

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K18193

研究課題名（和文）組換え酵素RAD51阻害因子PARIの細胞周期特異的制御機構の解析

研究課題名（英文）Cell cycle specific regulation machinery of anti-recombinase PARI

研究代表者

望月 綾子（MOCHIZUKI, Ayako）

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：80817148

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）：本研究は細胞周期特異的なPARI制御機構を明らかにすることを目的とした。PARI-GFPを安定に発現するU2OS細胞株を樹立し、レーザーによりDNA損傷を導入した際、核内の損傷部位にPARIが集積することを確認した。更にこの細胞に細胞周期インディケーターFucciを発現させ、細胞周期とPARIの発現振動のライブセルイメージングを可能にするシステムを構築した。またIn-Cell analyzerを用いてPARIを細胞周期中に制御する因子のスクリーニングを可能とする系を立ち上げた。今後の解析により細胞周期特異的なゲノム安定性維持機構の制御メカニズムの一端が明らかになると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報をコードするゲノムDNAは生命の維持に重要であるが、生体内では様々な要因により常にDNA損傷を受けており、細胞内にはこの損傷を修復しゲノムを安定に維持するための分子機構がある。本研究では、近年報告が相次ぐ細胞周期依存的ゲノム安定性維持機構の制御について組換え抑制因子PARIに着目して解析するものであり、細胞周期によってDNA損傷に対して異なる修復経路を選択するメカニズムをライブセルイメージングを用いて可視化しようとする新しい研究である。

研究成果の概要（英文）：A gene, named PARI, was previously reported as a anti-recombinase of homologous recombination. In this study we reveal how PARI changes its localization during cell cycle progression. We established U2OS cell line stably expressed GFP tagged PARI. PARI-GFP was accumulated at induced DNA damage site by micro-irradiation. In addition, to visualize cell cycle in live-cell, cell cycle indicator Fucci was introduced to PARI-GFP cell. By using In-cell analyzer and Fucci-PARI-GFP cell, we also developed a screening system for cell cycle dependent regulatory factor of PARI. These techniques could hold the key to understanding the complex mechanism of the maintainance of genomic stability and further investigations would be warranted.

研究分野：DNA修復

キーワード：細胞周期 DNA修復 DNA複製

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は生命活動の基盤であり生体にとって非常に重要なものである一方、様々な要因により常に損傷を受けている。細胞には DNA 損傷からゲノム DNA を保護し、安定に維持するための細胞周期チェックポイントや DNA 修復機構、DNA 複製機構が緊密に連携したゲノム安定性維持機構が存在する。ゲノム安定性維持機構が破綻すると染色体は不安定となり、がんや遺伝病の原因になると考えられており、ゲノム安定性維持機構の解明は生命活動維持やがん抑制機構の理解に重要である。

最も深刻な DNA 損傷である二重鎖切断の修復には相同組換え(HR)と非同末端結合(NHEJ)の2つの経路が競合している。HR は細胞周期 G1 期で阻害されているが、S/G2 期では HR と NHEJ の両方が活性化しており、細胞周期を通じて2つの修復経路が一部オーバーラップしてゲノムを安定に保っていると考えられている。つまり、ゲノム安定性維持機構は細胞周期依存的な制御を受けている。

脊椎動物に保存されている PARI は酵母の Srs2、大腸菌の UvrD ヘリケースファミリータンパク質である。Srs2 は非常によく研究され、ゲノム安定性維持の分子メカニズムと多くの関連因子が明らかとなっているが、哺乳類にも存在するであろう同様の経路については理解が遅れている。そして PARI は膀胱癌細胞で異所性高発現が見られる遺伝子として近年同定された分子であり、未知の部分が多くある。Pari の機能としては、DNA 複製ストレス応答や相同組換えの抑制に機能することが報告されていた。しかしこれらは主に細胞周期 S 期に見られる現象であり、他の周期における機能は明らかになっていない。これまでに申請者は PARI が細胞周期特異的制御や細胞がどの細胞周期に存在するかによって異なる機能を持つ事を示唆する結果を得ていたが、PARI の細胞周期特異的制御機構については過去に報告がなかった。

2. 研究の目的

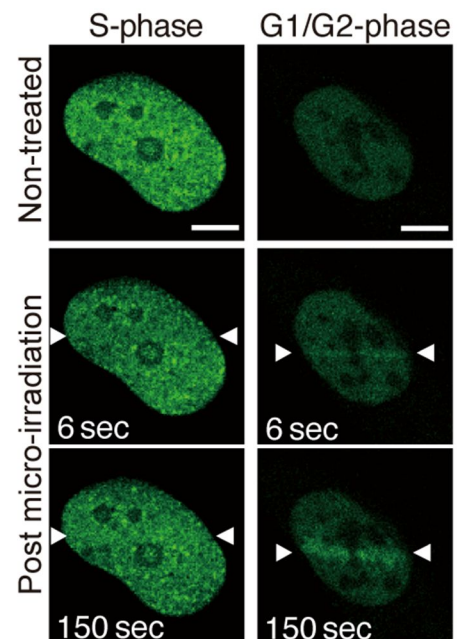
これまでに PARI は S 期の複製ストレス応答に機能を持つことが報告されているが、DNA 損傷部位に PARI の蓄積が認められる G1 期における機能や、その細胞周期特異的制御については明らかになっていない。細胞周期特異的制御を受けていると考えられるゲノム安定性維持機構において、PARI はどのような機能を持つのか。これを解明することは細胞周期が進行する中で生物のゲノムがどのように安定性を保っているのかを理解するために非常に重要である。本研究は、申請者がこれまでに独自に行った PARI 研究における知見をもとに、それを更に発展させ、これまでに未解明である PARI の細胞周期特異的制御の分子機構について明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

申請者は一過性過剰発現させた PARI-GFP は細胞周期 S 期には複製複合体と共同在し、G1/G2 期においてレーザー照射により DNA 損傷を導入すると PARI は即座に損傷部位に集積する事を確認していた(右図; 左は S 期の GFP-PARI の核内局在、右は G1/G2 期。どちらもレーザー照射前と照射後 6 秒と 150 秒後を示す)。しかし、PARI ノックアウト細胞が二重鎖切断に対して感受性を示す報告はなく、集積した PARI の機能については明らかにされていない。そこで PARI が G1 期のみで DNA 損傷部位に集積するための仮説として(1)G1 期特異的に PARI 単独で損傷部位に結合する、もしくは損傷により修飾を受けた PARI 以外の分子にリクルートされる、(2)PARI 自身が G1 期の二重鎖切断特異的な修飾を受け、S 期とは異なる分子との結合する、2つが考えられた。

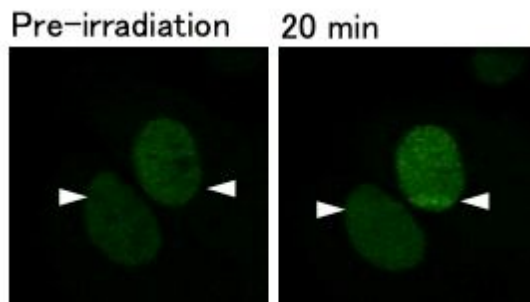
これらについて検証するため、まず、ゲノム編集技術を用いて PARI-mClover ノックイン細胞株を樹立する。その細胞の細胞周期を G1 期に同調した後、X 線を照射し、PARI の免疫沈降及びマススペクトロメトリーによる解析を行うことによって会合因子を探索・同定する。並行して、PARI の G1 期 X 線照射後の損傷部位集積をリードアウトに、siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングでも PARI の制御因子を探索する。さらに PARI ノックアウト細胞を用いて細胞周期ごとに NHEJ、HR の頻度について I-SceI 蛍光レポーターコンストラクトを用いて検討する。

PARI 自身の修飾については、PARI は SUMO 化が示唆される部位を一箇所持つ他、二重鎖切断応答での機能が知られている ATM または DNA-PK によるリン酸化予測部位を探索したところ、PARI の 579 アミノ酸中 6 箇所が候補として得られた。リン酸化及び SUMO 化を受けない変異を導入し損傷部位への集積に影響があるか評価する。

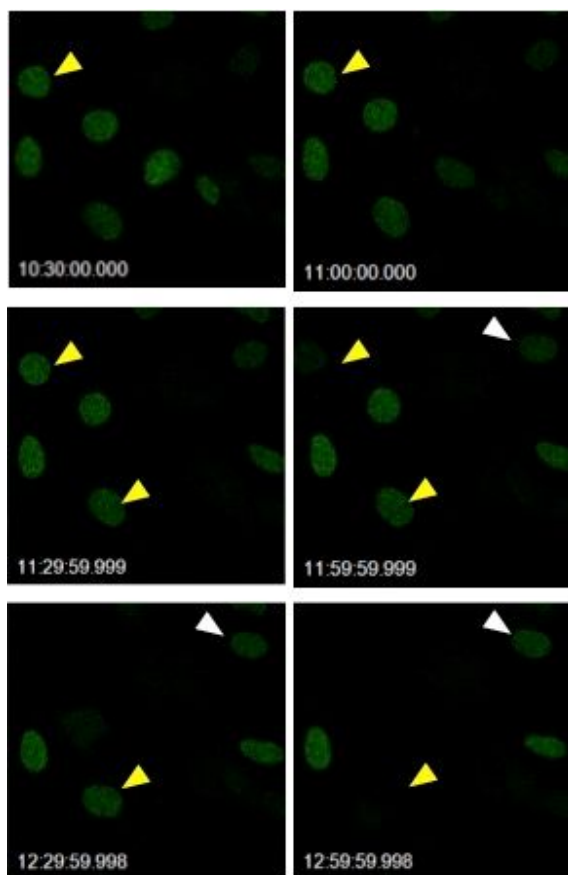


4. 研究成果

細胞周期と PARI 集積の関係について明らかにするため、ゲノム編集技術を用い U2OS 細胞に対して PARI の下流に蛍光蛋白質 mClover を挿入し内因性 PARI の発現パターンの観察を試みたが、蛍光顕微鏡下で PARI のシグナルは認められなかった。原因として PARI の細胞内での発現が弱いこと、もしくは細胞周期により強弱があり見ている細胞の細胞周期が適切でない可能性が考えられた。そこでレンチウイルスを用いて PARI-GFP を発現する細胞株を樹立した。この細胞からは蛍光顕微鏡で PARI-GFP の弱い発現を検出することができた。またレーザー照射により DNA 損傷を誘導すると一過性発現させたマウス PARI と同様に、核内の損傷部位に PARI-GFP が迅速に集積することが観察された(右図;白矢頭はスリットからレーザーを照射した部位を示す。右が照射前、左が照射後の PARI-GFP の蛍光)。



そして PARI-GFP 発現 U2OS 細胞について共焦点顕微鏡を用いたライブセルイメージングを行うと、時間経過と共に PARI-GFP の点滅、つまり細胞周期進行する中で PARI 発現に増減があることが認められた(下図;30分毎に撮影したライブセルイメージング写真。黄色矢頭は消失する PARI、白矢頭は出現する PARI を示している)。この細胞周期進行に伴う発現変化についてウエスタンブロッティング法を用いて明らかにするため、血清飢餓条件下で細胞を 18 時間培養し、G1/G0 期に同調した後、通常培地に戻し 2 時間毎に 20 時間サンプリングしたが、PARI-GFP の増減はウエスタンブロットでは確認できなかった。今後はダブルチミジンプロックなど他の細胞周期同調方法を検討すると共に、免疫沈降法を用いて PARI-GFP の濃縮して細胞周期進行に伴う発現量変化の検出を目指す。この細胞に更に G1 期に BFP、S/G2/M 期に mCherry を発現する細胞周期インジケータ Fucci を導入した PARI-GFP Fucci 細胞株を樹立した。現在、細胞周期同調とレーザーによる DNA 損傷導入を組み合わせたライブセルイメージング解析を行っている。また、PARI の DNA 損傷部位への PARI 集積に関わる会合因子および細胞周期特異的発現制御因子を同定するため、siRNA ライブラリーから既知の DNA 損傷応答因子、細胞周期に関連する転写因子を中心に網羅的探索を行い、PARI の共同分子を明らかにしようとしており、GFP-PARI のシグナルをリードアウトに設定しイメージングサイトメーター InCell アナライザーを用いたスクリーニング系を構築した。同時に細胞周期同調した細胞集団から PARI の免疫沈降・マスマスペクメトリー解析も行う予定である。本研究で得られた成果は今後 PARI の細胞周期特異的制御の詳細な解明を進めていく上で重要な手がかりとなり得るもので、研究を更に推進していくために必要な材料およびデータ取得システムを構築できた。これによって近年国内外で報告の相次いでいる細胞周期特異的 DNA 修復経路の選択制御の新しいメカニズムを明らかにすることができる。特定の癌の増殖制御や染色体不安定性に関連する PARI の研究を行なっているグループは複数あるが、本研究では細胞周期と PARI の関係にフォーカスして分子メカニズムを明らかにしようとしており、これは生命が増殖する細胞の中でゲノムをどのように安定に維持するかを理解するために非常に重要である。また癌抑制の観点からも意義のある研究であると言える。今後は本研究で得られたデータを足がかりに細胞周期進行における PARI の詳細な分子メカニズムの解明を行い、更に構築したシステムを用いて PARI の共同因子の同定を進めていく。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

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, Shinichiro Chuma
2. 発表標題 PAR1 regulates both replication stress response and DNA damage response to maintain genome stability in mice.
3. 学会等名 International Congress of Radiation Research 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 望月綾子 高田稔	4. 発行年 2020年
2. 出版社 医歯薬出版	5. 総ページ数 70
3. 書名 医学のあゆみ「ファンコニ貧血の原因遺伝子群とクロスリンク修復経路：最近の研究展開」	

〔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
研究協力者	安倍 昌子 (ABE MASAKO)		