

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K18191

研究課題名(和文) DNA損傷シグナリングを誘導するR-loop構造を介したゲノム安定性維持機構

研究課題名(英文) The roles of R-loop structure in DNA damage signaling and genome

研究代表者

安原 崇哲 (Yasuhara, Takaaki)

東京大学・大学院医学系研究科(医学部)・助教

研究者番号：90757056

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞においてDNA二重鎖切断発生後のごく初期の時間帯にR-loop構造の形成が見られること、さらにこれらのR-loop構造はRad52とXPGIによって認識・解消されることが判明した。さらに、R-loop構造の形成・解消を起点として、転写共役型相同組換え修復が開始され、転写活性化領域におけるDNA二重鎖切断は正確に修復されることが明らかとなった。転写共役型相同組換え修復を阻害すると、ゲノム異常の発生が顕著に増加したことから、これらの機構がゲノム安定性の維持に大きく寄与することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回明らかになった転写共役型相同組換え修復のメカニズムは、ゲノム異常を原因として生じるがんなどの疾患を防ぐために細胞が保持している防御機構の一つであり、それらの破綻は疾患の発症と密接に関連していることが示唆された。このようなメカニズムの解明によって将来的には、疾患を予防したり、治療したりする手法の開発につながると思われる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that R-loops, a special structure consisting of DNA and RNA, are formed when DNA double-strand breaks are induced in the transcribed genomic regions. Moreover, recognition of R-loops by Rad52 promotes the activation of the accurate repair pathway, or homologous recombination repair, a mechanism designated as Transcription-Associated Homologous Recombination Repair (TA-HRR). Furthermore, we demonstrated that inhibiting TA-HRR significantly increased interchromatid fusions, a precursor of genomic abnormalities frequently observed in cancer, suggesting that TA-HRR is critical for suppressing cancer development. These findings represent an inherent mechanism by which human cells suppress cancer development. Detailed understanding of these kinds of protection mechanisms in human cells and how the collapse of these mechanisms leads to development of diseases may pave the way for finding a novel target to develop new drugs.

研究分野：DNA修復

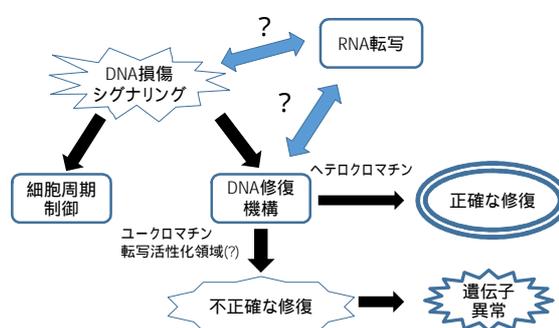
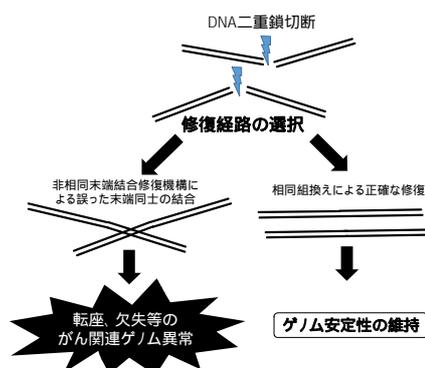
キーワード：R-loop構造 DNA二重鎖切断

1. 研究開始当初の背景

がんゲノム異常発生過程における DNA 二重鎖切断修復の経路選択の重要性

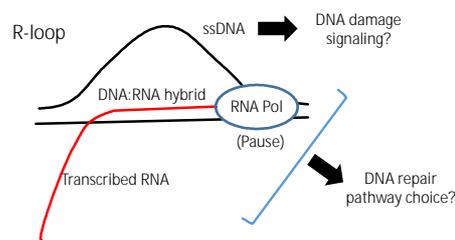
大規模なゲノムシーケンスによって、がんを特徴づけるゲノム異常について多くの情報が得られるようになってきた。それらの結果を総合すると、がんを発生あるいは進展させる遺伝子異常は、ゲノム上に生じた、変異、欠失、融合、重複などを起因として生じることがわかってきた。特に、遺伝子融合を起こすようなゲノムの異常は一見、非常に稀な現象であるように感じられるが、右に示したように、複数の DNA 二重鎖切断が比較的近傍に位置した場合には、誤った末端同士の間接結合によって容易に生じうる。従って、がんの特徴的なゲノム異常を発生させる要因は、第一義的に DNA 修復の不正確性によると考えられる。

それにもかかわらず、様々な生物モデルにおける DNA 二重鎖切断に対する応答を比較した場合、DNA 二重鎖切断を正確に修復する機構（相同組み換え修復）が機能する頻度は、多細胞生物では圧倒的に低く、正確性を犠牲にしても、素早く修復する機構（非相同末端結合）を選択することがわかってきた。もっとも、高等生物においても、正確に修復する機構が全く働かないわけではなく、その選択には、二重鎖切断が生じた周囲の何らかのゲノム環境が大きく影響していると考えられてきた。俯瞰的に考えると、ゲノムサイズが大きくなるに従って、すべてを正確に修復することは難しくなり、正確に修復すべき領域を取捨選択しているとも考えられる。しかしながら、この選択がいかに行われているかについては数十年來、当該分野における議論の的であり、未だ解決は見られていない。これまでの研究で、機構は不明ながらも現象として観察されてきたことは、クロマチンが開いた状態にある領域（ユークロマチン）において不正確な非相同末端結合が選択され、クロマチンが閉じた状態にある領域（ヘテロクロマチン）において相同組み換え修復が起こりやすいという結果であった。つまり、遺伝子の転写が比較的活性化していると考えられるユークロマチン領域においては不正確に修復するという結果であり、これでは遺伝子変異が生じる可能性が上昇してしまう（右中図）。申請者は、この観察の中には何らかの逆説的な結果が潜んでいるのではないかと推察し、修復機構とは独立した細胞機能である RNA 転写と、DNA 二重鎖切断修復の経路選択との関係性に着目した。



DNA 二重鎖切断修復、DNA 損傷シグナリングにおける RNA 転写の役割

転写によって生じた RNA は直ちにスプライシング複合体によって切り出され、修飾を受けた後に核外へと放出される。しかしながら、何らかの原因によって転写を担う RNA polymerase が停止した場合には、鋳型 DNA と転写された RNA の間で安定なハイブリッド構造（R-loop、右図参照）を作ることが知られている。この際に残される一本鎖 DNA (ssDNA) は、酸化ストレスなどによって容易に損傷が生じやすく、R-loop 構造を解消する機構を阻害すると R-loop の蓄積に伴って、ゲノムの不安定性が誘導されるという報告がなされている(1)。



転写の停止は様々な要因によって起こることが知られており、DNA 複製機構との衝突については古くから研究がなされてきた。また、DNA 上に生じた塩基損傷と転写の衝突についてもよく研究されており、転写が衝突した場合には転写共役型塩基損傷修復と呼ばれる通常の塩基損傷修復経路とは異なる経路で修復が遂行されることが知られている。一方、DNA 二重鎖切断に関しては、これまでの研究で、ATM キナーゼを介した DNA 損傷シグナリングによって、DNA 損傷周囲の転写が停止するとの報告がなされている。これらのことは、DNA 二重鎖切断を起点とした転写の停止によって R-loop 構造が形成される可能性があることを示唆する。しかしながら、DNA 二重鎖切断と転写が衝突した場合にどのような反応が起きるかについては多くの部分が未知であった。

2. 研究の目的

酵母において、R-loop 構造が DNA 二重鎖切断修復経路のうちでも、相同組み換え修復に関与するという報告がなされた(2)。さらには最近、in vitro 再構成系を用いることで、ssDNA に特異的に結合する RPA タンパク質複合体が、RNaseH1 と相互作用することで、ゲノム中に自然に発生する R-loop 構造の解消を促進することが明らかとなった(3)。従って本研究では、(1) ヒト細胞において DNA 二重鎖切断後に、生じる R-loop 構造の調節メカニズム、(2) R-loop 構造の形成メカニズム、(3) R-loop 構造を認識し、適切に処理するための分子メカニズム、(4) R-loop 構造が DNA 損傷修復経路の選択に与える影響、について着目して研究を実施した。

3. 研究の方法

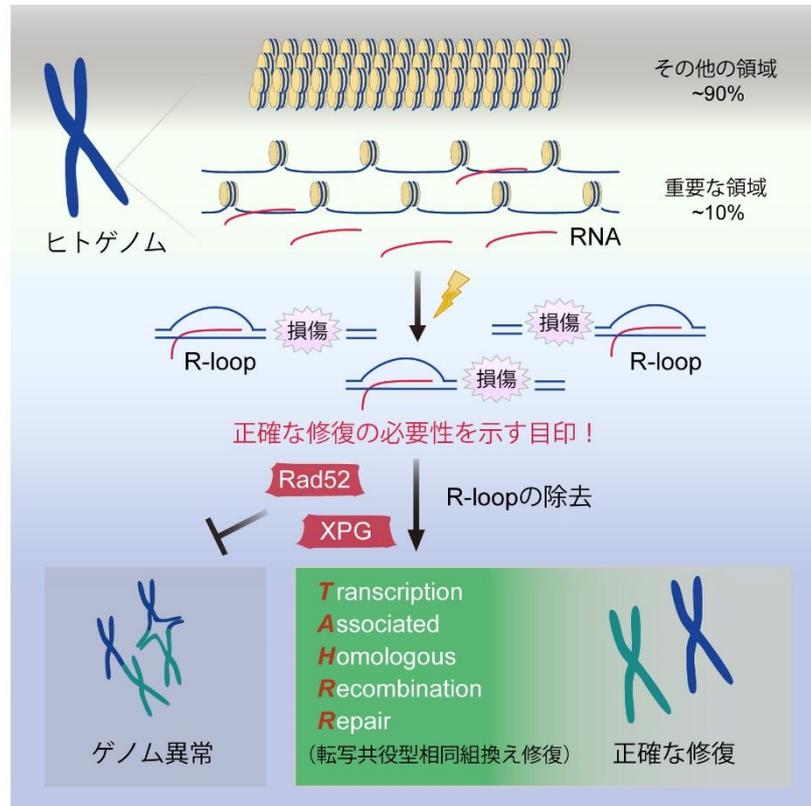
(1) ~ (3) の課題については、MaiTai laser が付属した共焦点レーザー顕微鏡を用いて、DNA 二重鎖切断後の R-loop 構造の形成および解消をモニターする系を構築した。R-loop 構造の認識には、DNA-RNA ハイブリッド二重鎖を認識するタンパク質 RNaseH1 のドメインに GFP をつけたものを利用した。DNA 損傷の誘導には、近赤外レーザー照射により、放射線照射と類似した DNA 損傷を高密度で誘導できるという報告を参考に系を構築した(4)。近赤外レーザーを線状に照射して DNA 損傷を与えた後の GFP シグナルの照射部位への集積をライブセルイメージングで追跡し、それらのシグナルを定量した。DNA 修復に関連する因子の検討と、(4) の課題については、分子細胞生物学的な手法を用いて行い、一部の課題については、共同研究先の群馬大学柴田淳史博士、米国ハーバード大学 Zou 研究室とともに行った。

4. 研究成果

ヒトゲノムは非常に広大で、体細胞では細胞内に約 60 億塩基対の情報を保持しているが、そのうちタンパク質をコードしている領域は 3%程度、non-coding RNA として転写される領域を含めても 10-15%しか RNA として読み出されていないことが知られている。従って、頻繁に RNA 転写が起こる転写活性化領域は、ゲノム中で相対的に重要な部位であると考えられる。そのような部位にもし DNA 損傷が起きた場合、それらの損傷は優先的に正確に修復することで、遺伝情報を守っていることが想定された。これまでの研究で、転写活性化領域で DNA 二重鎖切断が起こった場合、正確な修復経路である相同組換え修復が誘導されることは知られていたが、その詳しいメカニズムは分かっていなかった。

今回の研究では、転写活性化領域での DNA 二重鎖切断に対する相同組換え修復の開始に必要な因子を同定することで、転写共役型相同組換え修復 (Transcription-Associated Homologous Recombination Repair; TA-HRR) の詳細なメカニズムを明らかにすることに成功した。まず、近赤外レーザー照射と共焦点顕微鏡を用いて、リアルタイムに R-loop 構造の生成と解消をモニターできる系を立ち上げた。この系を用いて特に S/G2 期における DNA 二重鎖切断修復と R-loop 構造の関係について検討したところ、転写活性化領域に DNA 二重鎖切断が生じた際に、その周辺に R-loop 構造が損傷誘導後ごく早い時間で形成されることを示した。さらに、その形成を阻害すると、転写共役型相同組換え修復が起こらなくなることを発見した。次に遺伝子 Rad52 がこの構造を認識して集積することを明らかにし、Rad52 の集積が転写共役型相同組換え修復の開始に必要なことを発見した。面白いことに、R-loop 構造は Rad52 の集積に必要なだが、その後 Rad52 に依存して集積する XPG によって最終的に R-loop 構造は除去され、その除去が転写共役型相同組換え修復の開始に必要なことが分かった。

これらのメカニズムは、転写活性化領域にのみ存在する RNA が形成する R-loop 構造を、いわば目印として利用してその領域が重要であることを認識し、正確な修復経路を誘導していると考えられた。さらに、これらの転写共役型相同組換え修復を阻害した場合にゲノムに起こる異常を解析したところ、転写共役型相同組換え修復が機能しない細胞では、不正確な修復の結果として、がんなどで頻繁に見られるゲノム異常の前駆体となる、姉妹染色体間結合 (interchromatid fusion) と呼ばれる染色体異常の頻度が顕著に上昇することが分かった。従って、今回明らかになった転写共役型相同組換え修復のメカニズムは、ゲノム異常を原因として生じるがんなどの疾患を防ぐために細胞が保持している防御機構の一つであると考えられた。これらの結果から、R-loop 構造と DNA 二重鎖切断応答の協同によるゲノム安定性維持機構について新たな分子モデルを提唱した(5)。



今回発見されたメカニズムのモデル図

(文献)

1. Aguilera A. and García-Muse T. (2012) R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol. Cell* 46, 115-24
2. Ohle C, et al. (2016) Transient RNA-DNA Hybrids Are Required for Efficient Double-Strand Break Repair. *Cell* 167, 1001-13.
3. Nguyen HD et al. (2017) Functions of Replication Protein A as a Sensor of R Loops and a Regulator of RNaseH1. *Mol. Cell* 65 832-47.
4. Reynolds P. et al Spatiotemporal dynamics of DNA repair proteins following laser microbeam induced DNA damage - when is a DSB not a DSB? *Mutat. Res.* 2013; 756: 14-20
5. Yasuhara et al. (2018) Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. *Cell* 175 558-70.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakajima Nakako Izumi, Yamauchi Motohiro, Kakoti Sangeeta, Cuihua Liu, Kato Reona, Permata Tiara Bunga Mayang, Iijima Moito, Yajima Hirohiko, Yasuhara Takaaki, Yamada Shigeru, Hasegawa Sumitaka, Shibata Atsushi	4. 巻 91-92
2. 論文標題 RNF8 promotes high linear energy transfer carbon-ion-induced DNA double-stranded break repair in serum-starved human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102872
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2020.102872	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 該当する
1. 著者名 Kakoti Sangeeta, Yamauchi Motohiro, Gu Wenchao, Kato Reona, Yasuhara Takaaki, Hagiwara Yoshihiko, Laskar Siddhartha, Oike Takahiro, Sato Hiro, Held Kathryn, Nakano Takashi, Shibata Atsushi	4. 巻 42
2. 論文標題 p53 deficiency augments nucleolar instability after ionizing irradiation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncology Reports	6. 最初と最後の頁 2293 ~ 2302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/or.2019.7341	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 Yasuhara Takaaki, Kato Reona, Hagiwara Yoshihiko, Shiotani Bunsyo, Yamauchi Motohiro, Nakada Shinichiro, Shibata Atsushi, Miyagawa Kiyoshi	4. 巻 175
2. 論文標題 Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell	6. 最初と最後の頁 558 ~ 570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cell.2018.08.056	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 -
1. 著者名 Kato Reona, Miyagawa Kiyoshi, Yasuhara Takaaki	4. 巻 6
2. 論文標題 The role of R-loops in transcription-associated DNA double-strand break repair	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular & Cellular Oncology	6. 最初と最後の頁 1542244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23723556.2018.1542244	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 -

1. 著者名 Shibata Atsushi、Yasuhara Takaaki	4. 巻 2019
2. 論文標題 Elucidation of the Mechanism Regulating Transcription Associated Dna Double Strand Break Repair and Its Pathway	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Impact	6. 最初と最後の頁 50 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21820/23987073.2019.3.50	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 -

1. 著者名 Permata Tiara Bunga Mayang、Hagiwara Yoshihiko、Sato Hiro、Yasuhara Takaaki、Oike Takahiro、Gondhowiardjo Soehartati、Held Kathryn D.、Nakano Takashi、Shibata Atsushi	4. 巻 38
2. 論文標題 Base excision repair regulates PD-L1 expression in cancer cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 4452 ~ 4466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-019-0733-6	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 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 安原崇哲
2. 発表標題 RNA転写とDNA二重鎖切断修復のクロストーク
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Yasuhara、Kato Reona、Shibata Atsushi、Miyagawa Kiyoshi
2. 発表標題 Rad52 promotes XPG-mediated R-loop processing to initiate transcription-associated homologous recombination repair
3. 学会等名 Keystone Symposia - Genomic Instability and DNA Repair (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takaaki Yasuhara, Kato Reona, Shibata Atsushi, Miyagawa Kiyoshi
2. 発表標題 Rad52 promotes XPG-mediated R-loop processing to initiate transcription-associated homologous recombination repair
3. 学会等名 Abcam meeting - Mechanisms of Recombination 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院医学系研究科 プレスリリース http://www.m.u-tokyo.ac.jp/news/admin/release_20180921.pdf UTokyo Research 日本語版 https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/ja/articles/z0508_00107.html UTokyo Research English https://www.u-tokyo.ac.jp/focus/en/articles/z0508_00108.html</p>
--

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		
米国	マサチューセッツ総合病院		
英国	オックスフォード大学		