体の断裂、染色体分配の異常などはさらに上昇した。また RMI1/RMI2 非存在下では BLM は間期に核内で foci を形成し、さらにこの foci は DNA 二重鎖切断のマーカである γ -H2AX と完全に共局在したことから、BLM によって DNA 二重鎖切断が誘導されることが示された。RMI1/RMI2 が存在している場合でも BLM が大過剰に存在すると細胞にとって悪影響があるのかどうかを確かめるため、野生株において Tet on system を用いて BLM を一過的に過剰発現させた。その結果、細胞の増殖の大幅な低下が見られた。このことから本来 BLM はゲノム安定性を担保する因子でありながら毒性を持つタンパク質であり、RMI1/RMI2 はその BLM の機能を調整することにより毒性を軽減していると考えられた。

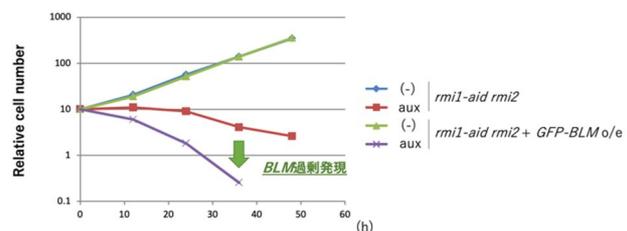


図4
細胞の増殖曲線。RMI1/RMI2 二重欠損細胞に対し、BLM を過剰発現させると、細胞数の減少がさらに早く起こる。

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 3件）

1. 著者名 Kawasumi R, Abe T, Psakhye I, Miyata K, Hirota K, Branzei D.	4. 巻 35
2. 論文標題 Vertebrate CTF18 and DDX11 essential function in cohesion is bypassed by preventing WAPL-mediated cohesin release.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes Dev.	6. 最初と最後の頁 1368-1382
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.348581.121	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 Abe T, Suzuki Y, Ikeya T, Hirota K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Targeting chromosome trisomy for chromosome editing.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 18054
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-97580-1.	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 Ikemoto D, Taniguchi T, Hirota K, Nishikawa K, Okubo K, Abe T.	4. 巻 13
2. 論文標題 Application of neural network-based image analysis to detect sister chromatid cohesion defects.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 2133
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-28742-6	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿部拓也, 鈴木雄也, 池谷鉄平, 廣田耕志
2. 発表標題 トリソミー染色体を標的とした染色体編集
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部拓也
2. 発表標題 条件欠損細胞を用いたトポイソメラーゼの解析
3. 学会等名 第9回DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部拓也
2. 発表標題 退化した性染色体に残された機能は性の消滅危機から生物を救うのか？
3. 学会等名 学術変革領域研究B「性染色体サイクル」キックオフシンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 阿部拓也
2. 発表標題 ミ二染色体の解析から予測する性染色体の未来
3. 学会等名 学術変革B「性染色体サイクル」第1回領域会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松野晟弥, 石田諒, Rika Rifana Sari, 廣田耕志, 阿部拓也
2. 発表標題 Measurement of the rate of mini-chromosome loss induced by a DSB
3. 学会等名 学術変革B「性染色体サイクル」第1回領域会議
4. 発表年 2023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			
イタリア	the AIRC Institute of Molecular Oncology			