

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K12166

研究課題名(和文) 相同組換えによる照射線傷害の修復とその失敗で起きる二次的な二重鎖切断部位の解明

研究課題名(英文) Investigation of mechanisms and biological roles of homologous recombination.

研究代表者

花田 克浩 (Hanada, Katsuhiko)

大分大学・医学部・講師

研究者番号：90581009

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)：相同組換えは遺伝子の二重鎖切断を修復するDNA修復機構の1つである。相同組換えの機能不全はファンconi貧血、遺伝性乳癌卵巣癌症候群を引き起こし、その役割は臓器の維持から発癌抑制まで幅広い。真核生物において、相同組換えのメカニズムに関して不明な点が多い。特に相同組換えの後半部分のメカニズムに関しては、複数のモデルがあり、それらがどのように選択され、最終的に組換え中間体が解消されるのか、解明されるべき課題が多く残っている。本研究では、組換え中間体を解消させる酵素の活性を調節する因子の同定と機能解析を行った。その結果、RAD54が、RAD51をDNAから乖離させることを示すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相同組換えの異常は、DNAの二重鎖切断の修復に支障をきたすため、染色体異常の原因となる。その結果、臓器の機能不全やがんの原因となる。実際、その機能に問題を生じた場合、ファンconi貧血や遺伝性乳癌卵巣癌症候群を引き起こす。一方、哺乳類では相同組換えは細胞の生存に必須の生命現象であり、その機能を阻害することで細胞は死んでしまう。さらに相同組換えは増殖細胞で活性が高いことも知られている。このことから相同組換えを標的とした阻害物質が抗がん剤として活用できる可能性が高く、一部でそのような物質が実用化され始めている。このような薬剤の開発のために、相同組換えのメカニズムを解明することが重要である。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination is one of the DNA repair mechanisms that repair double-strand breaks in genes. In eukaryotes, the mechanism of homologous recombination has been poorly understood, especially regarding the mechanism of the latter half of homologous recombination. In this study, we addressed how recombination intermediates were resolved by the structure-specific endonuclease. On the other hand, to analyze the site of double-strand breaks that occur secondary to failure of homologous recombination, double-strand breaks are separated by pulsed field electrophoresis and DNA is recovered from the gel. Then the sequence of its terminal portion has been comprehensively analyzed by the next generation sequencer. We are currently developing a method for determining the sequence of the terminal portion of recovered DNA, and plan to write a paper if we can prove the specificity and reproducibility of this method.

研究分野：分子生物学

キーワード：相同組換え

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究を始める前の状況として、相同組換えのメカニズムを解析する研究は国内外で盛んに行われていたが、近年の注目分野は減数分裂組換えのメカニズムの解析であった。減数分裂組換えにおける相同組換えは、体細胞における相同組換えと比べ、組換え後期の代謝が完全に異なる(図1)。減数分裂組換えにおける相同組換えは相同染色体間で起きる遺伝子の組換えである。配偶子形成にとって必須な現象であり、体細胞よりも多くの因子が組換えに関わっていることが知られている。また、組換え産物として、父親由来の染色体と母親由来の染色体との間で交差した染色体が生じる。一方、体細胞では通常 DNA 複製によって形成された姉妹染色体の間で相同組換えが起きる。その反応には減数分裂組換えで働く因子の全てが参加するわけではなく、比較的少ない因子の関与で完結する。体細胞での相同組換えは、通常姉妹染色体間の交差は起きない。我々は体細胞における相同組換えの後期過程のメカニズムを解明したいと考え、本研究を企画した。最も興味がある点は、組換え中間体を解消するメカニズムを解明することである。

一方、相同組換えの中間体解消に失敗したら、染色体の安定維持においてどのような影響が生じるのかについて明らかになっていないことが少ない。2本の姉妹染色体が繋がったままの状態なので有糸分裂の際に染色体分配異常が起きることが予想できる。その染色体分配異常によって発生する遺伝子の変異に関して解析したいと考えて本研究を企画した。

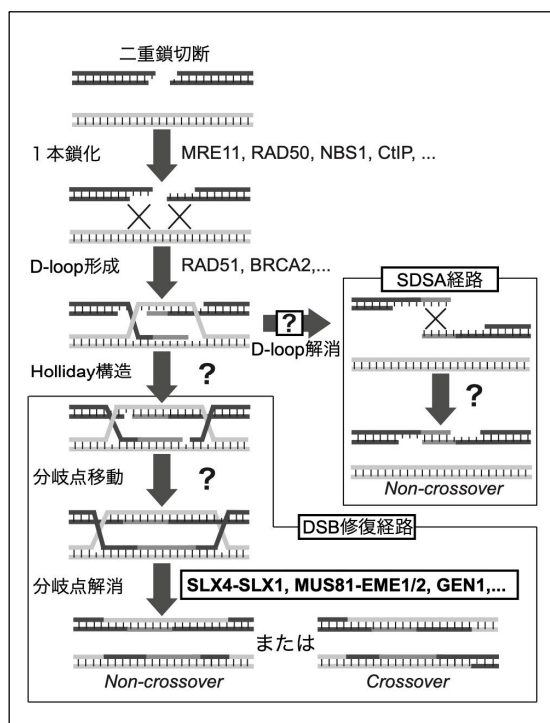


図1. 相同組換えによる二重鎖切断修復の概略図. 真核生物では後半部分のメカニズムが明らかになっていない.

SDSA: Synthesis-Dependent Single-strand Annealing.

DSBR: Double-Strand Break Repair.

2. 研究の目的

研究の目的として下記の項目を掲げた。

- (1) 相同組換えの後半部分の反応において、経路決定因子を同定する。特に体細胞での『DSB修復経路』に関する知見が少ないため、『DSB修復経路』の促進因子を同定する。また、『DSB修復経路』の最終過程である『分岐点解消』に関わる構造特異的ヌクレアーゼがどのように選択されるのか、そのメカニズムを解明する。
- (2) 二重鎖切断部位の網羅的解析により、放射線照射によって起きる二重鎖切断部位と、相同組換えの失敗によって生じる二次的な二重鎖切断部位を染色体レベルで比較し、放射線の直接的影響とは異なる DNA ダメージとそれが高頻度にかかる部位を解明する。

3. 研究の方法

- (1) 『DSB修復経路』および『分岐点解消』に関する解析

我々の予備実験では、RAD51 が DNA から解離することが構造特異的ヌクレアーゼの活性に重要であることを見出している。故に、RAD51 が解離する際の DNA の構造が、構造特異的エンドヌクレアーゼの選択に寄与しているという仮説を想定している。この点を検証する。

分岐点解消酵素候補 (MUS81-EME1, SLX4-SLX1, GEN1) を精製し、D-loopとHolliday構造の基質に対する切断効果とその活性におけるRAD51の影響を調べる。

上記の反応に前項のD-loop代謝酵素を添加し、ヌクレアーゼの活性が変化するか解析する。その際、RAD51の解離を促進するか、ポリアクリルアミドゲルのGel mobility shift アッセイで検証する。

D-loop代謝酵素がRAD51の解離後にHolliday構造を形成するのかを検証するために、組換え中間体を模した基質を合成し、その基質を用いて検証する。
 上記で形成されたHolliday構造分子に構造特異的ヌクレアーゼを添加し、Holliday構造特異的な酵素を同定する。

(2)組換え中間体の解消の失敗によって生じる DNA 切断に関する解析

放射線の直接的影響（照射直後）によって起きる二重鎖切断の切断部位を、図2に示す手法で解析する。また、次世代シーケンサーでのシーケンス解析の重複頻度を基に、ある領域における切断の頻度を算出する。

同様に、放射線照射後、最初の有糸分裂を起こした細胞を回収し、切断部位と頻度を解析する。

上記の結果（放射線の直接的影響の切断の部位と相同組換えの失敗で起きる切断部位と頻度）を比較する。

相同組換えの失敗で起きる切断部位に高発部位があるか？また、そこに癌抑制遺伝子が含まれるかを解析する。その解析から、発癌リスクを下記の指標で評価をする。

(発癌リスク) = (癌抑制遺伝子での二重鎖切断頻度) / (ゲノム全体の二重鎖切断頻度)

同様の解析で、上記の「発癌リスク」が放射線量に相関があるかを検証する。

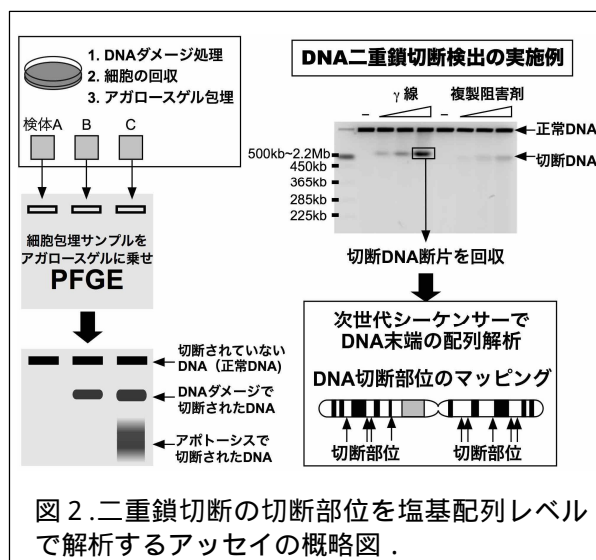
4. 研究成果

(1) 『DSB 修復経路』および『分岐点解消』に関する解析

組換え中間体構造を解消する構造特異的ヌクレアーゼについて、その活性の on/off を制御する因子を同定したいと考え、生化学的な検証を繰り返した結果、RAD51 タンパク質がその役割を担っていることを発見した。RAD51 は組み換え中間体構造である D-Loop 形成させる酵素である。まず、組換え中間体構造を解消する構造特異的ヌクレアーゼの活性を負に制御するメカニズムとして、RAD51 が DNA に結合しているときは組換え中間体構造を解消する構造特異的ヌクレアーゼは DNA にアクセスできないため、DNA を切断することはないということを我々は発見した。一方、組換え中間体構造を解消する構造特異的ヌクレアーゼの活性を正に制御するメカニズムとして、RAD51 が DNA から解離することを誘発する RAD54 や FBH1 が関与することも発見した。これらの因子は ATP 存在下で RAD51 を DNA から解離させ、DNA を露出させる働きを持つ。露出された DNA は構造特異的ヌクレアーゼの標的になり、組換え中間体構造を解消することが可能になることを明らかにした。現在、この知見に関するその論文を作成している最中である。

(2) 組換え中間体の解消の失敗によって生じる DNA 切断の解析

相同組換えの失敗が原因となって二次的に生じる二重鎖切断の発生部位の解析については、パルスフィールド電気泳動で二重鎖切断を分離し、そのゲルから DNA を回収して、その末端部分の塩基配列を網羅的に解析する手法を開発した(図2)。この手法で回収した DNA を次世代シーケンサーで網羅的に解析し、染色体上にマッピングするという手法である。回収した DNA の塩基配列を読むことには成功した。現在、その配列が本当に DNA 末端部分であるか(DNA の二重鎖切断が起きた部位であるか)という点について、慎重に確認作業を行っているところである。DNA 末端を解析する他の手法と比較し、この手法で DNA 末端の配列を特異的、かつ、再現性良く解析できることを証明することができれば論文を執筆する予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 西田欣広、花田克浩	4. 巻 38
2. 論文標題 二重鎖切断と婦人科関連の問題	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 BIO Clinica	6. 最初と最後の頁 54-58
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 無
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0件

〔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
研究分担者	西田 欣広 (Nishida Yoshihiro) (10336274)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	
研究分担者	寺林 健 (Terabayashi Takeshi) (40452429)	大分大学・医学部・准教授 (17501)	

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		
オランダ	Erasmus MC		