

令和 2 年 5 月 20 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K17846

研究課題名（和文）体の大部分を占める静止期細胞における、アルコール代謝によるDNA損傷と修復の解析

研究課題名（英文）Analysis of the molecular mechanism to repair acetaldehyde-induced DNA damage

研究代表者

松崎 健一郎 (Matsuzaki, Kenichiro)

近畿大学・農学部・助教

研究者番号：10772147

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、飲酒の際に生じるアセトアルデヒドによるDNA損傷がどのように修復されているか理解することを目標に実験を行なった。その結果、アセトアルデヒドによる損傷を修復すると考えられている相同組換え経路の新規制御因子SWSAP1とFIGNL1を発見した。二者による制御の分子メカニズムと個体における役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相同組換えは、異なる染色体同士を組換える機構である。これまでに、飲酒によって生じるアセトアルデヒド依存的なDNA損傷の修復に相同組換えが関与する可能性が示されてきた。本研究では、アセトアルデヒドによるDNA損傷の解析を行なった結果、新規の相同組換え制御因子を発見した。本研究で発見した相同組換え制御因子は、既存の制御因子と全く異なる方法で相同組換えを制御しており、新しい相同組換え制御メカニズムを提唱することができた。

研究成果の概要（英文）：As a consequence of the analysis of acetaldehyde-induced DNA damage, we found novel regulatory factors of homologous recombination, SWSAP1 and FIGNL1. We also revealed FIGNL1 has an activity to prevent homologous recombination. In addition, the regulation by these proteins is essential for spermatogenesis and oogenesis in mice.

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、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 鎖架橋(Interstrand crosslink: ICL)は、DNA の二重鎖間が共有結合で結ばれた状態であり、DNA 複製、転写、染色体分配を妨害し染色体の不安定化を引き起こす。ヒトにおいて ICL 修復が行われない場合、造血幹細胞での染色体不安定性から骨髄不全、白血病に繋がる。また、最近の報告から、アルコールの代謝中間体であるアルデヒドが ICL を形成することが報告されており、飲酒と発ガンとのリスクという点からも ICL 修復に注目が集まっている。これまでの研究により、ファンコニ貧血(Fanconi anemia)の原因遺伝子と相同組換えが ICL 修復を担っていることが報告されている。現在、ICL 修復は、DNA 複製の際に ICL が認識され FA 遺伝子の協調的作用で修復を行うと考えられている。

申請者は、マウスを用いファンコニ貧血原因遺伝子の機能解析、特にガンとの関係を調べてきた。その中で、現在の ICL 修復モデルに属さない別の ICL 修復経路があることを見出した(Matsuzaki et al., *Genes and Development* 2015, Adelman, Matsuzaki et al., *Nature* 2013.)。この発見に加え、近年、DNA 複製に依存しない ICL の修復が酵母やアフリカツメガエルにおいて報告されている。しかしながら、ヒト・マウスにおいて S 期以外での ICL 修復のはっきりとした分子メカニズムは示されておらず、細胞周期の観点から ICL 修復のメカニズムを解析することが今後の ICL 修復の研究で重要になると考えられる。さらに生体内に注目すると、ICL の影響を受ける造血幹細胞は、基本的に静止期/G0 期で増殖を止めた状態で存在しており、S 期 ICL 修復モデルとは大きなギャップが存在する。本研究では、これらの発見と知見を踏まえ、静止期での ICL 修復のメカニズムを解明し、生体内で起きる ICL 修復のモデル図を作製したい。

ICL 修復の欠損は、造血幹細胞での染色体不安定化を引き起こし、最終的に骨髄不全、白血病に繋がる。造血幹細胞は静止期で停止しているため、静止期での ICL 修復のメカニズムを明らかにすることは、生体内で起きる ICL 修復を理解することにつながる。本研究では、静止期での ICL 修復経路を遺伝学・分子生物学的手法により解明することを目的とする。具体的には以下の研究項目を設定する。

#### 静止期の ICL 修復経路の遺伝学的解析

静止期 ICL 修復と S 期 ICL 修復を修復効率、変異頻度、染色体の安定性を目安として多角的に比較する。また、これらの実験手法を用いて静止期 ICL 修復に必要な遺伝子を決定する。

これまで研究から、ファンコニ貧血(FA)原因遺伝子群が ICL の修復を担っていることがわかっている。しかしながら、それぞれの FA 遺伝子同士がどのような関係を持ち修復を行っているのかまだ不明な点が多く、遺伝学的にそれぞれの遺伝子同士の関係を明らかにすることは、ICL 修復のメカニズムを理解する上で重要になってくる。そこで、ロックダウン細胞を用い、それぞれの FA 遺伝子の静止期・S 期での役割を決定する。また、酵母やカエルで報告されている DNA 複製を伴わない ICL 修復がヒトの静止期の細胞でも修復を行っているか明らかにする。

#### 静止期 ICL 修復の分子メカニズムの解明

静止期 ICL 修復因子の作用機序を染色体上への結合の観点から理解する。それぞれの静止期 ICL 修復因子をロックダウンした細胞において、間接蛍光抗体法とクロマチン画分の採取の二つの方法によって、因子間の依存性を決定する。酵素活性を持つ因子については、不活性変異の導入による修復効率、変異頻度、染色体不安定化の変化を評価し、静止期 ICL での役割を決定する。

#### 細胞周期依存的な静止期/G0 期と S 期 ICL 修復の制御機構の解明

S 期の ICL 修復では、最終的に DNA 複製で生じた姉妹染色体を鋳型にして修復が行われるため、姉妹染色体の存在する期間でのみ修復を行うことができる。一方で、姉妹染色体の存在しない期間に S 期 ICL 修復が始まってしまうと修復が完了できず、変異や転座を引き起こしてしまうと考えられる。このため、ICL 修復は細胞周期依存的に厳密に制御される必要がある。異なる細胞周期においてどのようにして ICL 修復が制御されているか明らかにすることを目指す。細胞周期依存的な制御は、タンパク質のリン酸化による制御と発現量による制御の二つに分けられる。リン酸化に関しては CDK 阻害により、静止期・S 期 ICL 修復への影響を調べる。並行して、細胞周期依存的にリン酸化されるものがあつた場合は非リン酸化変異を導入することで、リン酸化の役割を明らかにする。発現量による制御については、mRNA レベルの変化とタンパク質分解の両方の可能性について検討する。転写による制御の場合は細胞周期依存的な転写制御因子を決定し、タンパク質分解の場合はユビキチンリガーゼの探索まで行いたい。

ICL は、これまでファンコニ貧血の原因と考えられ長年研究されてきたが、近年、生体内のアルコールの代謝物であるアルデヒドが ICL を引き起こすことが分かり、飲酒と発ガン・貧血・骨髄不全の関係に注目が集まっている。生体内に取り込まれたエタノールは ICL を生じるアセトアルデヒドに代謝されるが、Aldh2 タンパク質により酸化され代謝されることがわかっている。日本人の約半数が Aldh2 の活性の低い変異を少なくとも一つ持っていると言われており、飲酒による発ガンとのリスクが懸念される。このため、ICL 修復研究は日本が重点的に研究する必要がある分野である。本研究で行う静止期での ICL 修復のメカニズムを解明できれば、実際に生体内の造血幹細胞で起こっている ICL 修復の分子メカニズムを示すことができる。さらに、エタノール

ル損取による発ガン、骨髄不全のリスクを低減する方法・治療方法の基盤となることが期待できる。

生体内では、脳や心臓など多くの組織において細胞は静止期で維持されている。静止期における ICL 修復メカニズムの重要性を示すことは、静止期の細胞を持つ他の組織における ICL の影響や組織特異的ガンを研究する足がかりになると考えている。また、各組織での重要性だけでなく、他の DNA 修復経路や染色体安定性維持機構の静止期での役割を調べる研究に広げていくことも可能である。

## 2. 研究の目的

DNA 架橋(ICL)はDNA損傷の一種であり、ヒトでは造血幹細胞で染色体を不安定化し骨髄不全、白血病を引き起こす。これまで、ICL 修復はDNA複製を伴った単一の経路で行なわれていると考えられていたが、申請者は最近 ICL の修復が複数の経路で行なわれている可能性を見出した。本研究では、生体内の造血幹細胞が静止期で停止していることを踏まえ、静止期の細胞における ICL 修復のメカニズムを解明することを目指す。最終的には、生体内で起きる ICL による白血病、骨髄不全の原因を明らかにし、治療に向けた分子基盤の確立が目的である。

## 3. 研究の方法

ICL 修復経路が複数存在すること、ICL の影響を最も受ける造血幹細胞が静止期で維持されていることを踏まえ、静止期における ICL 修復メカニズムを遺伝学・分子生物学的手法により解明することを目指す。研究テーマとしては、

1) 遺伝学・分子生物学的手法による静止期 ICL 修復を行う遺伝子の解析

2) 細胞周期依存的な ICL 修復経路の制御機構の解明

これらの項目に沿って実験を行う。

### 静止期 ICL 修復と S 期 ICL 修復の比較

静止期 ICL 修復と S 期 ICL 修復を修復効率、変異頻度、染色体の安定性を目安として多角的に比較する。静止期 ICL 修復の解析方法のセットアップを行う。血清飢餓状態で細胞を培養し静止期に導入する。一方で、S 期同調はチミジンブロックによって行う。① ICL の修復は、染色体上から ICL が除去されるのを指標に修復の効率の測定を行う。ソラレンは UV 照射により染色体上に ICL を形成する。ピオチン化ソラレン(Tsuchida et al., Cancer Sci 2008)を用いることで、染色体に導入された ICL とその修復をドットプロットにより定量的に解析する。② 修復の過程において ICL の近傍で DNA 鎖が切断されていることを踏まえ、DNA 切断の経時変化を修復として測定する。この実験はパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)により行う。③ 修復産物の変異頻度に関しては、*HPRT* 遺伝子座に変異を生じると細胞は 6-チオグアニン 6-TG)に耐性を示すことを利用して、静止期・S 期で ICL を誘導した後、6-TG 耐性細胞の数から変異頻度を測定する。また、6-TG 耐性細胞を単離し、*HPRT* 遺伝子座の DNA 配列を決定することで変異の種類を調べる。④ 染色体の安定性に関しては、ICL 修復が正常に行われない場合、染色体同士の結合や染色体の一部の欠失などが観察されることがわかっているため、M 期染色体の形態観察により評価する。PFGE、M 期染色体の形態解析の実験は既にセットアップが済んでいる。

①② の実験を用いて、静止期 ICL 修復と S 期 ICL 修復の比較を行う。

### 静止期 ICL 修復の遺伝学的解析

これまでの研究で報告されている ICL 修復に関与する遺伝子から、静止期 ICL 修復に必要な遺伝子を決定する。FA 遺伝子群を機能別に 3 つのグループに分け、それぞれのグループから代表的な遺伝子をノックダウンし、静止期/S 期 ICL 修復での役割を評価する。FA 遺伝子群は、上流にあたるユビキチンリガーゼ活性を持つ FA core complex、FA core complex によりユビキチン化される FANCD2-FANCI 複合体、下流に位置する相同組換えに分けられる。これらのグループから代表的な役割を持つ遺伝子(FANCL、FANCD2、RAD51C)をノックダウンし、静止期/S 期 ICL 修復への影響を評価する。FA 遺伝子がほとんど保存されていない出芽酵母では、損傷乗り越え型ポリメラーゼ Pol (Rev3/7)、ヌクレオチド除去修復 Rad4、DNA ヌクレアーゼ Pso2 が G1 期に ICL 修復を行っていることが報告された。そこで、これらのホモログである hREV7、XPC、SNM1A/B が、静止期 ICL 修復で働いているかを調べる。最終的に、二重、三重ノックダウンを組み合わせることで、静止期 ICL 修復の経路を決定する

### 静止期 ICL 修復の分子生物学解析

得られた結果を踏まえ、静止期 ICL 修復な遺伝子が、どのように修復を行うかを明らかにする。クロマチン分画法、関節蛍光抗体法により、同定した因子をノックダウンした時、他の因子の挙動を解析することで、修復因子同士の関係を明らかにする。これらの実験には、タンパク質の十分な発現量が必須になるが、検出が困難な場合はピオチン化ソラレンを用い ICL 近傍に結合するタンパク質を濃縮しウェスタンブロットにより挙動を解析する。

## 細胞周期依存的な ICL 修復経路の制御機構の解明

S 期の ICL 修復では、最終的に DNA 複製で生じた姉妹染色体を鋳型にして修復が行われる。一方、姉妹染色体の存在しない期間に S 期 ICL 修復が始まってしまうと修復ができず、変異や転座を引き起こしてしまう。つまり、ICL 修復は細胞周期依存的に厳密に制御される必要がある。異なる細胞周期においてどのようにして ICL 修復が制御されているか明らかにすることを目指す。

細胞周期依存的な細胞内のイベントは、サイクリン依存性キナーゼ(CDK)によるリン酸化を介したタンパク質間相互作用の変化、活性の変化、局在の変化によって制御されている。そこで、静止期、S 期 ICL 修復に CDK の活性が必要であるか検証する。細胞を CDK 阻害剤で処理した際の静止期・S 期 ICL 修復の変化を調べる。同時に、ウェスタンブロットにより細胞周期依存的にリン酸化される ICL 修復因子を探す。ウェスタンブロットでリン酸化タンパク質を見つけることが出来なかった場合、ICL 修復因子を免疫沈降し質量分析でリン酸化の部位を探し出す。

もう一つの細胞周期依存的な制御として、転写によるとタンパク質分解を介した発現量による制御がある。静止期と S 期 ICL 修復因子の発現の変化を、タンパク質はウェスタンブロットで、mRNA は qPCR で調べることで、転写による制御かタンパク質分解による制御か明らかにする。転写による制御の場合、発現の変化する遺伝子のプロモーター配列とコンセンサス配列から転写因子を同定する。同時にクロマチン免疫沈降でヒストンの翻訳後修飾の変化も観察する。タンパク質分解による制御の場合は、プロテアソーム阻害剤の ICL 修復への影響を計画 1a の方法で調べる。発現の制御を行うユビキチンリガーゼを免疫沈降と質量分析により同定したい。

## 4 . 研究成果

ICL 修復メカニズムの解析の結果、ICL 修復後半にはたらく相同組換えの新規制御因子 SWSAP1 と FIGNL1 を発見した(Matsuzaki et al., *Nature Communications* 2019)。FIGNL1 は、相同組換えにおける中心的役割を持つ RAD51 を DNA 上から外す活性を有しており、相同組換えを抑制する。一方、SWSAP1 は FIGNL1 の活性を阻害することで、結果として相同組換えを促進する役割を担っている。つまり、SWSAP1 と FIGNL1 が、適切な時期に適切な場所で相同組換えを行うように制御していることを示している。両者による制御は、個体に置いて精子形成と卵子形成に必須であることも発見した。さらに細胞周期ごとの解析を行ったところ、SWSAP1 が細胞周期の S 期において相同組換えを促進する一方、FIGNL1 はそれ以外の細胞周期において相同組換えを抑制していることが分かった。この結果は、既存の S 期 ICL 修復は SWSAP1 により促進され、G0/G1 ではこの経路が FIGNL1 に抑制され G0/G1 特異的な修復を行っていることを示唆している。これらの結果は、本研究の目的である、細胞周期依存的 ICL 修復の制御の理解の一助になったと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsuzaki Kenichiro, Kondo Shizuka, Ishikawa Tatsuya, Shinohara Akira	4. 巻 10
2. 論文標題 Human RAD51 paralogue SWSAP1 fosters RAD51 filament by regulating the anti-recombinase FIGNL1 AAA+ ATPase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1407
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-09190-1	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 Matsuzaki Kenichiro, Shinohara Miki	4. 巻 501
2. 論文標題 Casein kinase II phosphorylates the C-terminal region of Lif1 to promote the Lif1-Xrs2 interaction needed for non-homologous end joining	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 1080 ~ 1084
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.05.111	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8件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Matsuzaki Kenichiro, Kondo Shizuka, Ishikawa Tatsuya, Shinohara Akira
2. 発表標題 RAD51パラログと新規アンチリコンビナーゼによる相同組換え制御の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki Kenichiro, Kondo Shizuka, Ishikawa Tatsuya, Shinohara Akira
2. 発表標題 RAD51パラログと新規アンチリコンビナーゼによる相同組換え制御の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki Kenichiro、Kondo Shizuka、Ishikawa Tatsuya、Shinohara Akira
2. 発表標題 RAD51 paralogue SWSAP1 promotes homologous recombination by protecting RAD51 filament from a novel antirecombinase FIGNL1
3. 学会等名 3R+3C Symposium (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki Kenichiro、Kondo Shizuka、Ishikawa Tatsuya、Shinohara Akira
2. 発表標題 RAD51パラログSWSAP1と新規アンチリコンビナーゼFIGNL1による相同組換え制御の解析
3. 学会等名 第41回 分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Matsuzaki Kenichiro、Kondo Shizuka、Ishikawa Tatsuya、Shinohara Akira
2. 発表標題 相同組換えにおけるRAD51パラログ複合体の機能解析
3. 学会等名 第40回 分子生物学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Matsuzaki Kenichiro、Kondo Shizuka、Ishikawa Tatsuya、Shinohara Akira
2. 発表標題 新規アンチリコンビナーゼFIGNL1による相同組換え制御機構の解析
3. 学会等名 第25回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuzaki Kenichiro, Kondo Shizuka, Ishikawa Tatsuya, Shinohara Akira
2. 発表標題 新規アンチリコンビナーゼFIGNL1による相同組換え制御機構の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Matsuzaki Kenichiro, Kondo Shizuka, Ishikawa Tatsuya, Shinohara Akira
2. 発表標題 新規アンチリコンビナーゼFIGNL1による相同組換え制御機構の解析
3. 学会等名 第42回 分子生物学会年会
4. 発表年 2019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