

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22410

研究課題名（和文）液-液相分離によるヘテロクロマチン領域での2本鎖DNA切断修復機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of double-strand DNA break repair in heterochromatic region through liquid-liquid phase separation

研究代表者

田中 耕三（Tanaka, Kozo）

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：00304452

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、新規分子CAMPが、液-液相分離および2本鎖DNA切断修復にどのように関与するのかを明らかにすることを目的とした。CAMPは、液-液相分離を起こすことが報告されたヘテロクロマチン因子HP1と結合し、CAMP自身も液滴を形成することがわかった。CAMPの液滴形成にはC末端の領域が必要であり、またCAMPが形成する液滴中には、HP1が含まれることが明らかになった。一方CAMPは2本鎖DNA切断の相同組換えによる修復に関与し、これにはCAMPのC末端が必要であることがわかった。これらのことから、CAMPがC末端を介して液-液相分離および相同組換え修復の双方に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、液-液相分離が様々な生命現象に関与することが急速に明らかになっている。本研究では、研究代表者が発見した新規分子CAMPに着目し、液-液相分離とDNA損傷修復との関連について研究を行った。その結果、CAMPが細胞内の不活性化領域であるヘテロクロマチンの形成に関与するHP1と共に液滴を形成すること、CAMPのC末端領域が液滴形成と相同組換えによるDNA2本鎖切断修復の双方に関与することが明らかになった。最近HP1による液-液相分離がヘテロクロマチン形成に関与することが報告されており、本研究の成果はヘテロクロマチン領域のDNA2本鎖切断にCAMPが関与する可能性を示すものである。

研究成果の概要（英文）：In this project, we aimed to elucidate how a novel protein CAMP contributes to liquid-liquid phase separation and DNA double-strand break repair. CAMP interacts with a heterochromatin factor HP1, which was reported to undergo liquid-liquid phase separation, and we found that CAMP itself forms droplet as well. The C-terminal region of CAMP was required for the droplet formation, and HP1 was included in the droplet formed by CAMP. On the other hand, CAMP plays a role in homologous recombinational repair of DNA double-strand breaks, and the C-terminal region of CAMP is required for the function. Collectively, it was suggested that CAMP is involved in both liquid-liquid phase separation and homologous recombination through its C-terminus.

研究分野：細胞生物学・分子腫瘍学

キーワード：細胞・組織 DNA損傷応答 ヘテロクロマチン

## 1. 研究開始当初の背景

近年、溶液が混じり合わずに分離する現象である液-液相分離(liquid-liquid phase separation)が、様々な生命現象と関連することが明らかになってきている。細胞内には核・ミトコンドリア・ゴルジ体など膜に包まれたオルガネラ以外に、核小体・中心体・PML body・Cajal body・P body など膜を持たないオルガネラが多数存在し、これらは液-液相分離によって液滴(liquid droplet)を形成していることが明らかになってきている。液滴内では、特定のタンパク質や DNA, RNA などが濃縮されかつ自由に入出入りすることにより、様々なストレスに応じて転写や翻訳など種々のプロセスをダイナミックに調節することを可能にしている。

DNA2 本鎖切断(double strand breaks; DSBs)は最も重大な DNA 損傷であり、これを修復する機構として非相同末端結合(non-homologous end joining; NHEJ)と相同組換え(homologous recombination; HR)が存在する。非相同末端結合と相同組換えの使い分けの制御(pathway choice)は、最近の大きなトピックであり、DNA2 本鎖切断末端が削られて 1 本鎖 DNA が生成されること(DNA end resection)により、相同組換えが開始されることが知られている。しかし、DNA end resection がどのように制御されているかについては不明な点が多い。我々は、以前染色体分配

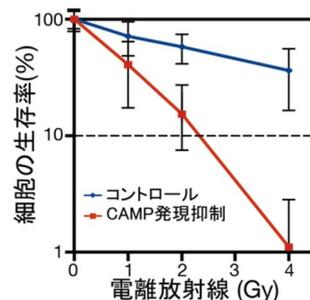


図1 CAMP 発現抑制による放射線感受性

に関連する分子として同定した CAMP(chromosome alignment-maintaining phosphoprotein; *EMBO J* 2011)が、間期の細胞においては、DNA end resection を促進することによって相同組換え修復に関与することを見出した(未発表; 図1)。CAMP は、凝縮され不活性な DNA 領域であるヘテロクロマチンの構成因子である HP1(heterochromatin protein 1)と結合する。興味深いことに、最近 HP1 が液-液相分離を起こし、ヘテロクロマチン領域を周囲から隔てている可能性が示された(*Nature* 547:236, 241, 2017)。CAMP は、液-液相分離を起こしやすいことが知られている天然変性領域(intrinsically disordered region; IDR)が大部分を占めるタンパク質であり、我々は実際精製した CAMP が単独で液滴を形成することを見出した(未発表; 図2)。このことから、CAMP が HP1 と共にヘテロクロマチン領域の液-液相分離に関与しているのではないかという着想に至った。

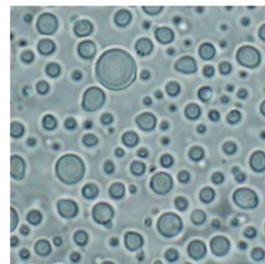


図2 CAMP による液滴形成

## 2. 研究の目的

上述のように、我々は CAMP が DNA2 本鎖切断の相同組換え修復に関与すること、また HP1 同様液-液相分離を起こすことを見出した。一方 HP1 も DNA 損傷部位に集積し、相同組換えに関与することが知られている(*J Cell Biol* 193:81, 2011)。そこで本研究では、CAMP や HP1 による液-液相分離と、DNA2 本鎖切断の相同組換えによる修復との関連を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) CAMP, HP1が液-液相分離を起こす条件の検討

昆虫細胞で発現させた CAMP を精製し、濃度・温度・塩濃度など、CAMP が液-液相分離を起こす条件を調べる。また種々の変異体を作成することにより、液-液相分離に必要な CAMP の領域、およびリン酸化の影響について検討する。さらに CAMP と HP1 が液滴に共存するかを明らかにする。

### (2) CAMP, HP1による液滴形成と相同組換えによるDNA2本鎖切断修復との関連

U2OS 細胞などのヒト細胞株で CAMP の発現を抑制し、X 線照射や薬剤処理によって生じた DNA2 本鎖切断の修復への影響を調べる。またレーザー照射によって生じた DNA2 本鎖切断への CAMP の集積を検討する。CAMP の DNA end resection への関与について、CAMP 発現抑制細胞に生じさせた DNA2 本鎖切断へのリン酸化 RPA の局在により解析を行う。1. で検討した CAMP の変異体を CAMP 発現抑制細胞に発現させることによって、相同組換えに関する機能と液-液相分離との関連を明らかにする。

## 4. 研究成果

(1) CAMP, HP1が液-液相分離を起こす条件の検討

CAMP が液-液相分離を起こす条件を検討したところ、CAMP の濃度が 10  $\mu\text{M}$  以上、塩濃度が 150 mM 以下で液滴を形成することがわかった ( 図 3 )。また種々の変異体を用いた検討によ

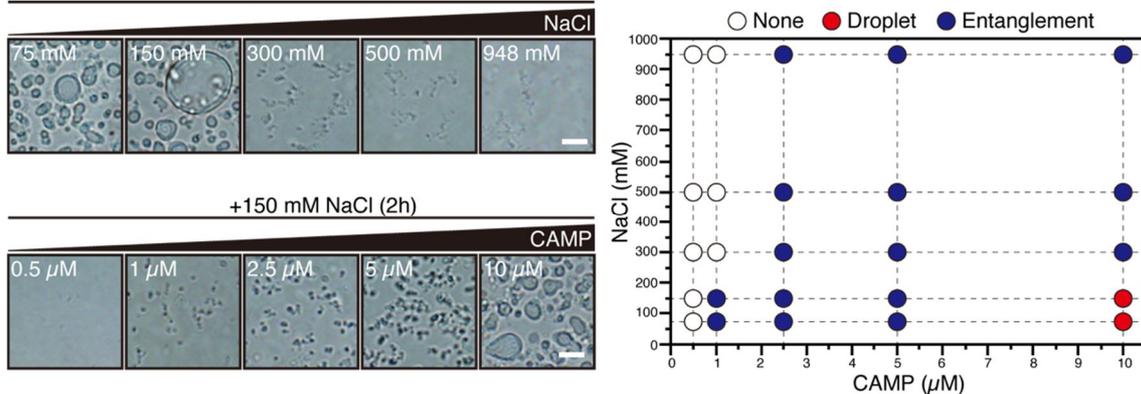


図 3 CAMP の液滴形成の条件検討

り、CAMP の C 端側の領域が液滴形成に必要であることがわかった。リン酸化部位をアラニンに置換した変異体では、野生型よりも液滴を形成しやすい傾向が見られた。さらに CAMP の液滴中には、HP1 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ の全てが共存することがわかった ( 図 4 )。

(2) CAMP, HP1による液滴形成と相同組換えによるDNA2本鎖切断修復との関連

U2OS 細胞で CAMP の発現を抑制すると、camptothecin 処理によって生じた DNA2 本鎖切断へのリン酸化 RPA の集積の遅延が見られたことから、DNA end resection の障害により相同組換えによる修復が遅延することが示唆された ( 図 5 )。また CAMP はレーザー照射によって生じた DNA2 本鎖切断へ集積することがわかった。1. で検討した CAMP の変異体を CAMP 発現抑制細胞に発現させたところ、C 端側の領域を欠く変異体では camptothecin 処理による DNA2 本鎖切断へのリン酸化 RPA の局在が回復しなかったことから、C 端側の領域が相同組換えに関する機能と液-液相分離と双方に関与することが明らかになった。

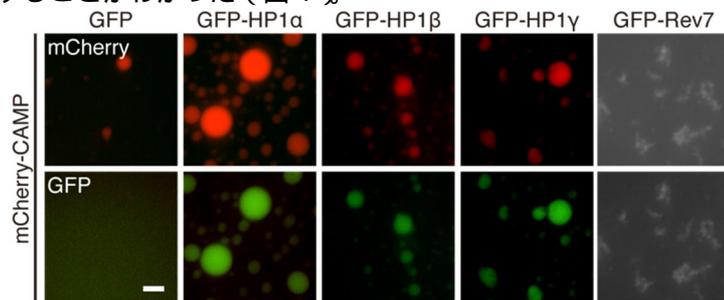


図 4 CAMP の液滴への HP1 の共存

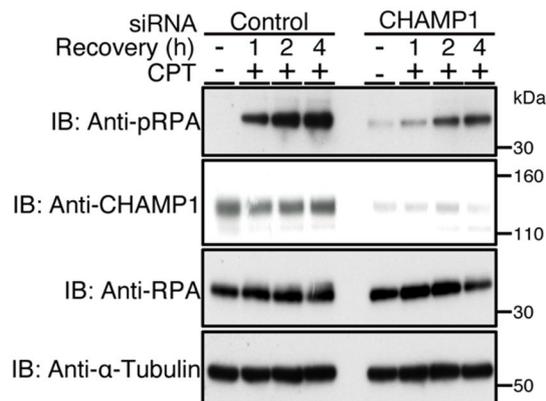


図 5 CAMP の発現抑制によるリン酸化 RPA の集積の遅延

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishizawa Hironari, Matsumoto Mitsuyo, Chen Guan, Ishii Yusho, Tada Keisuke, Onodera Masafumi, Kato Hiroki, Muto Akihiko, Tanaka Kozo, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 12
2. 論文標題 Lipid peroxidation and the subsequent cell death transmitting from ferroptotic cells to neighboring cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Death & Disease	6. 最初と最後の頁 332
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41419-021-03613-y	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 Uchida Kazuhiko S.K., Jo Minji, Nagasaka Kota, Takahashi Motoko, Shindo Norihisa, Shibata Katsushi, Tanaka Kozo, Masumoto Hiroshi, Fukagawa Tatsuo, Hirota Toru	4. 巻 31
2. 論文標題 Kinetochores stretching-mediated rapid silencing of the spindle-assembly checkpoint required for failsafe chromosome segregation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 1581 ~ 1591.e3
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.cub.2021.01.062	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 Ito S, Goto H, Kuniyasu K, Shindo M, Yamada M, Tanaka K, Toh GT, Sawa M, Inagaki M, Bartek J, Masai H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Cdc7 kinase stimulates Aurora B kinase in M-phase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 18622
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-54738-2.	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 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 池田真教, 成田知恕, 清水将裕, 古寺哲幸, 田中耕三
2. 発表標題 物性学的視点から捉える細胞周期制御因子CAMPの機能制御
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋野真帆, 家村顕白, 田中耕三
2. 発表標題 新規分子CAMPによる分裂期細胞死制御機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会東北支部第86回例会・シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Masanori Ikeda, Kozo Tanaka
2. 発表標題 Defects in kinetochore property in cancer cells related to chromosomal instability
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋野真帆, 家村顕白, 田中耕三
2. 発表標題 分裂期制御分子CAMPによる抗アポトーシス分子の量的制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大内勇之介、藤田拓樹、宇井彩子、池田真教、菅野新一郎、安井明、田中耕三
2. 発表標題 染色体分配関連分子CAMPによるDNA二本鎖切断修復機構とその生理学的役割の解明
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 樋野真帆, 家村顕白, 池田真教, 田中耕三
2. 発表標題 細胞周期制御因子CAMPによる抗アポトーシス分子の量的制御
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大内勇之介、藤田拓樹、宇井彩子、池田真教、菅野新一郎、安井明、田中耕三
2. 発表標題 染色体分配関連分子CAMPによるDNA二本鎖切断修復機構とその生理学的役割の解明
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 池田真教、成田知恕、清水将裕、古寺哲幸、田中耕三
2. 発表標題 ゲノム安定性維持における天然変性タンパク質CAMPの動的制御
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会・第71回日本細胞生物学会大会合同年次大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井正義, 家村顕白, 服部聡子, 吉川貴子, 萩原英雄, 安澤隼人, 木下賢吾, 大隅典子, 宮川剛, 田中耕三
2. 発表標題 染色体整列因子CAMP(CHAMP1)欠損による知的障害発症メカニズムの解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樋野真帆, 家村顕白, 田中耕三
2. 発表標題 新規分子CAMPによる分裂期細胞死制御機構の解明
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学加齢医学研究所 <a href="http://www.idac.tohoku.ac.jp/site_ja/">http://www.idac.tohoku.ac.jp/site_ja/</a> 東北大学加齢医学研究所分子腫瘍学研究分野 <a href="http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/molonc/index.html">http://www2.idac.tohoku.ac.jp/dep/molonc/index.html</a>
---

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	カリフォルニア大学		
英国	エジンバラ大学		