

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06597

研究課題名(和文)複製因子Ctf4タンパク質が相同組換えによるDNA二本鎖切断修復を抑制する機構

研究課題名(英文) Understanding the mechanisms by which Ctf4 protein suppresses repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination

研究代表者

佐々木 真理子 (Mariko, Sasaki)

国立遺伝学研究所・新分野創造センター・准教授

研究者番号：50722013

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)：本研究課題では、出芽酵母のリボソームRNA遺伝子(rDNA)領域を用いて、DNA複製因子であるCtf4タンパク質がどのようなメカニズムで相同組換えによるDSB修復を抑制するのかを明らかにすることを目的とした。野生型とCtf4タンパク質欠損株においてクロマチン免疫沈降実験を行った結果、Ctf4タンパク質欠損細胞において、DSB部位への結合量が変化する相同組換え因子とDNA複製因子を同定した。また、Ctf4タンパク質とMms22タンパク質との相互作用が、rDNA不安定化を抑制することも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA二本鎖切断は、DNA複製の途中で発生することが多く、その不正確な修復はゲノム不安定化を誘導し、がんなどの様々な疾患を引き起こす原因となる。本研究では、DNA複製阻害時に生じるDNA二本鎖切断修復に關与するCtf4タンパク質の作用機構の一端を明らかにすることができた。CTF4遺伝子はヒト細胞でも保存されている。よって、本研究で得られた知見をもとに、ヒト細胞で起こるDNA二本鎖切断修復機構の解明に向けた研究に発展させることができる。

研究成果の概要(英文)：In this research project, I aimed to elucidate the mechanism by which the DNA replication factor Ctf4 protein suppresses homologous recombination-mediated DSB repair, using the ribosomal RNA gene (rDNA) region of budding yeast. By performing chromatin immunoprecipitation experiments, I identified homologous recombination factors and DNA replication factors whose binding to the DSB sites is altered in Ctf4-deficient cells. Additionally, I found that the interaction between Ctf4 and Mms22 proteins is important for suppressing rDNA instability.

研究分野：ゲノム生物学

キーワード：Ctf4 DNA複製阻害 DNA二本鎖切断 相同組換え ゲノム不安定化

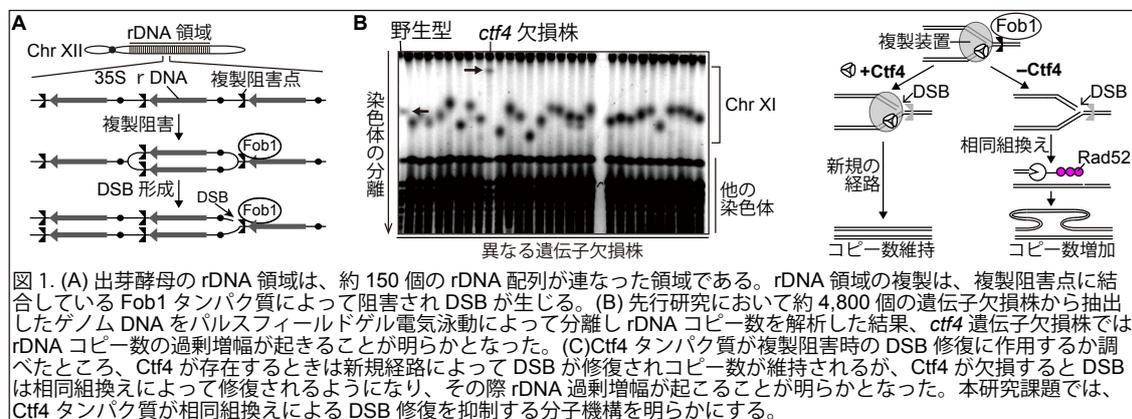
様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を継承するためには、DNA複製によってDNA配列を正確にコピーしなければならない。しかし、DNA上にはDNA損傷、DNA結合タンパク質、転写装置など様々な障害が存在するため、DNA複製装置の進行は頻りに止まる。DNA複製阻害を速やかに解消できないと、DNA二本鎖切断(DNA double-strand break [DSB])が生じる。DSBは誤って修復されると、ゲノム配列の重複、欠失、染色体転座などのゲノム再編成を誘導しゲノムを不安定化し、癌や多くのゲノム疾患を引き起こすことから、DNA複製阻害時のDSB修復機構を理解することは、これらの疾患の発症機構を明らかにする上で重要である。

2. 研究の目的

DNA複製阻害はゲノム上のランダムな場所で起こることが多いため、DNA複製阻害時のDSB修復過程を解析することは困難であった。出芽酵母のリボソームRNA遺伝子(rDNA)領域は、rDNA配列が約150コピー連なった領域である(図1A)。各rDNA配列内には、リボソームRNA転写ユニット、DNA複製開始点、DNA複製阻害点が存在する。DNA複製期になるとDNA複製開始点から両方向にDNA合成が行われるが、35S rDNAと逆方向に進行する複製装置の進行は、複製阻害点に結合しているFob1タンパク質によって阻害され、その結果DSBが生じる(図1A)。そして、このDSBが正確に修復されないと、rDNAコピー数が増減しrDNA領域が不安定化する。



Ctf4タンパク質は、DNA複製装置の構成因子であり、鋳型DNAを解離するDNA複製ヘリケースとラギング鎖合成の開始を担うDNAポリメラーゼ α と結合する。研究代表者は先行研究において、野生型ではDSB修復時に相同組換えに依存しない経路が用いられrDNA安定性を維持した状態でDSBが修復されるのに対して、Ctf4欠損細胞では、相同組換え経路によってDSBが修復され、rDNA配列が過剰に増幅することを見つけた(図1B)。本研究では、以下のことを解析することによって、Ctf4タンパク質がDNA複製阻害時に相同組換えによるDSB修復を抑制する分子機構を明らかにすることを目指した。

研究項目1: Ctf4タンパク質欠損時にDSB部位への結合パターンが変化する因子を同定する

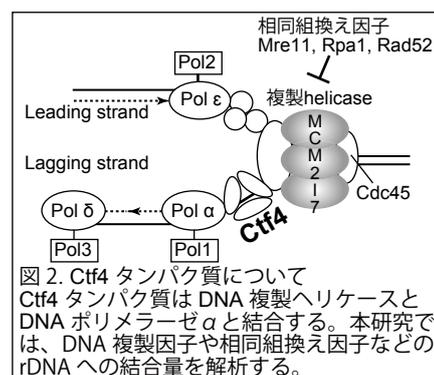
研究項目2: DNA複製因子がDSB修復に与える影響を解析する

研究項目3: Ctf4タンパク質の結合パートナーMms22がDSB修復に与える影響を解析する

3. 研究の方法

研究項目1: Ctf4タンパク質欠損時にDSB部位への結合パターンが変化する因子を同定する

野生型と*ctf4*変異体において、DSB部位に結合する複製因子(Pol1, Pol2, Pol3, Cdc45)や相同組換え因子(Mre11, Rad52, Rpa1)の量をクロマチン免疫沈降法を用いて比較することを目指した(図2)。まず、目的因子にエピトープタグを付加した株を構築した。そして、これらの細胞を細胞周期のG1期に停止し、一斉にS期に導入してからことなる時間に細胞を回収し、クロマチン免疫沈降実験を行い、定量的PCRを行うことによって目的タンパク質の結合量を比較した。



研究項目2: DNA複製因子がDSB修復に与える影響を解析する

DNA複製装置の構成因子は細胞の生存に必須であることから、これらの因子を欠損させること

ができない。そこで、目的タンパク質を速やかに分解することができるオーキシンドグロン法を用いて、複製因子 (Pol1, Pol2, Pol3, Cdc45) を分解させる実験系を確立した。そして、野生型において、これらの複製因子を分解させた条件において DSB 解析を行い、*ctf4* 変異体と同様に DSB が相同組換えによって修復されるようになるかを解析した。

研究項目 3 : Ctf4 タンパク質の結合パートナー Mms22 が DSB 修復に与える影響を解析する

Ctf4 タンパク質は、Rtt101-Mms1 E3 ユビキチンリガーゼ複合体のサブユニットである Mms22 と結合することが知られている。Ctf4 と Mms22 の相互作用の重要性を調べるため、*ctf4* 変異体において *MMS22* 遺伝子を高発現させ、DSB 解析実験を行い、相同組換えによる DSB 修復が抑制されるかを調べた。

4. 研究成果

研究項目 1 : Ctf4 タンパク質欠損時に DSB 部位への結合パターンが変化する因子を同定する

野生型と Ctf4 タンパク質欠損株においてクロマチン免疫沈降実験を行った結果、DNA 複製因子の中から Ctf4 タンパク質欠損細胞において DSB 部位への結合が減少した因子を一つ同定することができた (論文執筆中のため非公開)。また、相同組換え因子の中から、Ctf4 タンパク質欠損細胞において DSB 部位への結合が増強した因子を同定することができた (論文執筆中のため非公開)。今後、これらの因子の結合量の変化が、DSB 修復効率や DSB 修復時の rDNA 不安定化に与える影響について詳細を解析する予定である。

研究項目 2 : DNA 複製因子が DSB 修復に与える影響を解析する

DNA 複製因子を S 期の途中で分解させると、DSB 修復効率などに影響が見られるかを解析したが、大きな影響は見られなかった。研究項目 1 において DSB 結合部位への結合が減少した DNA 複製因子についても、DSB の相同組換えによる修復効率などが変化する傾向は見られなかった。今後は、この因子の減少が、DSB 修復時に rDNA 不安定化を抑制する過程で重要であるかを調べる予定である。

研究項目 3 : Ctf4 タンパク質の結合パートナー Mms22 が DSB 修復に与える影響を解析する

Ctf4 タンパク質の相互作用因子である Mms22 を Ctf4 欠損細胞において高発現させた結果、rDNA 不安定化は抑制されたが、相同組換えによる DSB 修復頻度には影響を及ぼさなかった。よって、Ctf4 と Mms22 の相互作用は、DSB 修復において DSB 修復経路を選択する過程ではなく、相同組換え経路が選択された後に rDNA 増幅を抑制する過程で重要であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 4件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaaki Yokoyama, Mariko Sasaki, Takehiko Kobayashi	4. 巻 42
2. 論文標題 Spt4 promotes cellular senescence by activating non-coding RNA transcription in ribosomal RNA gene clusters	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111944
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022	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 Mariko Sasaki, Takehiko Kobayashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Regulatory processes that maintain or alter ribosomal DNA stability during the repair of programmed DNA double-strand breaks	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Genetic Systems	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） 10.1266/ggs.22-00046	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 Mayuko Goto, Mariko Sasaki, Takehiko Kobayashi	4. 巻 41
2. 論文標題 The S-phase Cyclin Clb5 Promotes rRNA gene (rDNA) Stability by Maintaining Replication Initiation Efficiency in rDNA	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 e00324-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/MCB.00324-20	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 Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi	4. 巻 2153
2. 論文標題 Gel Electrophoresis Analysis of rDNA Instability in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 403-425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/978-1-0716-0644-5_28	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 -

1. 著者名 Masaaki Yokoyama, Mariko Sasaki, and Takehiko Kobayashi	4. 巻 -
2. 論文標題 Spt4 drives cellular senescence by activating non-coding RNA transcription in ribosomal RNA gene clusters	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.04.22.488906	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 -

1. 著者名 Mayuko Goto, Mariko Sasaki, and Takehiko Kobayashi	4. 巻 5
2. 論文標題 The S-phase Cyclin Clb5 Promotes rDNA Stability by Maintaining Replication Initiation Efficiency in rDNA.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MCB.00324-20	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 Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi	4. 巻 2153
2. 論文標題 Gel Electrophoresis Analysis of rDNA Instability in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 403-425
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0644-5_28	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8件(うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐々木 真理子
2. 発表標題 Interplay between transcription and DNA double-strand break repair impacts genome stability upon DNA replication fork arrest
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会、ワークショップ「ゲノム複製研究の最前線 - Flexibility, Fidelity, Fragility」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木 真理子、小林 武彦
2. 発表標題 DNA複製阻害時のDNA二本鎖切断修復と転写制御機構のインタープレイ
3. 学会等名 日本遺伝学会第94回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐々木真理子
2. 発表標題 DNA複製阻害時のDNA二本鎖切断修復によるrDNAコピー数制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会、企画ワークショップ「ゲノムDNA量の変化から紐解く生物の生存戦略」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木真理子、小林武彦
2. 発表標題 DNA複製阻害時のDNA二本鎖切断修復とゲノム不安定化
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 佐々木真理子
2. 発表標題 DNA複製阻害時のDNA二本鎖切断修復と転写制御機構のインタープレイ
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会、企画ワークショップ「ゲノムDNA量の変化から紐解く生物の生存戦略」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐々木真理子、後藤真由子、小林武彦
2. 発表標題 S期サイクリンC1b5によるゲノム安定性維持機構
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム第54回研究報告回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Mariko Sasaki
2. 発表標題 Mechanisms that regulate repair of DNA double-strand breaks at arrested replication forks
3. 学会等名 International Symposium for Female Researchers in Chromatin Biology 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐々木 真理子
2. 発表標題 DNA複製阻害時のDNA日本鎖切断修復と転写制御機構のインタープレイ
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

〔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
---------	---------