様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費
KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　３ 年　 ６ 月 １６ 日現在

機関番号：２２７０１
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：１９Ｋ１６１０６

研究課題名（和文）ヒト細胞におけるマイナーな組換え修復機構の解析：メカニズムと生理的意義

研究課題名（英文）Analysis of minor DNA repair pathways in human cells

研究代表者
斎藤　慎太（Saito, Shinta）

横浜市立大学・理学部・助教

研究者番号：６０８３７８９７

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）：最も危険なDNA損傷である二本鎖DNA切断は、ヒト細胞では非相同末端連結、または相同組換えによって効率良く修復されるが、これら2つの修復機構とは異なるマイナーな組換え修復経路として代替的末端連結と一本鎖アニーリングが存在している。この2つのマイナー経路の意義や分子機構の詳細は不明であるが、がんや遺伝病との関連が報告されている。本研究では、ヒト培養細胞を用いて代替的末端連結の必須因子であるDNAポリメラーゼθに関する機能解析を行うとともに、Alu配列の間で起こる組換えに関する遺伝学的解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究では、DNAポリメラーゼθに関する種々の機能解析に加え、Alu-Alu組換えに関する遺伝学的解析を行うことにより、マイナーな二本鎖DNA切断修復のメカニズムと生理的意義の一端を明らかにした。本研究の成果は、ゲノム安定性維持機構の具体像やがん化との関連についての正確な理解に役立つだけでなく、放射線や抗がん剤を用いたがん治療、さらにはゲノム編集の分野にも重要な示唆を与えることが期待される。

研究成果の概要（英文）：DNA double-strand breaks are efficiently repaired by non-homologous end-joining or homologous recombination. In addition to these pathways, there are two minor pathways: alternative end-joining and single-strand annealing whose molecular mechanisms remain elusive. In this research project, we have performed functional analysis of DNA polymerase θ, which is an essential factor for alternative end-joining, and genetic analysis of the Alu-Alu recombination. Our study will help to understand the mechanism of maintaining genome stability.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA修復　非相同組換え　二本鎖切断　Alu

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９（共通）

１．研究開始当初の背景

細胞のゲノム DNA は、さまざまな内的・外的要因により絶えず損傷を受けている。最も危険な DNA 損傷である二本鎖 DNA 切断（以下、DSB）は、通常、非相同末端連結（non-homologous end joining; 以下「NHEJ」）または相同組換え（homologous recombination; 以下「HR」）によって効率良く修復されるが、これら 2 つの主要経路とは異なる修復機構も存在する。この一つが alternative end-joining（以下「alt-EJ」）、もう一つが一本鎖 DNA アニーリング（single-strand annealing; 以下「SSA」）である。alt-EJ は、マイナーな DSB 修復経路の 1 つであるが、その実体は長きに渡り不明であった。特に、数 bp 程度の短い相同性を必要とする MMEJ (microhomology-mediated end-joining）との関係性についての定義は曖昧であった。しかし、我々は、NHEJ 以外の非相同組換えはすべて MMEJ 型か非 MMEJ 型（連結部位に新しい DNA 配列が挿入されるタイプ）のいずれかに分類されること、また、両者とも DNA ポリメラーゼθ（以下「PolQ」）に依存していることを突きとめた（Nature Commun. 8:16112, 2017)。さらに、NHEJ と PolQ を同時に欠損させるとヒト染色体上での DSB 修復効率が著しく低下し、離れた 2 つの Alu 配列間での組換え（以下「Alu-Alu 組換え」）でしか再連結を行うことができないことを明らかにした。長きに渡り不明であった修復経路のメカニズムの一端を明らかにしたことは DSB 修復機構の全容解明への大きな一歩であったが、これらマイナーな修復経路の制御機構や意義の詳細はいまだ不明であり、未解明の重要な課題が数多く残されている。そこで本研究では、alt-EJ に必要不可欠な PolQ の機能に着目し、このタンパク質の構造機能相関解析を通じて、alt-EJ の分子機構の解明を目指した。さらに、上述の発見をもとに Alu-Alu 組換えの頻度を定量的に調べることができるアッセイ系を構築し、Alu-Alu 組換えのメカニズムの解明を目指した。

２．研究の目的

マイナーな DSB 修復経路である alt-EJ および SSA の分子機構を解析し、これらの修復経路がどのような状況下で実際に修復に携わることができるのか、細胞内で複数の修復経路がどのように使い分けられているのかを明らかにすることを目的とした。

３．研究の方法

上述の研究目的を達成するため、本研究ではヒト培養細胞（Nalm-6 細胞）を用いて PolQ に関する種々の機能解析を行うとともに、Alu-Alu 組換えに関する遺伝学的解析を行った。具体的には、PolQ にユニークなドメインに着目し、構造機能相関解析により、alt-EJ や DSB 修復機構全体における各機能ドメインの役割と意義を調べた。また、Alu-Alu 組換えに関与する因子を同定するため、*LIG4/POLQ* ダブルノックアウト細胞を用いて、種々の候補因子の阻害および遺伝子ノックアウトを行い、関与の有無と程度を調べた。実験に使用したベクターの構築と各種アッセイは以下の通りに行った。

(1) 変異型 POLQ 発現ベクターの構築

ヒト POLQ 発現ベクターは韓国基礎科学研究院（IBS）の高田慶一博士より分与を受けた。このベクターをベースに PCR 法と分子生物学的手法（制限酵素による DNA の切断とリガーゼによる DNA の連結)、および In-Fusion クローニング法を用いて、各ドメインにおいて重要なアミノ酸に変異を導入した変異型 Polθを発現させるためのベクターを構築した。

(2) ランダム挿入頻度の解析

作製した各変異型 *POLQ* 発現ベクター（または野生型 *POLQ* 発現ベクター）とネオマイシン耐性遺伝子をもつベクター(pPGKneo)をエレクトロポレーション法により *LIG4/POLQ* 二重破壊株（ヒト Nalm-6 細胞由来）に共導入した。遺伝子導入を行った細胞を G418 を含むアガロース培地中で 3 週間培養した後、生じたコロニー数を測定し、インテグレーション頻度を算出した。

(3) 染色体内組換え頻度の解析

作製した各変異型 *POLQ* 発現ベクター（または野生型 *POLQ* 発現ベクター）と *HPRT* 遺伝子のコード領域を標的としたガイド RNA を組み込んだ CRISPR/Cas9 発現ベクター（pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9）をエレクトロポレーション法により *LIG4/POLQ* 二重破壊株、または Msh2 の発現を回復させた *LIG4/POLQ* 二重破壊株に共導入した。遺伝子導入した細胞は、増殖培地または各阻害剤（B02（Rad51 阻害剤、終濃度：10 μM）または 6-OH-DL-DOPA（Rad52 阻害剤、終濃度：10 μM)）を含む培地中で 2 日間培養した。細胞を PBS で洗浄した後、増殖培地でさらに 5 日間培養し、6-TG を含むアガロース培地中でコロニー形成させた。3 週間培養した後、生じた 6-TG 耐性クローンからゲノム DNA を抽出し、PCR 解析により Cas9 による切断と alt-EJ または SSA による修復が起こったクローンを同定した。次に、ジャンクション部位を含む PCR 断片を pTAKN2 T-Vector にサブクローニングし、シークエンス解析により修復が起こった後の配列を同

定した。最後に、GENETYX-MAC によりジャンクション配列のアライメントを行い、alt-EJ または SSA による修復の特徴を解析した。Alu 配列の情報は UCSC ゲノムブラウザ(https://genome.ucsc.edu/)より取得し、Alu 同士の相同性比較は BLAST（https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）により行った。

４．研究成果

(1) PolQ にユニークなドメインの生理的意義

① alt-EJ 依存的なランダム挿入反応における各ドメインの重要性

PolQ と Lig4 を同時に欠損したヒト細胞では、導入した外来 DNA が染色体中に全く組み込まれないが、この細胞に PolQ を一過的に発現させることで alt-EJ 依存的なランダム挿入を引き起こすことができる。この表現型を利用することで、PolQ タンパク質の変異による alt-EJ への影響を正確かつ容易に調べることができる。各変異型 *POLQ* 発現ベクターを pPGKneo とともに *LIG4/POLQ* 二重破壊株に導入した際のランダム挿入頻度を調べたところ、ATPase ドメイン、または Polymerase ドメインのどちらに変異を入れた場合もランダム挿入体は出現しなかった。この結果は、alt-EJ 依存的なランダム挿入において、ATPase ドメインと Polymerase ドメインがどちらも必須の機能を果たしていることを示している。

次に、Polymerase ドメイン中に存在する PolQ にユニークな 3 ヶ所の挿入配列の alt-EJ における役割を調べたところ、どの挿入配列を欠損させてもランダム挿入体は出現しなかった。in vitro アッセイの結果から、各挿入配列は損傷乗り越え DNA 合成（TLS）に重要であること、また各挿入配列を欠損させても Polymerase 活性は完全には欠損しないことが報告されている。このことから、alt-EJ において PolQ の TLS 活性が何らかの役割を担っている可能性が示唆される。一方、Rad51 結合ドメインは alt-EJ 依存的なランダム挿入反応に必須ではなかったが、導入するベクター量を減らすとランダム挿入頻度の低下が起こったことから、このドメインの存在が PolQ の活性に影響をおよぼしている可能性がある。核移行シグナル（NLS）配列中に変異をもつ PolQ は細胞質に局在したにも関わらず、ランダム挿入を引き起こすことができることがわかった。この結果は PolQ が核の中にごくわずかに存在していれば、ランダム挿入を引き起こすことができる可能性を示唆している。

② 染色体上の DSB 修復における PolQ の各ドメインの重要性

以上の結果から、alt-EJ 依存的なランダム挿入には、PolQ の ATPase ドメインと Polymerase ドメインのどちらも必須であることが明らかになった。そこで、各ドメインの alt-EJ における役割をより詳細に調べるため、CRISPR/Cas9 により染色体上に DSB を誘発し、その修復効率と修復産物（ジャンクション部位の塩基配列）の解析を行った。PolQ と Lig4 を同時に欠損したヒト細胞では、染色体 DSB の修復効率が著しく低下し、極めて低い頻度で起こる Alu-Alu 組換えでしか DSB 同士の再連結を行えないことがわかっている。この表現型を利用し、各変異型 *POLQ* 発現ベクターと CRISPR/Cas9 発現ベクターを *LIG4/POLQ* 二重破壊株に共導入した際の修復効率を調べた。その結果、野生型 *POLQ* 発現ベクターを導入した際の修復効率は、*LIG4/POLQ* 二重破壊株の 10 倍以上に上昇したが、ATPase ドメイン、または Polymerase ドメインに変異をもつ *POLQ* 発現ベクターを導入した場合には修復効率は上昇しなかった。さらに、ジャンクション部位の特徴を調べたところ、ATPase ドメイン、または Polymerase ドメインに変異をもつ PolQ を発現させた場合には、Alu-Alu 組換えによる修復しか起こっていないことがわかった。このことから、染色体上の DSB を alt-EJ により修復する際にも、ATPase ドメインと Polymerase ドメインはどちらも必須の機能を果たしていることが示唆された。一方、野生型 PolQ を発現させた場合には、alt-EJ の特徴である MMEJ 型の連結や、非 MMEJ 型の連結が Alu-Alu 組換えの 20 倍以上の頻度で起こっていたが、興味深いことに、通常の alt-EJ ではほとんど観察されない 0-1 bp の相同性を伴う連結が全体の約 2 割でみられた。一過性に発現させた PolQ の発現量は内在性 PolQ の発現量よりも約 5 倍高かったことから、PolQ の発現量が alt-EJ のサブ経路の選択に影響をおよぼす可能性が示唆される。

(2) Alu-Alu 組換えのメカニズムの解析

① Alu-Alu 組換え反応の特徴

上述した通り、PolQ と Lig4 を同時に欠損したヒト細胞では Alu-Alu 組換えでしか DSB 同士の再連結を行えないことがわかっている。そこで、*LIG4/POLQ* 二重破壊株のゲノム中に DSB を導入した際に起こる Alu-Alu 組換えの特徴について解析を行ったところ、DSB 近傍に存在する Alu 配列が組換えの基質として利用されやすいこと、また比較的相同性の高い（相同性 80%以上）Alu 配列の間で組換えが起こる頻度が高いことが明らかになった。こうした特徴が普遍的であるかを明らかにするためには、他の遺伝子座における Alu-Alu 組換えにおける特徴や、実際に報告されているさまざまな疾患の原因となった Alu-Alu 組換えの特徴と比較することが今後の課題である。

② Alu-Alu 組換えの制御機構

LIG4/POLQ 二重破壊株のゲノム中に DSB を導入すると、Alu-Alu 組換えの頻度が著しく上昇す

ることから、Alu-Alu 組換えは DSB 修復経路に依存して起こっている可能性が高い。さらに、*LIG4/POLQ* 二重破壊株に PolQ または Lig4 のいずれかを発現させると Alu-Alu 組換えの頻度が著しく低下することから、Alu-Alu 組換えは alt-EJ と NHEJ によって抑制されていることが示唆される。そこで次に、HR の必須因子である Rad51 や SSA に必須と考えられている Rad52 の阻害が Alu-Alu 組換えにおよぼす影響を調べたところ、Rad51 阻害剤で処理した場合には組換え頻度が上昇すること、Rad52 阻害剤で処理した場合には組換え頻度が低下することが明らかになった。さらに、*LIG4/POLQ/RAD52* 三重破壊株を作製し、Alu-Alu 組換え頻度を調べたところ、Rad52 を欠損させると組換え頻度の低下が起こるが、依然として Alu-Alu 組換えが引き起こされることが明らかになった。このことから、Alu-Alu 組換え反応は SSA に依存していることが示唆されたが、SSA には Rad52 非依存的ないくつかのサブ経路が存在する可能性があり、Alu-Alu 組換えの全貌を明らかにするためには SSA のメカニズムの解明が必須の課題である。

最後に、ミスマッチ修復の主要因子である Msh2 の Alu-Alu 組換えへの関与を調べた。酵母では Msh2 が SSA の抑制因子としてはたらくことが古くから知られている。本研究で用いた Nalm-6 細胞は *MSH2* 遺伝子を欠損しているため、正常な *MSH2* 遺伝子をコードするスーパーエクソンを *MSH2* 遺伝子座にノックインすることにより、Msh2 の発現を回復させた *LIG4/POLQ* 二重破壊株を作製した。この細胞株を用いて実験を行ったところ、Alu-Alu 組換えを起こした細胞が全く生じなかった。別の遺伝子座を利用して同様の実験を行ったところ、Alu-Alu 組換えの頻度が 30 倍以上低下することがわかった。以上の結果から、Alu-Alu 組換えは SSA に依存して起こることが強く示唆され、他の DSB 修復経路（alt-EJ と NHEJ、および HR）だけでなく、Msh2 によって強く抑制されることが明らかになった。

以上述べた通り、本研究ではマイナーな DSB 修復経路である alt-EJ および Alu-Alu 組換えの分子機構の一旦を明らかにすることができた。マイナーな修復経路のメカニズムや生理的意義を明らかにすることは、修復機構の全容解明のみならず創薬医療分野への応用に向けても重要な課題であるため、他のヒト細胞株を利用したアッセイや、実際に報告されたがんや疾患における表現型との比較解析が必要と思われる。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計1件（うち査読付論文　0件／うち国際共著　0件／うちオープンアクセス　0件）

１．著者名 斎藤慎太	４．巻 Vol. 87, No. 10
２．論文標題 相同組換え修復	５．発行年 2020年
３．雑誌名 参加と婦人科 分子標的薬を極める-基礎から臨床まで-	６．最初と最後の頁 1138-1144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 ―

〔学会発表〕　計2件（うち招待講演　1件／うち国際学会　0件）

１．発表者名 吉川 真子
２．発表標題 ヒト細胞におけるDNAポリメラーゼθの機能解析
３．学会等名 第42回日本分子生物学会
４．発表年 2019年

１．発表者名 斎藤 慎太
２．発表標題 DNA polymerase θ is essential for alternative end-joining
３．学会等名 日本分子生物学会（招待講演）
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