

令和 5 年 5 月 30 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06613

研究課題名(和文) DNA損傷応答クランプ9-1-1の装着から脱装着までの反応ネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of reaction network from the loading to unloading of the DNA damage checkpoint clamp 9-1-1 onto DNA

研究代表者

大橋 英治 (Ohashi, Eiji)

九州大学・理学研究院・講師

研究者番号：90378951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷チェックポイントクランプ9-1-1(Rad9-Hus1-Rad1)はDNA損傷時に多面的に働く。本研究では、最も重篤なDNA損傷、二本鎖DNA切断(DSB)時の9-1-1の役割を解析した。9-1-1は、別の多機能因子Mre11-Rad50-Nbs1(MRN)と重複して、損傷に応答したシグナル伝達経路を活性化することや、相同鎖を利用したDNA修復の初期過程である削り込み反応を促進すること、またそれらの反応の鍵となる因子と分子機構を明らかにした。本研究は、9-1-1及びMRNが損傷応答活性化と削り込み反応を同時に行うしくみや、削り込みに伴う損傷応答経路遷移のしくみの理解に貢献した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々は現在、抗がん剤や農薬、環境汚染物質などDNA損傷を生じるような様々な化学物質に晒されている。また近年CRISPR-Casシステムなどを用いたゲノム編集が盛んに行われており、効率よくゲノム編集するために二重鎖切断が用いられている。このように、さまざまなDNA損傷や、二重鎖切断後に細胞内で起こる反応を正確に知ることは非常に重要である。これまで、損傷後のチェックポイント応答や、二重鎖切断後の反応は、別々に解析されることがほとんどであったが、本研究ではこれらを同時に調べる系が確立できた。また、それらの両反応に2つの多機能複合体が重複して機能することを示すことができた点は大変意義深い。

研究成果の概要(英文)：The DNA damage checkpoint clamp 9-1-1 (Rad9-Hus1-Rad1) participates in multiple aspects in response to DNA damage. In this study, we analyzed the roles of 9-1-1 upon the most severe DNA damage, double-stranded DNA breaks (DSBs), and found that 9-1-1 and another multifunctional complex, Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN), redundantly activate the DNA damage signaling pathway that recognizes single-stranded (ss) DNA exposure. They also redundantly promote DSB end resection, an initial stage of homology-directed DNA repair. We further clarified the key factors and molecular mechanisms that activate the signaling pathway and facilitate the end-resection in response to DSBs. This study contributes to understanding of the mechanism how 9-1-1 and MRN complexes simultaneously activate the signaling pathway and stimulate the end-resection, and the mechanism of switching from the pathway that recognizes DSBs to the one that recognizes ssDNA exposure as resection proceeds.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷 チェックポイント DNA修復 シグナル伝達

### 1. 研究開始当初の背景

ゲノムの恒常性は、正確な DNA 複製や DNA 損傷修復など様々な反応経路が巧妙に機能することにより維持される。これらの反応に、クランプ・クランプローダー系が重要な役割を果たす<sup>1</sup>。複製クランプ PCNA は、リング状のホモ三量体で、RFC1-RFC5 で構成される RFC クランプローダー複合体によって DNA を囲む形で DNA に装着 (ロード) される (図 1)。PCNA は様々な因子と結合して機能する多機能なクランプで、例えば DNA 複製時には DNA ポリメラーゼの足場として、また DNA が損傷を受けた場合には様々な DNA 修復タンパク質の足場として働く。DNA 損傷応答クランプ 9-1-1 は Rad9、Hus1、Rad1 からなるヘテロ三量体で、PCNA と類似したリング状の複合体を形成する。9-1-1 は、RFC の RFC1 が Rad17 に置き換わった Rad17-RFC クランプローダーによって DNA 上にロードされ、DNA 損傷チェックポイントの活性化因子 TopBP1 と結合して主要なキナーゼ、ATR を活性化する。また、9-1-1 は DNA ポリメラーゼやヌクレアーゼ、DNA 組換えに関わる因子などと結合して、損傷乗り越え DNA 合成や塩基除去修復、二重鎖切断 (DSB) 修復などにも関与することが報告されている。しかし、PCNA が DNA を囲む形でロードされ、様々な因子と結合して、DNA 複製や DNA 修復に機能することが *in vivo*、*in vitro* の両面から明確に示されているのに対し、9-1-1 の場合は、Rad17-RFC による DNA 装着と、その後の反応が別々の反応系で解析されてきたために、9-1-1 が DNA 上に装着された形で機能することを示す生化学的な証拠は非常に限られていた。そこで、9-1-1 が DNA 上に装着された形で機能する反応を解析する系の構築が課題となっていた。

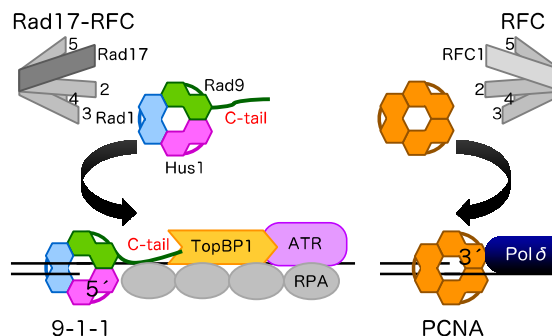


図 1. 9-1-1 と PCNA  
DNA 損傷チェックポイントクランプ 9-1-1 と複製クランプ PCNA は互いに類似したリング状の三量体で、専用のローダー (それぞれ Rad17-RFC、RFC) によって DNA 上にロードされる。9-1-1 は DNA 損傷チェックポイント、DNA 修復に関与するのに対し、PCNA は DNA 複製、DNA 修復に関与する。

### 2. 研究の目的

9-1-1 は、PCNA に似たリング状の三量体を形成するが、PCNA と異なる特徴も持つ。9-1-1 の構成因子の一つ、Rad9 の C 末端にはリング形成に関与せずリングから突出した C-tail と呼ばれる天然変性領域が存在する。C-tail は、TopBP1 と結合する部位を含み、この結合を通じて主要な DNA 損傷チェックポイントキナーゼである ATR の活性化に貢献する。一方、9-1-1 と結合する DNA 修復関連タンパク質のいくつかは 9-1-1 のリング側で結合することが報告されている。さらに、我々の研究から C-tail が疎水性アミノ酸を利用して自身のリング部分に分子内結合 (fold) して、9-1-1 の DNA 結合能を抑制すること、また TopBP1 が C-tail に結合すると C-tail はリングから解離 (unfold) することが明らかになっている<sup>2</sup>。これらの知見から、9-1-1 は DNA 上にロードされると、C-tail 側で TopBP1 などと結合してチェックポイントを活性化する一方で、リング側では PCNA と同様に DNA 修復因子と結合して DNA 修復を促進すると予想された。

申請時点では、9-1-1 の DNA ローディングから DNA 修復促進反応については、個別に生化学的な解析結果が報告されていたが、それらを統合して 9-1-1 が DNA 上にロードされてから起こる反応を解析した例はほとんど知られていなかった。したがって、実際にローディングされた 9-1-1 といつ、どのような因子が 9-1-1 のどの部分と結合して反応を行うかは未解明であった。本研究では、9-1-1 が DNA 上にローディングされてから除去されるまでに起こる過程の生化学的なメカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究を進める過程で、二重鎖切断 (DSB) に着目した。DSB が起こると、まず MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) 複合体が末端の削り込みを開始する<sup>3</sup>。続いて Dna2 と Exo1 の 2 種類のヌクレアーゼが一本鎖を拡大する方向に継続的に削り込みを行う。こうして生じた一本鎖 DNA 領域は相同鎖を利用した修復に利用されるとともに、ATR 活性化の足場となる。このように、DSB は 9-1-1 が DNA 上で行う反応である削り込みの促進と ATR 活性化の両方を調べるのに適すると考えた。

### 3. 研究の方法

#### (1) ツメガエル NPE を用いた ATR 活性化反応と削り込み反応の再現

アフリカツメガエル卵核質抽出液 (NPE) は、卵粗抽出液に精子核 DNA を加えて核を形成させ、その核質成分を回収したものである。これに DNA を加えるとそれに応じた種々の核内反応を再現できる。損傷 DNA を模倣した DNA として、一本鎖環状 DNA にオリゴマーをアニールさせた DNA や、線状二本鎖 DNA を用いた。前者は複製阻害時、後者は二重鎖切断 (DSB) 時の DNA を想定し

た。また、DSB 後、削り込みが進行した状態を模倣するために、3' 末端に数百ヌクレオチドを付加した DNA 基質も作成した。これらを NPE に加えて経時的に回収し、ATR 活性化の指標として下流の Chk1 のリン酸化を調べた。また、特に線状 DNA を用いた場合には、回収した抽出液から DNA をさらに抽出し、一本鎖部分を消化し、二断片化して、両末端からの削り込みの進行を調べた。必要に応じて抗体を用いて着目するタンパク質（複合体）を除去したり、精製タンパク質を加え戻したりしてその機能を調べた。

#### (2) 二重鎖切断 DNA に結合するタンパク質の解析

上記の(1)と同様に NPE を用いて DNA pull-down を行なった。まず、pull-down assay に利用する DNA を準備した。片側からの削り込みは起こらないようにするため、ヘアピン構造にし、定量的な解析を行うために *lacO* 配列を挿入し、ヘアピン部分にはビオチンを付加してストレプトアビジンビーズによる pull-down を可能にした。この DNA と NPE および精製した LacI とを混合した後、経時的に DNA pull-down を行い、この DNA に結合するタンパク質を解析した。

#### (3) 9-1-1 と結合因子の共結晶構造解析

静岡県立大学の橋本博教授のグループとの共同研究により、9-1-1 のリング部分と結合する因子の結合様式を解析した。Rad9 C-tail を除いた 9-1-1 を精製し、これに結合するペプチドとの共結晶を得て、X 線構造解析を行なった。

### 4. 研究成果

#### (1) 複製阻害時と二重鎖切断 (DSB) 時とで ATR 活性化に対する 9-1-1 の要求性が異なる

9-1-1 複合体は、これまで DNA 損傷時、複製阻害時に ATR を活性化すること、DSB 時にはさらに DSB 末端の削り込みを促進することが報告されていた。しかし、例えば複製阻害時と DSB 時の ATR 活性化における 9-1-1 の要求性を比較して調べられたことはほとんどなかった。そこでまず、それぞれの状態を模倣した DNA として一本鎖環状 DNA にオリゴマーをアニールさせた DNA および線状二本鎖 DNA を NPE に加え、ATR 活性化を調べた。どちらを NPE に加えた場合にも ATR が活性化され、下流の Chk1 のリン酸化が認められた (図 2)。Rad9 抗体を用いて NPE 中の 9-1-1 を除去すると、複製阻害を模倣した DNA に応答した Chk1 のリン酸化はほぼ消失したのに対し、DSB を模倣した DNA を用いた場合にはあまり減弱しなかった。DSB 後には 9-1-1 が機能する経路以外にも、ATR を活性化する経路が存在すると考えた。

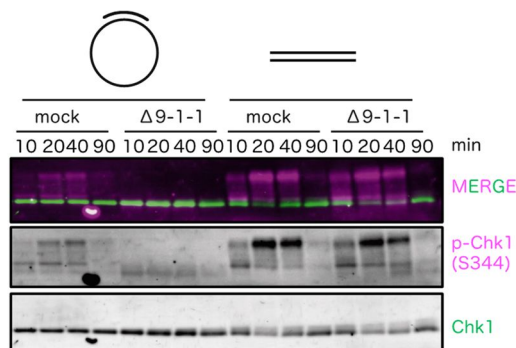


図 2. NPE と DNA 基質による ATR 活性化  
複製阻害 (左)、二本鎖 DNA 切断 (右) を想定した基質 DNA を用意した。どちらの DNA を NPE に加えても ATR が活性化され、Chk1 のリン酸化 (p-Chk1) が見られた。二本鎖切断を想定した DNA の場合は、9-1-1 を除去しても Chk1 のリン酸化にはほとんど影響しなかった。

#### (2) 9-1-1 と MRN は重複して ATR 活性化と DSB 末端削り込みを促進する

DSB 時に削り込み開始に働く MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) も ATR 活性化に働く<sup>4-6</sup>。そこで、次にこの経路との関連を調べた。MRN を除去すると DSB 後の削り込みが起きず、ATR 活性化が検出できないため、あらかじめ DSB 末端が削り込まれた状態を模倣した DNA を用いた。この DNA 添加でも ATR が活性化された (図 3)。この時、Chk1 のリン酸化は 9-1-1 と MRN のどちらにも部分的に依存していたが、両者を免疫除去するとほとんど検出されなくなった。この時の DNA の状態を調べたところ、9-1-1、MRN のそれぞれ単独で除去した場合には mock 同様に削り込みが進行したが、両者を除去した場合にはほとんど進行しなくなった (図 4)。これらより、9-1-1 と MRN は重複して ATR 活性化と DSB 末端の削り込みを促進することが分かった。9-1-1 も削り込みを促進したため、その促進がリング部分のみでも可能か調べた。その結果、部分的ではあるが C-tail を欠いた 9-1-1 でも削り込みの促進が起こることが分かった。以上より 9-1-1 は

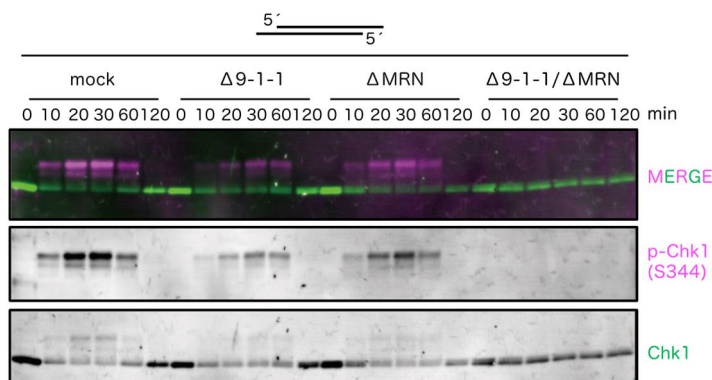


図 3. 9-1-1 と MRN による ATR の活性化  
DSB 後に削り込みが進行した状態を想定した基質 DNA を NPE に加えた。9-1-1 と MRN のどちらか一方を除去した場合には Chk1 のリン酸化 (p-Chk1) は若干減少する程度であったが、両方を除去した場合にはほとんど見られなくなった。



Rad9 の C-tail で TopBP1 を介した ATR 活性化を行う一方でリング部分では削り込みの促進をすることが明らかになった。

(3) 9-1-1 と MRN は TopBP1 (および ATR) の DNA 局在を通して ATR を活性化する

DSB に応じて 9-1-1 と MRN が重複して ATR を活性化することが分かったが、このしくみに迫るために DSB を持つ DNA を用いて DNA pull-down を行なった (図 5)。9-1-1、MRN、TopBP1 や ATR などのチェックポイント関連因子、Dna2 や Exo1 などの継続的な削り込みに働く因子がこの DNA に結合することが分かった。9-1-1 と MRN の単独の除去では TopBP1 や ATR の DNA 結合に影響はほとんどなかったが、9-1-1 と MRN の両方を除去した場合には TopBP1 や ATR の DNA 結合が激減した。また、MRN の除去により Dna2 の DNA 結合が明らかに減少したが、9-1-1 の除去は Dna2 や Exo1 の DNA 結合にはあまり影響しなかった。(2)、(3)の結果から、9-1-1 と MRN は TopBP1 (および ATR) を DNA 上に呼び込む、あるいは繋ぎ止めることで ATR の活性化に寄与していると考えられた。面白いことに、TopBP1 の除去でも ATR や 9-1-1 の DNA 結合が損なわれ、TopBP1 がシグナル増幅の中心的な役割を担うことが示唆された。また、MRN は Dna2 を DNA 上に呼び込むことで、9-1-1 はおそらく呼び込まれた Dna2 や Exo1 の活性を促進することで、末端削り込みに寄与すると考えられた(以上、投稿準備中)。

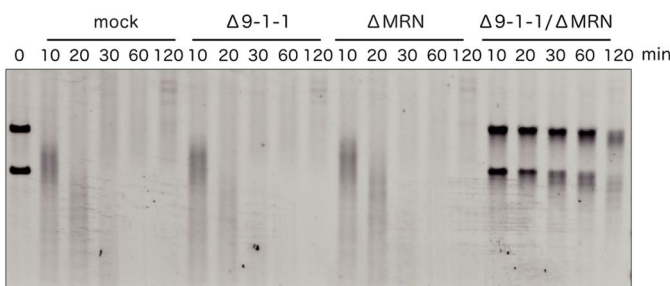


図 4. 9-1-1 と MRN による末端削り込み促進  
図 3 と同じ基質 DNA を NPE に加えた。一本鎖部分を消化した後、二断片化したものを泳動した。9-1-1 と MRN のどちらか一方を除去した場合には削り込み進行にほぼ影響しなかったが、両方を除去した場合にはほとんど進行しなくなった。

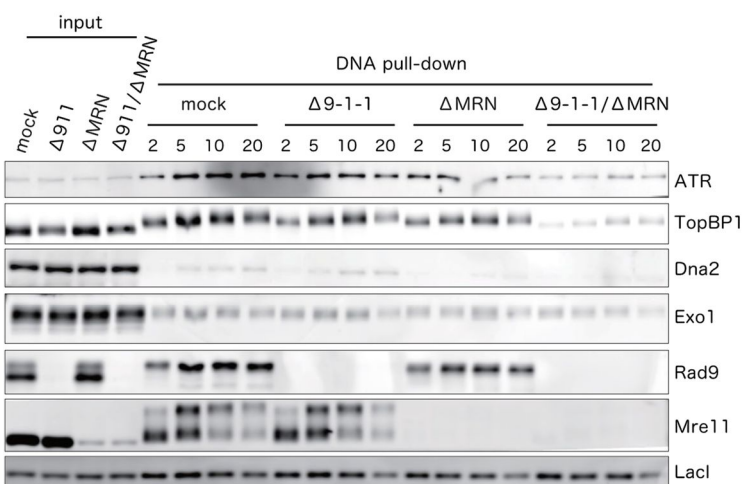


図 5. 削り込み進行後を想定した DNA に結合する因子の挙動  
削り込みが進行した状態を想定した pull-down 用の DNA を NPE に加えた。9-1-1 と MRN の両方を除去すると TopBP1 や ATR の DNA 結合が減少した。また、Dna2 の DNA 結合は MRN 除去により減少した。

(4) Rad1 には複数の 9-1-1 結合因子が結合する

9-1-1 と結合する因子の一つとして RHINO と呼ばれるチェックポイント因子が知られている。RHINO は 9-1-1 と TopBP1 の両方に結合して ATR 活性化を促進する因子であり、Rad9 と Rad1 に結合することが知られていた。共同研究により、9-1-1 と RHINO の部分ペプチドが結合した構造を明らかにした。RHINO は Rad1 に結合し、PCNA への結合で使われる面とは異なる面に相当する側で結合した<sup>7</sup>。興味深いことに 9-1-1 ローダーである Rad17-RFC の Rad17 にも RHINO の 9-1-1 結合部に存在する配列と類似の配列が見つかった。同様に構造解析を行なったところ、Rad17 もやはり RHINO と同じく Rad1 の同じ場所に結合した<sup>8</sup>。

以上より、9-1-1 は C-tail で TopBP1 と結合し、リング側でも Rad17 や RHINO などと結合して ATR 活性化に関与すること、またリング側で DSB 末端の削り込みを促進することが明らかになった。また、DSB 直後には MRN を介して ATM と呼ばれる ATR に類似したキナーゼが活性化されるが、末端の削り込みの進行とともに、一本鎖 DNA が露出し、DSB を認識する ATM 経路から ssDNA を認識する ATR 経路へと遷移する過程に MRN と 9-1-1 の両複合体が重複して機能することが明らかになった。本研究は、9-1-1 が DNA 上で行う反応に関する理解、DSB 後の ATM 経路から ATR 経路への経路遷移に関する理解に貢献した。

#### < 引用文献 >

- (1) Ohashi E, Tsurimoto T: Functions of multiple clamp and clamp-loader complexes in eukaryotic DNA replication. *Adv. Exp. Med. Biol.* (2017) 1042: 135-162.
- (2) Takeishi Y, Iwaya-Omi R, Ohashi E, Tsurimoto T: Intramolecular binding of the Rad9 C terminus in the checkpoint clamp Rad9-Hus1-Rad1 is closely linked with its DNA binding. *J. Biol. Chem.* (2015) 290: 19923-19932.

- (3) Cejka P, Symington LS: DNA End Resection: Mechanism and Control. *Annu. Rev. Genet.* (2021) 55: 285-307.
- (4) Yoo HY, Kumagai A, Shevchenko A, Shevchenko A, Dunphy WG: The Mre11-Rad50-Nbs1 complex mediates activation of TopBP1 by ATM. *Mol. Biol. Cell.* (2009) 20: 2351-2360.
- (5) Duursma AM, Driscoll R, Elias JE, Cimprich KA: A role for the MRN complex in ATR activation via TOPBP1 recruitment. *Mol. Cell.* (2013) 50: 116-122.
- (6) Shiotani B, Nguyen HD, Håkansson P, Maréchal A, Tse A, Tahara H, Zou L: Two distinct modes of ATR activation orchestrated by Rad17 and Nbs1. *Cell Rep.* (2013) 3: 1651-1662.
- (7) Hara K, Iida N, Tamafune R, Ohashi E, Sakurai H, Ishikawa Y, Hishiki A, Hashimoto H: Structure of the RAD9-RAD1-HUS1 checkpoint clamp bound to RHINO sheds light on the other side of the DNA clamp. *J. Biol. Chem.* (2020) 295: 899-904.
- (8) Hara K, Hishiki A, Hoshino T, Nagata K, Iida N, Sawada Y, Ohashi E, Hashimoto H: The 9-1-1 DNA clamp subunit RAD1 forms specific interactions with clamp loader RAD17, revealing functional implications for binding-protein RHINO. *J. Biol. Chem.* (2023) 299:103061.

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 3件）

1. 著者名 Kodai Hara, Asami Hishiki, Takako Hoshino, Kiho Nagata, Nao Iida, Yukimasa Sawada, Eiji Ohashi, Hiroshi Hashimoto	4. 巻 299
2. 論文標題 The 9-1-1 DNA clamp subunit RAD1 forms specific interactions with clamp loader RAD17, revealing functional implications for binding-protein RHINO	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J. Biol. Chem	6. 最初と最後の頁 103061
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2023.103061	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 Kodai Hara, Nao Iida, Ryota Tamafune, Eiji Ohashi, Hitomi Sakurai, Yoshinobu Ishikawa, Asami Hishiki, Hiroshi Hashimoto	4. 巻 295
2. 論文標題 Structure of the RAD9-RAD1-HUS1 checkpoint clamp bound to RHINO sheds light on the other side of the DNA clamp	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 899 ~ 904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.AC119.011816	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 Hironori Kawakami, Ryuya Muraoka, Eiji Ohashi, Kenta Kawabata, Shota Kanamoto, Takeaki Chichibu, Toshiaki Tsurimoto, Tsutomu Katayama	4. 巻 24
2. 論文標題 Specific basic patch dependent multimerization of Saccharomyces cerevisiae ORC on single stranded DNA promotes ATP hydrolysis.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 608 ~ 618
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12710	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 達川絢介, 高橋達郎, 大橋英治
2. 発表標題 9-1-1とMRNはDNA二重鎖切断のシグナリングと削り込みに重複した機能を持つ
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 達川絢介、高橋達郎、大橋英治
2. 発表標題 DNA二重鎖切断後の削り込みとチェックポイント活性化の連携機構
3. 学会等名 第26回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 達川絢介、橋本博、高橋達郎、大橋英治
2. 発表標題 DNA損傷チェックポイントクランプ9-1-1のリング部分の役割
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 達川絢介、高橋達郎、大橋英治
2. 発表標題 9-1-1とMRNは独立した経路でDNA二重鎖切断末端の削り込みを促進する
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 達川絢介、高橋達郎、大橋英治
2. 発表標題 9-1-1とMRNは独立した経路で DNA二重鎖切断末端の削り込みを促進する
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・ 第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 達川 絢介、橋本 博、釣本 敏樹、高橋 達郎、大橋 英治
2. 発表標題 DNA損傷チェックポイントクランプ9-1-1によるATR活性化機構
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 2021年

1. 発表者名 達川 絢介、釣本 敏樹、高橋 達郎、大橋 英治
2. 発表標題 チェックポイントセンサー9-1-1とMRNによる二重鎖切断後の損傷応答制御
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔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