

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：31305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K00536

研究課題名(和文) DNA損傷初期応答因子によるDNA修復経路選択の制御

研究課題名(英文) Regulation of DNA repair pathway choice by early DNA damage response factors.

研究代表者

柳原 晃弘 (YANAGIHARA, Akihiro)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：70423051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷応答因子の中で、NBS1タンパク質やATMキナーゼは初期のステップで働く因子である。NBS1の分子機能解析から、NBS1が持つ新たな機能として、ATMシグナル経路の一部だけに関わると同時にDNA二重鎖切断(DSB)修復の一部の経路だけを促進する特殊な機能を有していることを示す実験結果が得られた。この結果から、NBS1がATMの特定の役割をピンポイントに調節することでDSB修復を調節しているという可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：NBS1 and ATM are DNA damage response factors that are involved in an early step of the cascade. Molecular analysis showed that NBS1 has a novel function to enhance a particular pathway of the ATM signaling and the DSB repair system. Our results suggest that NBS1 might regulate DSB repair via pinpoint control of ATM signaling pathway.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 放射線 DNA二重鎖切断

1. 研究開始当初の背景

電離放射線は DNA に様々な種類の傷をつける。DNA は生命の設計図であるため、DNA の傷は生命を脅かすものである。放射線が作る DNA 損傷の中で、特に重篤な損傷は DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand break: DSB) であり、DSB 修復遺伝子の働きが損なわれると細胞は放射線高感受性を示すようになる。このような遺伝子群の一つに NBS1 遺伝子がある。NBS1 は稀な遺伝病であるナイミーヘン症候群 (Nijmegen breakage syndrome: NBS) の原因遺伝子であり、この病気は放射線感受性や高発がん性を特徴とする。これまでの研究から、NBS1 タンパク質は DSB 応答性細胞内反応の中でも特に初期のステップで機能することが明らかとなっており、「初期応答因子」として認識されている。初期応答の一例として、核内フォーカスの形成が挙げられる。NBS1 を含む一群の初期応答因子は、放射線照射直後に (秒単位で) 核内で一様に拡散した状態から点状の局在へと局在変化をおこす。この点状の局在はフォーカスと呼ばれ、DSB 部位へ数多くのタンパク質分子が集積したものと考えられている。DSB 初期応答はタンパク質リン酸化酵素 ATM によって支配されている。放射線照射後に細胞内では ATM が素早く活性化し、初期応答因子のフォーカス形成などを促進する。NBS1 のフォーカス形成も ATM によるリン酸化に依存しており、実際、ATM 特異的阻害剤処理により NBS1 のフォーカス形成は阻害される。

放射線によって生じた DSB は、DSB 修復機構によって修復される。修復されずに残った残存 DSB は細胞に死をもたらす。また、修復の過程で DNA に変化を残してしまうと、それが細胞死の引き金になったり、細胞ががん化しやすくなったりする。初期応答から修復反応に至る過程は多くの部分が不明であったが、研究開始当初の段階では一部について明らかになりつつあった。DSB は大きく分けて二つの主要な経路によって修復される。一方は相同組換え修復経路 (homologous recombination: HR) と呼ばれ、もう一方は非相同末端結合経路 (non-homologous end joining: NHEJ) と呼ばれる。HR では修復過程で無傷な鋳型 DNA 鎖が利用されるため、正確な修復が可能であるが、NHEJ では鋳型 DNA が使われないために再結合部位に欠失や挿入などの変化が生じやすく、正確性が低い修復経路とみなされている。修復の正確性の観点からすれば、HR が優先的に修復した方が良さそうに思えるが、実際にはヒトを含む多くの生物で DSB の大半は NHEJ で修復されている。正確性が低いということは、細胞死や細胞のがん化を起しやすいくことを意味しており、NHEJ が主要な経路であるという事実は大いなる疑問として研究者を悩ませている。この疑問に対する答えは出ていないものの、いくつかのアプローチでこの問題に

取り組むことが可能である。一つには、細胞は NHEJ を主要な経路たらしめているシステムを有しているはずであるという仮説を立てることができ、この仮説の検証およびこのシステムの全貌解明が重要な課題の一つとなる。

NHEJ と HR の使い分けの割合が大きく異なるという疑問を解決する手がかりとして、細胞周期依存的な使い分けの違いに注目することができる。細胞は G1 期、S 期、G2 期、M 期と呼ばれる 4 つの連続する過程をぐるぐる回りながら増殖しているが、HR に必要とされる鋳型 DNA が存在するのが S 期から G2 期にかけてであるため、この時期でのみ HR が機能するのに対し、NHEJ は細胞周期を通して機能できる。そのため NHEJ の割合が HR よりも高いのだと考えることができる。しかしながら、HR のための鋳型が完全に揃っている G2 期での解析でも、HR よりも NHEJ が優勢である事が示されており (Beucher et al., 2009, EMBO J)、なぜこれほどまでに NHEJ が優先的に選択されるのかは細胞周期の観点からだけでは説明がつかず、未解明のシステムが存在していると考えられる。そのシステムとは、DSB の「修復経路選択システム」であると想定されている。

DSB 修復の経路選択問題は国内外で長い間強い関心が持たれてきた。最近、53BP1-Rif1 タンパク質複合体が HR に対して阻害的な作用を持つことと、CtIP タンパク質がそれに対して拮抗的に作用することで HR を促進することが報告され (Zimmermann et al., 2013, Science; Virgilio et al., 2013, Science)、この問題の解決に糸口が見えてきている。CtIP はリン酸化酵素 CDK2 により S-G2 期特異的にリン酸化されるが、このリン酸化が 53BP1-Rif1 の抑制に必要であることも示されている (Escribano-Diaz et al., 2013, Mol Cell)。したがって、HR の開始において CtIP のリン酸化は重要な鍵の一つと言える。また、CDK2 による S-G2 期特異的な NBS1 のリン酸化も HR の進行に必要であると報告されている。これらの報告は、こういったタンパク質複合体の働きやリン酸化が HR の必要条件であることを示している。しかしながら、これらは経路選択の一面を明らかにしてはいるものの、NHEJ が優勢である事を説明するまでには至っていない。では、NHEJ はどのように促進され、HR はどのようにして低く抑えられているのだろうか。この問いに対する答えを求める戦略として、本研究では損傷初期応答から修復に至る過程における初期応答因子の働きに注目した。放射線によって DSB が生じた後、どの段階で、またいくつのステップによってその修復経路が選択されるのかは不明であるが、経路選択が実行される時期として初期応答は一つの有力な候補と考えられる。

初期応答因子と DSB 修復との関係は完全には解明されていないものの、その関係性を裏付ける証拠がいくつか見ついている。NBS1 が HR に必要であることは複数の研究グループによって確かめられており、この機能は主に DSB 修復タンパク質である MRE11 タンパク質および RAD50 タンパク質を DSB 部位に運ぶことによるものであると考えられている。NHEJ については議論の余地があるものの、一部の NHEJ については NBS1 の関与が強く示唆されており、我々の実験からもそれを示唆するデータが得られていた。NBS1 以外の初期応答因子では、NBS1 のフォーカス形成を制御する ATM についても、HR と NHEJ の両経路に必要であるという研究報告がなされていた。ATM は NBS1 と直接結合し、NBS1 をリン酸化することも知られており、NBS1 との関わりが深いタンパク質である。ATM のリン酸化活性は NBS1 のフォーカスのみならず、他の DSB 修復関連タンパク質のフォーカス形成にも影響を与えるため、ATM が HR や NHEJ に関与するという可能性はこれらの事象からだけでも想像できるが、ATM がリン酸化する基質は千数百もしくはそれ以上とも言われており、DSB 修復における ATM の機能解析は複雑な様相を呈している。さらに複雑なことに、NBS1 は ATM の活性化に必要であるとされており、NBS1 の機能欠損が ATM の機能不全をもたらし、逆に ATM の機能欠損が NBS1 の機能に影響を与えるという構図になっているのである。このような状況もあり、DSB 修復における NBS1 の機能と ATM の機能がどのように関連しあっているのかは未解明であった。

我々は先行研究において NBS1 が NHEJ に関与するというデータを得ており、またこの機能を発揮するために必要な新規機能ドメインを特定していた。このドメインは HR による修復には不必要であることを示すデータが得られていたため、DSB 修復における NBS1 の機能を HR と NHEJ に分けて解析することが可能であると考えられた。片方の経路だけを単独で解析できるということは、経路選択問題にも切り込んでいけるという可能性を示しており、初期応答因子の経路選択への関与という興味深い問題への道筋が開けていた。また、この新規機能ドメインは ATM との結合に必要でないというデータも得ており、DSB 修復における ATM の機能と NBS1 の機能の関係を解析することも可能であると考えられた。

<引用文献>

Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., et al. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *The EMBO Journal*, 28(21),

3413-3427.

Zimmermann, M., Lottersberger, F., Buonomo, S. B., Sfeir, A., & de Lange, T. (2013). 53BP1 regulates DSB repair using Rif1 to control 5' end resection. *Science*, 339(6120), 700-704.

Di Virgilio, M., Callén, E., Yamane, A., Zhang, W., Jankovic, M., Gitlin, A. D., et al. (2013). Rif1 prevents resection of DNA breaks and promotes immunoglobulin class switching. *Science*, 339(6120), 711-715.

Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Xing, M., Young, J. T. F., Tkáč, J., et al. (2013). A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Molecular Cell*, 49(5), 872-883.

2. 研究の目的

修復経路選択への NBS1 の関与の仕方を考える上で、それが拮抗的な作用なのか、非拮抗的な作用なのかという問題を考える必要がある。すなわち、NHEJ が下がれば HR が上がるのか、NHEJ が下がっても HR に影響は及ばないのかという問題である。前者の場合、NBS1 はまさに経路の振り分けをしているということになり、後者の場合は NHEJ の促進を行うことで NHEJ を主要な経路たらしめるのに一役買っているということになる。本研究では、正確性が低いとされる NHEJ がどのようなメカニズムによって DSB 修復経路の主要な経路として働いているのかという謎を解き明かすため、損傷初期応答因子であり HR・NHEJ 両修復経路に共に必要とされる NBS1 タンパク質が修復経路選択にどのように関わっているのかを明らかにすることを目的とした。また、NBS1 の DSB 修復における機能が ATM を中心としたリン酸化シグナルネットワークを介したもののなかどうかという点にも着目し、この問題解明にも取り組んだ。

3. 研究の方法

NBS 患者由来細胞を用いた実験や NBS1 のノックダウン実験は、NBS1 の機能を解析する上で有効な手段ではあるものの、ある特定の機能だけに注目した解析には不向きである。そこで、本研究ではゲノム編集技術により新規機能ドメインだけに変異を導入したノックイン細胞を作製し、この細胞株の解析を行うこととした。対照として、ノックイン細胞に正常型の NBS1 遺伝子を導入した正常型遺伝子再導入細胞株も作製し、ノックイン細胞とセットで解析を行った。正常型遺伝子再導入細胞株は、ノックイン細胞株で失われた機能が回復することを想定して作製した。また

比較のため、ノックイン細胞にノックインと同じ変異型の NBS1 遺伝子を導入した変異型遺伝子再導入細胞株も作製した。変異型遺伝子再導入細胞株は、ノックイン細胞株で失われた機能が回復しないことを想定して作製した。さらに、NBS 患者由来細胞や NBS1 のノックダウン細胞のように NBS1 の多くの機能を失わせた NBS1 欠損細胞もゲノム編集によって作製し、この細胞株も比較対象として使用した。ゲノム編集に用いた親株はどちらも同じ細胞株であり、親株も対照として使用した。

DSB 修復能を評価するため、作製した細胞株の放射線感受性をコロニー形成法によって調べた。また、HR 修復能を評価するため、DNA 架橋剤であるマイトマイシン C (MMC) に対する感受性もコロニー形成法によって調べた。

DSB の HR による修復能と NHEJ による修復能を別の面から定量評価するため、作製した細胞株での両修復経路による修復頻度を緑色蛍光タンパク質 (GFP) を指標にしたレポーターアッセイで調べた。

作製した細胞株における ATM の活性化を調べるため、ATM によってリン酸化されることが知られている複数のタンパク質のリン酸化をウエスタンブロットングにより調べた。また、放射線によって形成される ATM 依存的なフォーカス形成への影響を免疫染色法によって調べた。

新規機能ドメインに結合する新規タンパク質を探索するため、細胞抽出液を用いて免疫沈降を行い、質量分析によるタンパク質の同定を行った。また、ウエスタンブロットングによる確認実験を行った。

4. 研究成果

ゲノム編集によって導入された NBS1 変異は PCR およびシーケンス解析により確認された。遺伝子再導入細胞株の NBS1 タンパク質の発現量はウエスタンブロットングによって調べられ、導入した正常型 NBS1 と変異型 NBS1 は同程度の発現量であることが確かめられた。NBS1 欠損細胞株での NBS1 の発現量は親株と比較して著しく低下しており、この細胞株では NBS1 の機能が大きく低下していることが予想された。

放射線感受性を調べた結果、NBS1 欠損細胞株は高い感受性を示した。ノックイン細胞株でも高い放射線感受性が認められたが、正常型遺伝子再導入細胞株では親株と同程度まで生存率が回復しており、この感受性が導入した変異によるものであることが示唆された。変異型遺伝子再導入細胞株では生存率の回復は認められず、この変異が放射線高感受性の原因であることがさらに示された。NBS1 欠損細胞株は MMC に対しても高い感受性を示した。ところが、放射線の場合と異なり、ノックイン細胞株は MMC に対する感受性を示

さず、親株と同程度の生存率を示した。HR の機能に欠損を持つ細胞は MMC に対して高い感受性を示すことが多く、NBS1 欠損細胞株が示した MMC 感受性からこの細胞での HR 機能欠損が推測された。一方、ノックイン細胞株が MMC 感受性を示さなかったことは、導入した変異が HR には不要であることを示唆している。ノックイン細胞株の方が親株よりも MMC 抵抗性であるということは観察されず、この変異導入により HR が亢進するということは無さそうだと考えられた。

GFP を指標にした NHEJ レポーターアッセイの結果から、変異の導入により NHEJ 修復頻度が低下し、正常型遺伝子の再導入によりそれが回復することが示された。また、この回復は変異型遺伝子の再導入では認められなかった。これらの結果はこの変異が NHEJ に必要であることを示している。HR レポーターアッセイでは、変異の有無で HR 修復頻度に顕著な差がないことが示された。この結果は、ノックイン細胞では NHEJ 修復頻度が低下しているものの、その分 HR 頻度が上昇しているわけではないということを示している。すなわち、本研究で対象とした NBS1 の新規機能ドメインは NHEJ を促進する機能は持っているものの、HR を低く抑えるような機能は持っていないと考えられる。

放射線によるフォーカス形成を調べた結果、ノックイン細胞株でも H2AX、MDC1、NBS1 等の核内フォーカスの形成に異常は認められなかった。この結果は、ATM キナーゼがこの細胞内の初期応答において十分に機能していることを示唆している。しかしながら、ATM によってリン酸化されることが知られている複数のタンパク質のリン酸化を調べると、DNA 損傷によるリン酸化の程度が低下していることが認められた。この結果は、初期応答因子のフォーカス形成より後の ATM の役割については、この細胞内では十分な働きができていないことを示唆しており、ATM が活性化した後から基質をリン酸化するまでの間に、NBS1 が何らかの形で重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

本研究で解析した新規機能ドメイン変異細胞は放射線高感受性を示し、NHEJ による DSB 修復能も低下していることが明らかとなった。ATM は放射線抵抗性に必要であり、NHEJ にも必要であるという報告があり、本研究の編集細胞が示す表現型とよく一致する。NBS1 と ATM の関係性の深さを考え合わせると、この編集細胞では ATM の DSB 修復における機能が十分に発揮されていないという可能性が考えられる。一方で、この変異細胞では HR 修復が正常に機能しているという結果が得られた。ATM は HR 修復にも必要であるということが報告されており、この相違点は興味深い。以上の結果から、本研究で解析対象とした NBS1 の機能ドメインの変異によって、DNA 損傷による ATM の活性化は正常に起こる、NHEJ に必要な ATM 機能は損なわれる、HR

に必要な ATM 機能に影響は及ばない、と推測される。これらの特徴から、NBS1 は活性化した ATM のシグナルを下流の分岐に流す際の調整役を担っており、このような分岐ごとの調節がそれぞれの DNA 修復経路の活性調節にも繋がっているのではないかと考えられる。

NBS1 に結合する新規タンパク質の探索実験から、これまでに報告の無い新規結合タンパク質を同定することができた。この結合はウエスタンブロットティングによっても確認された。また、この結合は新規機能ドメインに強く依存していることが免疫沈降-ウエスタンブロットティングの実験結果から示された。NBS1 断片を用いた免疫沈降実験からは、NBS1 が翻訳後修飾を受けることが判明した。この修飾は、脱リン酸化酵素処理によって消失し、既知のリン酸化サイトの変異に影響されなかったことから、未報告の新規リン酸化であると考えられた。これらの結果については、今後のさらなる解析によりどのような生物学的意義があるのかを明らかにしたい。

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 1 件)

- (1) Akihiro Kato and Kenshi Komatsu
RNF20-SNF2H pathway of chromatin relaxation in DNA double-strand break repair.
Genes, 2015, vol. 6, p592-606, 査読あり
DOI: 10.3390/genes6030592

[学会発表] (計 4 件)

- (1) 加藤晃弘、柳原啓見、小松賢志
NBS1 の新規 C 末端ドメインは NHEJ の亢進に参与する
第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会, 2017
- (2) Akihiro Kato, Hiromi Yanagihara, and Kenshi Komatsu
NBS1 controls homologous recombination and non-homologous end joining in different ways.
The 10th International 3R Symposium, 2016
- (3) Akihiro Kato and Kenshi Komatsu
Functional analysis of the novel C-terminus domain of NBS1.
第 74 回日本癌学会学術総会, 2015
- (4) Akihiro Kato, Hiromi Yanagihara and Kenshi Komatsu
Analysis of the novel functional domain of NBS1.
ICRR2015, 2015

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

柳原 晃弘 (YANAGIHARA, Akihiro)

東北医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号 : 7 0 4 2 3 0 5 1