

令和 6 年 5 月 9 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18034

研究課題名（和文）高次元クロマチン損傷を対象としたヌクレオチド除去修復機構の分子基盤の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of molecular basis of nucleotide excision repair against DNA lesions in high-dimensional chromatin

研究代表者

松本 翔太（Matsumoto, Syota）

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：10880643

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：DNA修復機構の中でも紫外線損傷をはじめとした広範な損傷を取り除く、ヌクレオチド除去修復（NER）のメカニズムの解明を目指した。特に細胞のゲノムDNAはクロマチン構造と呼ばれるDNA複合体を形成しており、DNA修復タンパク質が損傷を見つけるのは容易ではないと考えられる。そこで本研究ではクロマチンの最小単位であるヌクレオソームを対象とし、ヌクレオソーム上の損傷に対するDNA修復タンパク質の機能を調べた。その結果、ヌクレオソーム上では裸のDNAと異なり、損傷の位置に応じて、タンパク質の結合安定性や認識効率が大きく異な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

本研究は細胞内におけるDNA修復機構を分子レベルで調べたものであり、これまで未知の領域であったクロマチン上のDNA修復という観点で研究を進めてきた。これらクロマチン上におけるDNA修復研究は、DNA修復異常疾患を持つ患者の治療法の確立や臨床医療への応用へと繋げていく上で必須であり、幅広い患者の治療へと貢献する可能性を秘めている点で社会的意義は大きいと考えている。

研究成果の概要（英文）：In this research, we aimed to reveal the molecular mechanism of nucleotide excision repair (NER), one of the important DNA repair mechanism to eliminate wide variety of DNA lesions. Especially, our genome forms DNA-protein complex called "chromatin," which limits the access of DNA repair protein to DNA lesions.

In this research, we figured out the molecular mechanism of DNA repair protein targeting DNA lesions in nucleosomes, a basic unit of chromatin. In these results, we revealed that binding affinity and efficiency of damage recognition are depending on the location of DNA lesions and these were not observed on naked DNA.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 クロマチン ヌクレオチド除去修復 ヌクレオソーム NER

1. 研究開始当初の背景

生物のゲノムは放射線や紫外線など、様々な外的要因により常に損傷のリスクに晒されている。生物の持つ DNA 修復機構はこれらの損傷を取り除くシステムであり、ヒトにおいては DNA 修復異常により多種多様な疾患が引き起こされることがわかっている。紫外線によって生じた DNA 損傷は主にヌクレオチド除去修復機構 (NER) により取り除かれる。ヒトにおいて NER が先天的に欠損すると、色素性乾皮症やコケイン症候群といった遺伝病が引き起こされることが報告されており、これらの遺伝病は根本的な治療法が存在しておらず、我が国では特定難病に指定されている。そのため、NER の全容を理解することが、これらの疾患の治療法を確立する上で必須であるが、未だに不明な点が多く残されている。

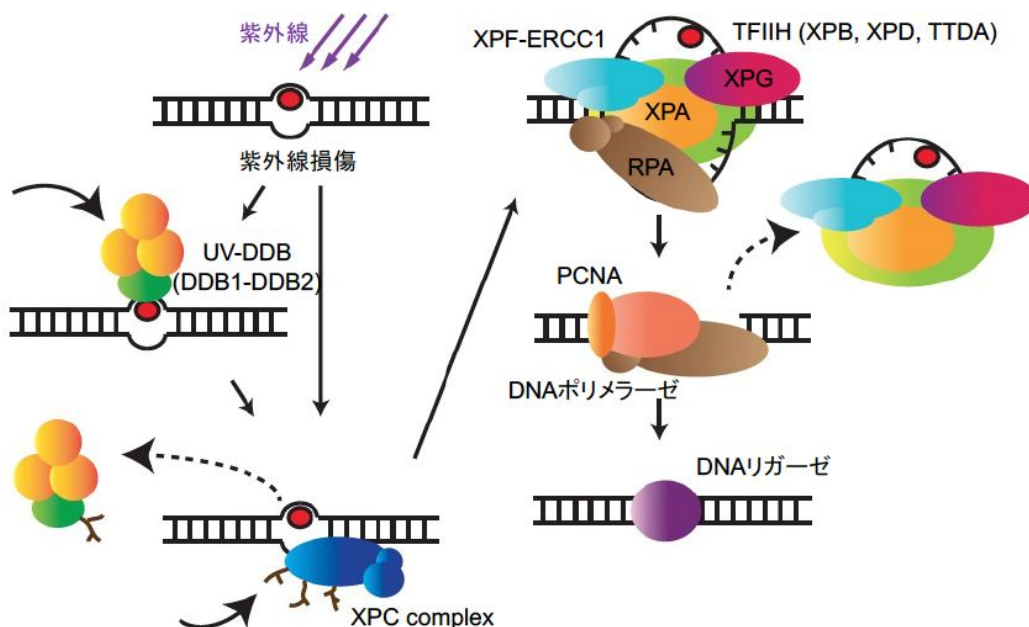


図 1. ヌクレオチド除去修復機構 (NER)

NER の分子機構については古くから生化学的な解析により、個々の NER 因子の同定やそれらの役割、活性について研究が進められており、損傷の発見から修復に至るまでの分子メカニズムがモデル化されている (図 1)。ゲノム全体を対象とした NER 経路では、まず DNA に生じた損傷は UV-DDB 複合体 (DDB1 と DDB2 のヘテロ二量体) により認識される。その後、NER の開始因子である XPC 複合体に損傷が受け渡され、さらに下流の因子群が損傷部位にリクルートされる。これらの因子のヘリカーゼ活性、エンドヌクレアーゼ活性により損傷部位周辺 DNA の一本鎖への巻き戻し、損傷の切り出しが行われる。切り出された部位は DNA ポリメラーゼと DNA リガーゼにより埋め戻されることで修復が完了する。

一方、これらのモデルは損傷を含む DNA 断片を基質とした無細胞 NER 再構成系により提唱されたものであり、実際の細胞で起こる NER については、このモデルで説明出来ないことも多く存在しているのが現状である。細胞内のゲノム DNA はヒストンタンパク質に巻き付いたクロマチンと呼ばれる構造体を形成している。このクロマチン上の DNA は裸の DNA とは性質が大きく異なることがわかっており、DNA 修復機構についてもクロマチンの有無で活性が異なる可能性が指摘されていた (図 2)。

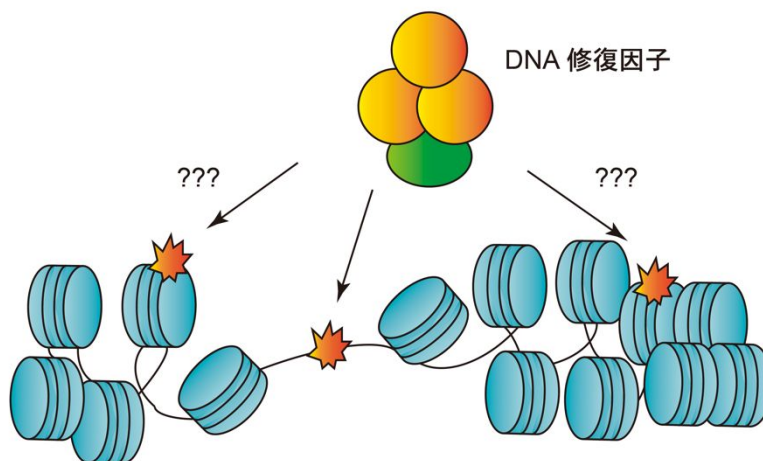


図 2. クロマチン構造が DNA 修復機能に与える影響

2. 研究の目的

以上の研究背景により、裸の DNA 損傷に対する NER の詳細な分子モデルについては理解が進んできているが、細胞の状態であるクロマチン上の DNA 損傷についての理解は限定的であり、ヒトの DNA 修復異常疾患を解明する上で、クロマチンの修復機構を明らかにすることが求められている。本研究では NER におけるクロマチンの影響を解明することを目的としており、主に NER の初期段階である DNA 損傷の認識機構について詳しく調べた。特にクロマチンの最小単位であるヌクレオソーム構造に着目し、ヌクレオソーム上の損傷について、損傷認識因子である UV-DDB がどのように認識して、修復を開始するのかについて生化学的、構造生物学的手法を用いて研究を進めた。

3. 研究の方法

本研究を進める上で、クライオ電子顕微鏡 (cryo-EM) による単粒子解析技術を中心に、以下の二つの手法を用いて研究を行った。

A. 再構成ヌクレオソームを用いた損傷認識機構の解明

まず大腸菌を用いて組換えヒストンタンパク質を発現・精製することにより、ヌクレオソームを構成するヒストン八量体を再構成した。続いて得られたヒストン八量体に 145 塩基対の DNA を混ぜ合わせるにより、ヌクレオソームを試験管内で再構成した。このヌクレオソームに紫外線を照射することにより、紫外線損傷を含むヌクレオソームを再構成することに初めて成功した。この損傷ヌクレオソームに対し、損傷認識タンパク質である UV-DDB を昆虫細胞発現系により精製し、混ぜ合わせるにより損傷ヌクレオソームに結合した UV-DDB 複合体を得た。この複合体を cryo-EM で撮影することで、複数の損傷ヌクレオソーム-UV-DDB 複合体の画像データを収集した。収集した粒子から三次元立体構造を構築することにより、この複合体の三次元構造を決定することに成功した。

B. 細胞由来のヌクレオソームを用いた損傷認識機構の解明

ヒストンタンパク質の一種であるヒストン H2A タンパク質に FLAG タグを融合した H2A-FLAG を安定発現する細胞株を樹立した。この細胞株から FLAG タグを用いてプルダウンを行うことで、細胞内からヌクレオソームを単離・精製することに成功した。ここで得られたヌクレオソームに対して紫外線を照射することにより、細胞ヌクレオソームに損傷を導入することに成功した。このヌクレオソームに対して UV-DDB を反応させることで、細胞内ヌクレオソームの損傷がどのように認識されるかどうかを調べた。また、結合した UV-DDB と損傷ヌクレオソームについて、上記の同様に cryo-EM による撮影を行うことにより、複合体の三次元構造を決定した。

4. 研究成果

本研究結果より、損傷認識因子である UV-DDB は裸の DNA であれば損傷がどこに存在していても結合するのに対し、ヌクレオソーム上では損傷の位置に応じて結合構造が異なることが明らかになった。すなわち細胞内において NER による DNA 修復反応には損傷位置に対して指向性があり、修復効率の良い場所と悪い場所があることが想定される。このことはこれまでのモデルで提唱されていたモデルに加えて、さらにヌクレオソームやクロマチンといった細胞特有の構造体の影響が DNA 修復において重要な役割を担うことが示唆された。これらの細胞内 NER モデルの全容が明らかになれば、ヒトにおける DNA 修復異常疾患の理解にも大きく貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本翔太
2. 発表標題 クライオ電子顕微鏡による色素性乾皮症E群タンパク質DDB2の紫外線損傷認識機構の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022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
---------	---------