

令和 4 年 6 月 19 日現在

機関番号：14301
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2017～2021
課題番号：17K00548
研究課題名(和文) 鋳型乗り換え経路によるゲノム維持機構の解明

研究課題名(英文) English title

研究代表者

茂木 章 (Motegi, Akira)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80452332

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では脊椎細胞における複製フォーク巻き戻し経路(RFR)と相同組換え経路(HDR)との機能的な相関関係を明らかにすることを目的として、RFRで働くと考えられる1)SHPRH、2)RAD18、及び3)ZRANB3とHDRの中心因子BRCA1との二重変異DT40細胞株を作成し、その表現型解析を行った。各二重変異株はオラパリブ感受性、標的組換え効率、組換えアッセイにおいてBRCA1単独変異株より強い表現型を示したことから、RFR経路はHDRと競合的に働くことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複製ブロックの解除は生命にとって根源的な課題である遺伝情報の複製・維持において必須の仕組みである。本研究の対象であるRFR経路は、複製ブロックの解除において従来からよく知られている相同組換えと論理的に競合するが、それを逆遺伝的手法によって検証、実証した点に学術的意義がある。また、新しいタイプの抗がん剤として注目されているPARP阻害剤はBRCA1の機能を欠損したがんでより致死作用が強いが、その作用機序として複製再開の仕組みとの関連が考えられる。本研究の結果はPARP阻害剤をはじめとした新しいがん治療薬の作用機序についての基礎的知見を提供する点に社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have addressed to the possible functional relationships between the replication fork reversal (RFR) pathway and the homology-dependent repair (HDR) pathway in vertebrate cells by generating and analyzing DT40 cell lines doubly deficient in one of the RFR genes 1)SHPRH, 2) RAD18, or 3)ZRANB3 along with the HDR gene BRCA1. I observed the enhanced sensitivity towards the PARP inhibitor Olaparib, defects in the gene targeting efficiencies, and reduced rates of the recombination in the substrate assay in double knock-out (KO) cells than BRCA1 single KO cells. All of those results suggests that RFR may have competitive roles with HDR in promoting the restoration of stalled replication forks.

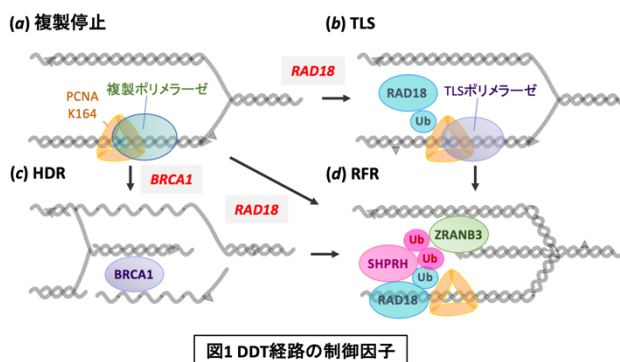
研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷トランス 複製後修復 相同組換え ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

ゲノムのDNA損傷や複製ストレスによって複製フォークが停止すると、細胞は損傷を迂回して複製を再開させる仕組み(経路)を複数備えている(図1)。損傷トレランス機構を構成する代表的経路として、鋳型忠実度が低い特殊なDNAポリメラーゼによる損傷乗り越え合成経路(translesion synthesis; TLS)(図1右上)や、姉妹染色分体を鋳型とした相同組換え(homology-dependent repair; HDR)経路(図1左下)がよく知られている。出芽酵母ではこれらの経路に加えて一度開裂した複製フォークを巻き戻し、停止した複製ポリメラーゼの鋳型を姉妹染色分体の新生鎖(=元の鋳型と同一配列)に乗り換える複製フォーク巻き戻し経路(replication fork reversal;

RFR)(図1右下)が知られていた。申請者の研究をはじめとした近年の研究から、この経路がヒトをはじめとした高等生物でも存在する可能性を示唆する知見が増えてきているが、RFR経路の働きや他の経路との相互関係はなお明らかでない。



2. 研究の目的

そこで本研究では脊椎細胞における(1)RFR経路そのものの機能、及び(2)RFR経路とHDR経路、TLS経路との機能的な相関関係を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

DT40細胞株を用いたこれまでの研究からSHPRH/BRCA1二重変異株がBRCA1単独変異株より強いPARP阻害剤感受性を示すことがわかった。この表現型を手掛かりにしてさらに検証を行うために具体的に以下の課題に取り組む。

- (1) SHPRH/BRCA1二重変異DT40株の表現型の解析をさらに進める。
- (2) またPRRの中心因子であるRAD18とBRCA1二重変異株、及びRFRに関わることが示唆されているZRANB3の単独変異、ZRANB3/BRCA1二重変異株を作成し、これらの表現型をSHPRH/BRCA1二重変異株と比較検証する。

4. 研究成果

(1) BRCA1 Δ11/Δ11細胞株の表現型

まず初めにHDRの中心因子BRCA1の変異株を作成し、その表現型の解析を行った(図2)。トリBRCA1遺伝子は22エクソンからなる。申請者はBRCA1遺伝子のエクソン11を薬剤耐性マーカーに置換した株(BRCA1Bsr/Puroと呼ぶ)を作成した(図2a)。この株はnon-sense mediated mRNA decayのためにBRCA1⁻相当の表現型を示すが、

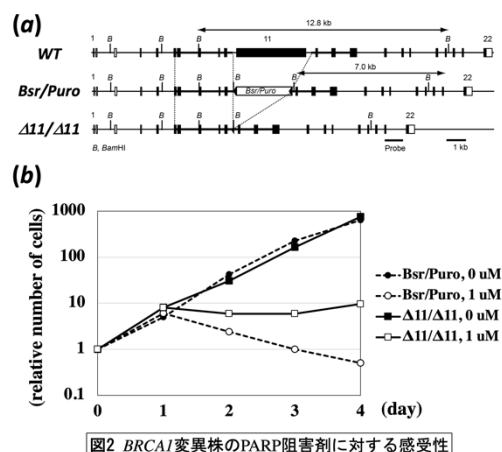


図2 BRCA1変異株のPARP阻害剤に対する感受性

マーカー除去後 (*BRCA1* $\Delta 11/\Delta 11$ と呼ぶ) はエクソン 10 と 12 がフレームが通っているためにエクソン 11 部分を欠いた *BRCA1* ^{$\Delta 11$} タンパク質を発現し、機能分離型変異の表現型を示す。すなわち、*BRCA1* $\Delta 11/\Delta 11$ の NHEJ 能はほぼ変わらないが、PARP 阻害剤に対する感受性は *BRCA1Bsr/Puro* に比べて軽減し (図 2b)。 *BRCA1* の HDR 欠損をより反映した変異体であることがわかった。

(2) *SHPRH/BRCA1* 細胞株の表現型

これまでの *SHPRH/BRCA1* 二重変異株の解析からオラパリブによる細胞毒性の解除において *SHPRH* は *BRCA1* と独立した機能がある可能性が示唆された。

SHPRH/BRCA1 二重変異株における相同組換え能を検証するため

に、以下の 2 つの実験を行なった。1) *OVA* 遺伝子座での標的組換え効率の測定 (表 1)。 *SHPRH* $-/BRCA1Bsr/Puro$ 株の標的組換え効率は、*BRCA1Bsr/Puro* 株より低下した。2) ゲノムに組み込まれた相同組換え基質を用いた *SC-neo* アッセイ (図 3) (不完全な 2 コピーのネオマイシン耐性遺伝子の一部が制限酵素 I-SceI

による二本鎖切断によって誘導された相同組換えによって修復されるとネオマイシン耐性になるコロニー数を計測)。 *SC-neo* アッセイの結果は標的組換え効率の結果にほぼ比例した。これらのことから *BRCA1* が存在しない (*Bsr/Puro* 及び $\Delta 11/\Delta 11$)

ときになお見られる相同組換えは *SHPRH* に依存していると考えられた。

(3) *RAD18* $-/SHPRH$ $-/BRCA1Bsr/Puro$ 三重変異株の表現型解析

SHPRH $-/BRCA1$ $-/$ 株で見られた表現型をさらに検討するために、PRR の中心因子である *RAD18* の変異を加えた *RAD18* $-/SHPRH$ $-/BRCA1Bsr/Puro$ 三重変異株を作成した。この株は *SHPRH* $-/BRCA1Bsr/Puro$ 二重変異株より強いオラパリブ感受性を示した。このことから PRR と HDR はオラパリブ毒性の解除に相加的な機能を持っていることが示唆された。

(4) *ZRANB3* $-/$ 細胞株及び *ZRANB3* $-/BRCA1$ $-/$ 細胞株の表現型

ZRANB3 $-/$ 単独変異株は、主要な各種 DNA 損傷に対して謙虚な感受性を示さなかった。また、*ZRANB3* $-/BRCA1$ $-/$ 株は、*SHPRH* $-/BRCA1$ $-/$ 株とほぼ同様の、DNA 損傷感受性パターンを示した。このことから、*SHPRH* と *ZRANB3* は共通した機能を持つ可能性が示唆された。

Table 1. Targeted integration frequencies in wild-type and mutant cells.

Genotype	locus	Frequencies	References
Wild type	<i>OVA</i>	92.3% (24/26)	*1
<i>SHPRH</i> $-/$	<i>OVA</i>	90.6% (29/32)	This study
<i>BRCA1</i> $\Delta 11/\Delta 11$	<i>OVA</i>	41.4% (12/29)	This study
<i>SHPRH</i> $-/BRCA1$ $\Delta 11/\Delta 11$	<i>OVA</i>	78.1% (25/32)	This study
<i>BRCA1</i> $-/$	<i>OVA</i>	13.5% (5/37)	*1
<i>SHPRH</i> $-/BRCA1$ $-/$	<i>OVA</i>	6.7% (2/30)	This study
		0% (0/32)	

*1. 2010 PLoS Genet. Nakamura *et al*

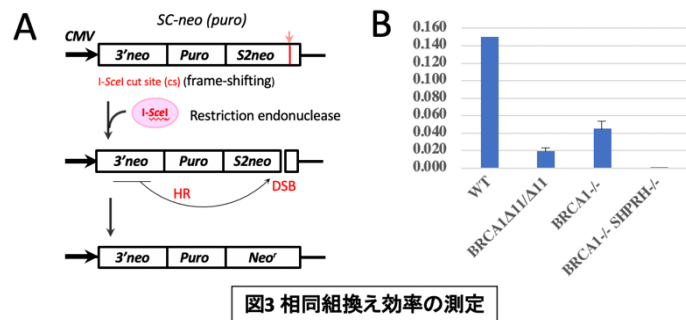


図3 相同組換え効率の測定

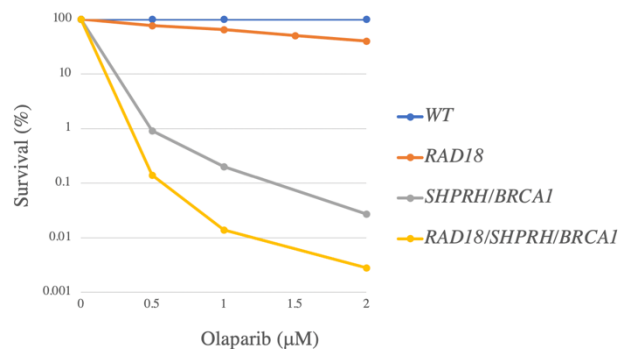


図4 *RAD18* $-/SHPRH$ $-/BRCA1$ $-/$ 変異株のオラパリブ感受性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 1. Koji Nishimoto, Hiroyuki Niida, Chiharu Uchida, Tatsuya Ohhata, Kyoko Kitagawa, Akira Motegi, Takafumi Suda, and Masatoshi Kitagawa	4. 巻 18
2. 論文標題 HDAC3 is required for XPC recruitment and nucleotide excision repair of DNA damage induced by UV irradiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Mol. Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 1367-1378
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1541-7786.MCR-20-0214	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 Akira Motegi, Mitsuko Masutani, Ken-ichi Yoshioka, and Tadashi Bessho	4. 巻 58
2. 論文標題 Aberrations in DNA repair pathways in cancer and therapeutic significances	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Seminars in Cancer Biology	6. 最初と最後の頁 29-46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.semcancer.2019.02.005	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 Ayako L. Mochizuki, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Mihoko Hosokawa, Emiko Moribe, Akira Motegi, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Gen Kondoh, Hitomi Watanabe, Norio Nakatsuji, and Shinichiro Chuma	4. 巻 37 (23)
2. 論文標題 PARI regulates stalled replication fork proessing to maintain genome stability upon replication stress in mice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Mol. Cell. Biol	6. 最初と最後の頁 e00117-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00117-17	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 Hiroyuki Niida, Ryoichi Matsuura, Ryo Horiguchi, Chiharu Uchida, Yuka Nakazawa, Akira Motegi, Koji Nishimoto, Satoshi Sakai, Tatsuya Ohhata, Kyoko Kitagawa, Shinichi Moriwaki, Hideo ishitani, Ayako Ui, Tomoo Ogi, and Masatoshi Kitagawa	4. 巻 8
2. 論文標題 Phosphorylated HB01 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nat. Comm.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/ncomms16102	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3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Hiroyuki Niida, Koji Nishimoto, Akira Motegi, Masatochi Kitagawa
2. 発表標題 HDAC3 induces translocation of XPC from active gene promoters to DNA lesions alter UV irradiation to promote nucleotide excision repair
3. 学会等名 第62回日本影響学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Motegi
2. 発表標題 ユビキチンリガーゼによるDNA損傷トレランスの制御機構
3. 学会等名 日本核酸医薬学会 生物セッション第4回サテライトシンポジウム2019（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ayako L. Mochizuki, Ami Katanaya, Eri Hayashi, Mihoko Hosokawa, Emiko Moribe, Akira Motegi, Masamichi Ishiai, Minoru Takata, Gen Kondoh, Hitomi Watanabe, Norio Nakatsuji, and Shinichiro Chuma
2. 発表標題 PAR1 regulates stalled replication fork processing to maintain genome stability upon replication stress in mice
3. 学会等名 第89回日本遺伝学会大会
4. 発表年 2017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

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
---------	---------