

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21399

研究課題名（和文）損傷チェックポイント機構によるDNA二重鎖切断修復の正確性制御メカニズム

研究課題名（英文）Regulation of the fidelity of homology-directed DNA double-strand break repair by the DNA damage checkpoint system

研究代表者

高橋 達郎（Takahashi, Tatsuro）

九州大学・理学研究院・教授

研究者番号：50452420

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：DNA損傷チェックポイント機構は、細胞周期の調節や損傷修復反応の誘導を介して、二重鎖切断損傷に対する適切な細胞応答を制御する。本研究では、ツメガエル卵無細胞系を利用し、DNA損傷チェックポイントが、相同組換えによる二重鎖切断損傷の正確な修復に及ぼす影響を調べた。ATM損傷チェックポイント経路を抑制すると類似配列間の組換えが上昇したことから、ATM経路は組換えの正確性を制御する可能性が示唆された。また、主要な組換え制御因子の一つについて、類似配列間の組換えに特異的なリン酸化修飾を見いだした。これらの結果は、損傷チェックポイント機構による組換え正確性制御の新しいメカニズムを提案する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝情報物質であるDNAの損傷とその修復は人類の健康と医療にも密接に関連する重要な反応です。DNAの損傷は「損傷チェックポイント」と呼ばれる反応によって検知され、これによって細胞は損傷に対して適切に対応することができるようになります。今回我々は、損傷チェックポイントがDNA修復の正確性を向上させるという、新たな機能を発見しました。この機能は、細胞がDNA損傷を適切に修復するためにはたらくと予想されます。今後、この反応のメカニズムが解明されることで、この反応を原因とする染色体の不安定性や、それにつながる疾患などの理解につながると期待されます。

研究成果の概要（英文）：The DNA damage checkpoint system regulates cellular responses to DNA double-strand breaks by controlling the cell cycle and activating DNA damage repair reactions. Here, we studied how DNA damage checkpoint affects the fidelity of homology-directed repair in *Xenopus* egg extracts. Down-regulation of the ATM checkpoint pathway increased erroneous recombination between similar sequences, suggesting that ATM regulates the fidelity of homology-directed repair. We also found that a major recombination regulator receives specific phosphorylation during homology-directed repair between similar sequences. These data suggest a novel role of the DNA damage checkpoint pathway in ensuring the fidelity of homology-directed repair.

研究分野：分子遺伝学

キーワード：DNA損傷チェックポイント ミスマッチ修復 ツメガエル卵抽出液 相同組換え 染色体不安定性

1. 研究開始当初の背景

(1) 相同組換えは DNA 二重鎖切断損傷を修復する重要な DNA 修復経路であり、その機能は組換え酵素による相同鎖探索反応に依存する。一方で、特に動物や植物のようなゲノムサイズの大きい生物のゲノムには、多数の類似配列が存在する。類似配列間の相同組換えはゲノムの再編、不安定化をもたらすため、生物は類似配列間の相同組換えを抑制するメカニズムを進化させてきた。

(2) 類似配列間で相同組換えが起こると、組換え中間体にミスマッチ塩基が形成される。類似配列間の相同組換えは、このミスマッチ塩基を起点として抑制されることが分かっている。ミスマッチの認識は、DNA 合成の誤りを修復するミスマッチ修復機構と共通するミスマッチセンサーによって行われる。興味深いことに、ミスマッチ修復システムが DNA 合成の誤りを修復する際にはミスマッチ塩基を削って再合成するのに対し、類似配列間の相同組換えを抑制する際には、ミスマッチ塩基を含む組換え中間体を削り込むのではなく引き剥がし、正しい相同鎖の再探索を可能とすると考えられている。この反応は、anti-recombination (抗組換え反応) もしくは heteroduplex rejection (ヘテロ二重鎖引き剥がし反応) と呼ばれるが、本報告書では抗組換え反応で統一する。

(3) 真正細菌では、DNA 合成の誤りを修復するために必要な因子群 (MutS、MutL、UvrD、MthH) の全てが、類似配列間の相同組換え抑制に機能する (Rayssiguier et al., Nature, 1989 など)。一方で、真核生物では、DNA 合成に伴うミスマッチ塩基の修正と抗組換え反応は、大きく異なる因子群に依存することが分かってきた (Sugawara et al., PNAS, 2004 など)。具体的には、真核生物において DNA 合成の誤りを修復するミスマッチ修復因子群は MutS α 、MutL α 、Exo1、PCNA などであるが、抗組換え反応には Exo1 や PCNA の寄与はほぼ無く、MutL α の寄与は、実験系にも依存するが MutS α よりも小さい。また出芽酵母の抗組換え反応は、RecQ ファミリーヘリカーゼである Sgs1 ヘリカーゼを必要とするが、この因子は DNA 合成の誤りの修復には不要である。これらの事実は、真核生物におけるミスマッチ塩基の修正と抗組換え反応は、それぞれ大きく異なる分子メカニズムによって駆動されることを示唆する。

(4) 真核細胞では、DNA 二重鎖切断損傷は DNA 損傷チェックポイント機構によって検知される。DNA 損傷チェックポイント機構は、主体となるタンパク質リン酸化酵素の種類によって、大きく二種類に分類される。DNA 二重鎖切断損傷は、まず ATM キナーゼを中核とする ATM 経路によって検知される。さらに、二重鎖切断部位が削り込まれて一本鎖 DNA が露出すると、ATR キナーゼを中核とする ATR 経路が活性化される。これらのキナーゼは、その下流で多数の因子をリン酸化し、細胞周期の制御や、DNA 二重鎖切断損傷の削り込み、相同組換え修復を含む、多様な DNA 損傷応答を適切に制御する。一方で、DNA 損傷チェックポイント機構が類似配列間の相同組換えに及ぼす影響は、これまでほとんど理解されていなかった。

2. 研究の目的

(1) 我々の研究室では、ツメガエル卵の核質抽出液 (NPE) をモデル系に、ミスマッチ修復関連反応を含む様々な DNA 関連反応を試験管内で再現、解析してきた。特に重要なことに、我々は相同性を利用した DNA 修復機構の一つである一本鎖アニーリング (SSA) 反応をモデル系に用い、類似配列間の相同組換え制御反応を試験管内で再現することに成功している (河添ら、投稿準備中)。興味深いことに、我々は、この系に ATM/ATR の阻害剤であるカフェインを加えると、類似配列間の SSA が増加することを見いだした。本研究では、この発見を手がかりとして、DNA 損傷チェックポイント機構が相同組換えの正確性に及ぼす影響を解析した。

(2) 具体的には、ATM と ATR の二つの損傷チェックポイント機構のうち、どちらの経路が類似配列間の相同組換えに関与するかを検討した。また、これらタンパク質リン酸化酵素の下流ターゲットについても検討した。

3. 研究の方法

(1) 真核生物の相同組換え経路は、反応メカニズムや産物の違いから、いくつかのサブ経路および関連経路に分類することができる。そのうちの一つ、一本鎖アニーリング経路 (Single-strand annealing, SSA) は、タンデムに並んだ相同領域の間に DNA 二重鎖切断損傷が生じた際にはたらく経路であり、組換え酵素による相同領域間の対合、貼り付きを経て、相同領域のコピー数一つ減った産物を生じる。この反応は、過去にツメガエル卵核質抽出液を用いて試験管内再現されている (Yan et al., J Cell Biol, 2005)。そこで本研究では、SSA 反応をモデル系に、抗組換え反応の試験管内モデル化と、これを用いた分子機構の解明を目指した。

(2) 具体的には、420 bp の相同領域をタンデムに持つプラスミド DNA を構築し、これを制限酵素を用いて切断し、NPE に加えた。反応後の産物を回収し、制限酵素切断によってコピー数の変動を解析した。

4. 研究成果

(1) NPE において観察される SSA 反応は、組換えを引き起こすリピート間の相同性によって影響を受け、リピート間の相同性を低下させると SSA 効率の顕著な低下が観察される。この SSA 効率低下の大部分は抗組換え反応に依存しており、ミスマッチ塩基のセンサーである MutS α を NPE から除去すると、相同性の低いリピート間での SSA 効率が上昇する。抗組換え反応が DNA 損傷チェックポイントによって制御される可能性を検討するため、NPE にカフェインを加えて ATM と ATR を阻害し、ここにプラスミド基質を加えて SSA を引き起こしたところ、類似配列間 SSA の顕著な上昇が観察された。この結果は、DNA 損傷チェックポイント機構が抗組換え反応の効率制御に機能する可能性を示唆する。

(2) 前述のように、ATM 経路は DNA 二重鎖切断損傷の末端に応答し、ATR 経路は削り込まれた一本鎖 DNA 構造に応答する。ATM 経路は SSA に必要な DNA 二重鎖切断損傷削り込みを制御しており、ATR は SSA が起こる際に生じる一本鎖 DNA によって活性化されるため、どちらの経路も抗組換え反応の制御に関与する可能性がある。そこで、それぞれのキナーゼに対する特異的抗体を作成し、NPE から免疫除去を行った。興味深いことに、ATM を免疫除去した抽出液では、類似配列間 SSA の明らかな効率上昇が認められた。その一方で、ATR を免疫除去した抽出液では、類似配列間 SSA の効率上昇は認められなかった。この結果は、ATM 経路が抗組換え反応を活性化する可能性を示唆する。

(3) 我々はこれまでに、類似配列間 SSA の抑制を担う因子を探索し、Werner (Recq3) の免疫除去によって、抗組換え活性が著しく減少することを見いだしている。Werner はヘリカーゼの活性に加え、エキソヌクレアーゼの活性も持つ複合酵素であるが、ヌクレアーゼ欠損 Werner は抗組換え活性を保持していたのに対し、ヘリカーゼ欠損 Werner は抗組換え活性を完全に失っていたことから、ヘリカーゼ活性が抗組換え反応に重要であることが分かっている。Werner タンパク質は ATM および ATR のリン酸化基質である事が知られているので、Werner が DNA 損傷チェックポイント機構による抗組換え反応制御に重要である可能性を予想した。そこで、Werner のリン酸化状態を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を用いて調べたところ、大変興味深いことに、SSA 基質が 100% 相同である場合には、Werner タンパク質の顕著なバンドシフトは見られないのに対し、リピート間の相同性を低下させると、はっきりと検出可能なバンドのシフトアップが見られた。この結果は、抗組換え反応が動作する際に、Werner タンパク質がリン酸化修飾を受ける事を示唆する。

(4) Werner タンパク質の ATM および ATR キナーゼによるリン酸化部位については既に複数の報告がある。そこで、既知の ATM リン酸化部位を標的に Werner のアラニン置換変異体を作成した。NPE から Werner を免疫除去し、ATM リン酸化部位の変異 Werner タンパク質を加え戻して抗組換え反応を解析したところ、抗組換え反応の効率に目立った変化は見られなかった。この結果は、Werner タンパク質の既知の ATM リン酸化部位以外に、抗組換え反応を制御する ATM リン酸化が存在する可能性を示唆する。

(5) 本研究によって、DNA 損傷チェックポイント機構、特に ATM 経路が抗組換え反応の活性化に重要である可能性が示された。ATM 経路は DNA 二重鎖切断損傷に最初に応答する経路であるので、この経路が DNA 損傷修復の正確性を向上させる抗組換え反応を活性化するのは理にかなっている。また、本研究から、Werner タンパク質は、抗組換え反応の活性化とよく一致してリン酸化修飾を受ける事が示唆された。この結果は、Werner が ATM 経路の重要な標的タンパク質である可能性を示唆する。我々のこれまでの解析からは、この機能に必須の Werner リン酸化部位は同定されていないが、未同定のリン酸化部位が Werner に存在する可能性や、Werner のリン酸化と機能重複する別の標的タンパク質が存在する可能性などが予想される。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Jones Mathew J.K., Gelot Camille, Munk Stephanie, Koren Amnon, Kawasoe Yoshitaka, George Kelly A., Santos Ruth E., Olsen Jesper V., McCarroll Steven A., Frattini Mark G., Takahashi Tatsuro S., Jallepalli Prasad V.	4. 巻 81
2. 論文標題 Human DDK rescues stalled forks and counteracts checkpoint inhibition at unfired origins to complete DNA replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 426 ~ 441.e8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2021.01.004	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

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 MMRシステムによる相同組換え正確性制御のメカニズム
3. 学会等名 国立遺伝学研究所・研究集会「染色体安定維持研究会」
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋達郎
2. 発表標題 Regulation of the fidelity of homology-directed repair in Xenopus egg extracts
3. 学会等名 The 11th quinquennial conference on DNA repair (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河添好孝
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼは一本鎖アニーリングの正確性を制御する
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 河添好孝
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼはDNA二重鎖切断修復の正確性を制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河添好孝
2. 発表標題 WernerヘリカーゼとMutL エンドヌクレアーゼは一本鎖アニーリングの正確性を制御する
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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室ウェブサイト http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/ 研究室ウェブサイト http://www.biology.kyushu-u.ac.jp/~chromosome/index.html
--

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	河添 好孝 (Kawasoe Yoshitaka)	九州大学・大学院理学研究院・助教	

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