

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340031

研究課題名(和文)XRCC4のM期におけるリン酸化を介した染色体分配を正確に行う仕組み

研究課題名(英文)Mechanism of accurate chromosome segregation by mitosis-specific phosphorylation of XRCC4

研究代表者

寺澤 匡博(Terasawa, Masahiro)

大阪大学・たんぱく質研究所・特任助教

研究者番号：20389688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：DSB(DNA二重鎖切断)は最も重篤なDNA損傷であり細胞死やゲノム不安定化、そして癌化を引き起こす。G1-S-G2期ではゲノムの安定性を保つために細胞はDNA損傷に応答してチェックポイントやDSB修復経路が働く。M期ではDSB修復抑制が起こることが知られていたがその生物学的意義はよくわかっていなかった。本研究により他の細胞周期ではゲノム安定化に寄与するDSB修復がM期で働くとむしろ不正な染色体分配を招き有害であること、さらにDSB修復因子XRCC4のM期でのリン酸化はDSB修復能を低下させ、不正な染色体分配を防ぐ機能があることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Double-strand break (DSB) is the most severe types of DNA damage. To maintain genomic stability, cells possess several checkpoints and DNA repair mechanisms that respond to DNA damage during the G1, S, and G2 phases. A defect in these processes results in apoptosis, aneuploidy, or translocation. However, mitotic cells are known to suppress DSB repair, although the biological significance of the suppression is unknown. This study showed that DSB repair, which prevents genomic instability in other cell cycle phases, is rather toxic to mitotic cells. During mitosis, phosphorylation of XRCC4, a factor of DSB repair, suppresses DSB repair and plays important roles to prevent aberrant chromosome segregation.

研究分野：放射線・化学物質影響科学

キーワード：DSB修復 M期 ゲノム不安定化 XRCC4

### 1. 研究開始当初の背景

DSB (DNA 二重鎖切断) は最も重篤な DNA 損傷であり細胞死やゲノム不安定化、そして癌化を引き起こす。G1-S-G2 期ではゲノムの安定性を保つために細胞は DNA 損傷に応答してチェックポイントや DSB 修復経路が働く。これらが正常に働かないとアポトーシスや異数化、欠失、転座などが引き起こされる。DSB は主に非相同末端結合 (NHEJ)、相同組換えのいずれかの経路により修復されることが知られている。しかしながら当時、M 期において DSB 修復は抑制されることが知られていたがその生物学的意義についてはわかっておらず、また M 期での DSB 修復制御についてほとんど解析がされていなかった。さらに非相同末端結合の中に Alternative NHEJ と呼ばれる必ず変異を伴う経路も存在は知られていなかったが知見が少なかった。

申請者は非相同末端結合因子 XRCC4 が M 期でリン酸化されることを見いだしたことから非相同末端結合因子のリン酸化を介した M 期での DSB 修復制御により新規の染色体を正確に分配する仕組みがあることを考えた。

### 2. 研究の目的

XRCC4 の M 期におけるリン酸化の機能を明らかにすることにより新規ゲノム安定性維持機構を解明すること、この時期における DSB 修復制御を明らかにし、M 期で起こる特殊な DSB 修復制御の意義を解明することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) ヒト培養細胞を M 期で同調し、DSB を導入、細胞周期に再導入し染色体分配に対する影響を調べた。ゲノム不安定性のマーカーである娘細胞間の架橋構造、anaphase bridge 形成頻度を測定することにより M 期で導入された DSB による不正な染色体分配を評価した。固定細胞またはヒストン H2B-GFP を発現する細胞を用いて live cell imaging により観察を行った。

DSB 修復各経路に特異的な因子を siRNA によりノックダウンすることにより、DSB 修復経路の anaphase bridge 形成に対する影響を調べた。

XRCC4 非リン酸化型タンパク質を発現する細胞を作製し、anaphase bridge 形成に対する影響を調べた。

(2) ヒト培養細胞を M 期で同調し、DSB 修復因子、Rad51、53BP1 の染色体上における局在を調べた。Rad51 は相同組換え、53BP1 は非相同末端結合に特異的な因子である。

(3) ヒト培養細胞を同調培養し、XRCC4 の M 期リン酸化の PLK1、CDK1 インヒビターで処理しキナーゼ依存性を調べた。また推定リン酸化部位をアラニンに置換した非リン酸化型タンパク質を発現する細胞で影響を調べた。

(4) DSB 量を測定することができるコメットアッセイにより M 期で同調した細胞を用いて

DSB 修復を測定した。また野生型と非リン酸化型タンパク質を発現する細胞の間で DSB 修復能を比較した。

### 4. 研究成果

研究期間の間以下の項目を明らかにした。

(1) M 期で DSB 導入は不正な染色体分配を招き、大きな染色体不安定化を引き起こした。また Live imaging からは M 期に導入される DSB はチェックポイントを引き起こさず、そのまま細胞周期が進むことがわかった。

M 期で非相同末端結合因子 XRCC4 をノックダウンすると DSB 導入による不正な染色体分配が減少する。逆に相同組換え、Alternative NHEJ 因子である CtIP をノックダウンすると増加した。相同組換え因子 XRCC3 のノックダウンでは影響がなかった。このことは NHEJ が M 期で働くことと不正な染色体分配を引き起こしてしまうことを示している。また M 期では A-NHEJ が不正な染色体分配を防ぐ可能性を示した。

非リン酸化型 XRCC4 を発現する細胞では M 期での DSB 導入による不正な染色体分配が増加した。このことは XRCC4 の M 期特異的リン酸化は不正な染色体分配を防ぐ機能を持つことを示している。

(2) M 期の DSB 導入により DSB マーカーである H2AX は染色体上に局在したが Rad51、53BP1 のいずれの因子も M 期染色体に局在しなかった。これは M 期においていずれの DSB 修復経路もほぼ抑制されていることを示している。

(3) XRCC4 の M 期特異的リン酸化は CDK1 および PLK1 インヒビター処理により消失し、また推定リン酸化部位 S256、S326 のアラニン置換により消失することから XRCC4 は M 期において CDK1 および PLK1 の活性に依存してリン酸化されることがわかった。また S256、S326 の M 期でのリン酸化が重要であることがわかった。

(4) M 期で DSB 修復を測定すると非同調細胞に比べて非常に遅いがわずかに DSB 修復が起こることがわかった。M 期での DSB 修復能を比較すると非リン酸化型 XRCC4 を発現する細胞では野生型よりも DSB 修復が速く進むことがわかった。このことは XRCC4 の M 期特異的リン酸化が DSB 修復抑制に働くことを示している。

これらの結果から他の細胞周期ではゲノム安定化に寄与する非相同末端結合は M 期で働くことむしろ不正な染色体分配を招いてしまうこと、さらに XRCC4 の M 期でのリン酸化は DSB 修復能を低下させ、不正な染色体分配を防ぐ機能があることを明らかにした。

今まで M 期では DSB 修復抑制が起こることが知られていたがその生物学的意義はよく

わかっていなかった。本研究により従来の凝縮したクロマチンが DSB 修復を妨げるという消極的な理由ではなくむしろ DSB 修復を M 期において積極的に抑制することに意義があり、これによって正確な染色体分配を保證する機構があることがわかった。この結果は 2014 年に PLoS Genetics に掲載された。また同時期に非相同末端結合因子である 53BP1 が M 期特異的に PLK1、CDK1 によりリン酸化され DSB 修復抑制にこのリン酸化が重要な役割を果たしていることが Durocher らのグループによってサイエンス誌に掲載された(引用文献)。従って M 期において DSB 修復は複数の抑制機構によって制御され、この時期の DSB 修復抑制の重要性が明らかとなった。申請者の発見はこの時期の幾重にも備えられている安全装置の一つである。

M 期での DSB 修復再活性化が大きなゲノム不安成果を引き起こすことから今まで全く知られていなかったがん化の機構が明らかになること、この新規の DSB 再活性化機構を用いた抗がん剤の研究につながると考えられる。

#### <引用文献>

Orthwein, A., et al. (2014). "Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions." *Science* 344(6180): 189-193.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 3 件)

Iwasaki D, Hayashihara K, Shima H, Higashide M, Terasawa M, Gasser SM, Shinohara M., The MRX Complex Ensures NHEJ Fidelity through Multiple Pathways Including Xrs2-FHA-Dependent Tel1 Activation. *PLoS Genet*. 査読有り、18;12(3):e1005942, (2016), doi: 10.1371/journal.pgen.1005942.

Terasawa M, Shinohara A, Shinohara M., Double-strand break repair-adox: restoration of suppressed double-strand break repair during

mitosis induces genomic instability *Cancer Sci*. 査読有り、105(12):1519-25. (2014), doi: 10.1111/cas.12551.

Terasawa M, Shinohara A, Shinohara M., Canonical Non-homologous End Joining in Mitosis Induces Genome Instability and Is Suppressed by M-phase-specific Phosphorylation of XRCC4. *PLoS Genet*. 査読有り、10, e1004563, (2014), doi: 10.1371/journal.pgen.1004563.

##### [学会発表](計 8 件)

寺澤匡博、篠原美紀、非相同末端結合因子 XRCC4 の M 期特異的リン酸化は DNA 損傷修復抑制を介してゲノム安定性保持に寄与する、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.4、神戸商工会議所(兵庫・神戸)

寺澤匡博、篠原美紀、非相同末端結合因子 XRCC4 の M 期特異的リン酸化は DNA 損傷修復抑制を介してゲノム安定性保持に寄与する、第 23 回 DNA 複製・組換え修復ワークショップ研究会、2015.10.20、焼津グランドホテル(静岡・焼津)

Masahiro Terasawa, Miki Shinohara, Mitosis-specific phosphorylation of XRCC4 maintains genome stability by suppression of DNA damage repair, 第 74 回日本癌学会学術総会 国際シンポジウム「がん染色体動態の分子機構」, 2015.10.8, 名古屋国際会議場(愛知・名古屋)

寺澤匡博、篠原美紀、非相同末端結合因子 XRCC4 の M 期特異的リン酸化は DNA 損傷修復抑制を介してゲノム安定性保持に寄与する、第 37 回日本分子生物学会ワー

クシヨップ「ゲノムダイナミクスとゲノムホメオスタシスの分子機構」、2014.11.25、パシフィコ横浜（神奈川・横浜）

寺澤匡博、篠原美紀、非相同末端結合因子 XRCC4 の M 期特異的リン酸化の染色体分配における役割、第 57 回日本放射線影響学会、2014.10.2、かごしま県民交流センター（鹿児島・鹿児島）

Masahiro Terasawa, Akira Shinohara and Miki Shinohara, A coordination mechanism between chromosome segregation and regulations of DSB repair pathways during mitosis. 第 36 回日本分子生物学会、2013.12.3、神戸ポートピアホテル（兵庫・神戸）

寺澤匡博、篠原美紀、M 期における染色体分配と DNA 二重鎖切断修復経路制御の連携機構解明、第 22 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ、2013.11.21、ホテルニュー水戸屋（宮城・仙台）

寺澤匡博、篠原彰、篠原美紀、M 期における染色体分配と DNA 二重鎖切断修復経路制御の連携機構解明、第 56 回日本放射線影響学会、2013.10.20、ホテルクラウンパレス青森（青森・青森）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕  
出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織  
(1) 研究代表者  
寺澤 匡博 (TERASAWA, Masahiro)  
阪大・蛋白研、特任助教  
研究者番号：20389688

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：