

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06551

研究課題名（和文）RecQ4が制御する新たなDNA修復経路選択機構の解明

研究課題名（英文）Study of RecQ4 function in DNA repair pathway choice

研究代表者

津山 崇（Tsuyama, Takashi）

東邦大学・薬学部・講師

研究者番号：70436096

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）：本研究はDNA二本鎖切断の修復経路選択機構を明らかとするため、RecQ4の機能解析をおこなった。DNA二本鎖切断の修復経路にはKu70/Ku80複合体が関与する非相同末端結合とMRE11が関与する相同組換えがある。RecQ4とKu70/Ku80複合体またはMRE11との相互作用について調べたところ、RecQ4のN末側断片（RecQ4-N）がKu70とKu80の複合体形成を阻害する可能性を見出した。また、RecQ4-NがMRE11のエンドヌクレアーゼ活性を阻害することを明らかとした。これらの結果は、RecQ4がN末側領域を介して、DNA二本鎖切断修復の経路選択に影響を与えることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果により、RecQ4がN末側領域を介して非相同末端結合と相同組換えを促進または抑制する経路選択機能を有する可能性が示された。これはDNA修復経路の選択における新たなメカニズムの発見および、DNA修復と関連性が高いがんや老化のメカニズムの理解へと繋がる。さらに、DNA修復経路の阻害薬の開発へと応用でき、がん治療における放射線照射や化学療法剤などの治療効果の向上に貢献できる。また、DNA二本鎖切断修復を利用した遺伝子改変技術であるゲノム編集の効率上昇を介して遺伝子治療分野の発展にも寄与する。

研究成果の概要（英文）：In this study, we investigated the function of RecQ4 to clarify the mechanism of DNA double-strand break (DSB) repair pathway choice. The two pathways are known to be involved in DSB repair: non-homologous end-joining, which is initiated by Ku70/Ku80 complex, and homologous recombination, which is initiated by MRE11. Our results suggest that the N-terminal fragment of RecQ4 inhibited both the Ku70/Ku80 complex formation and the endonuclease activity of MRE11. RecQ4 may affect the DSB repair pathway choice through its N-terminal domain.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA修復 RecQ4 非相同末端結合 相同組換え

1. 研究開始当初の背景

放射線照射や一部の化学療法剤は DNA 二本鎖切断を誘発するが、これが適切に修復されないで細胞死や染色体構造異常などが引き起こされる。DNA 二本鎖切断は主に、切断末端を直接結合する非相同末端結合と、複製された DNA を修復時の鋳型として用いる相同組換えのいずれか一方の経路で修復される。両経路の特徴として、非相同末端結合は細胞周期を通じておこなわれるが正確性が低いのに対して、相同組換えは S~G2 期でのみおこなわれ、正確性が高いという点が挙げられる。修復機構としては、非相同末端結合では、まず Ku70/Ku80 二量体 (Ku) が切断末端に結合することで開始される。相同組換えではまず MRE11 などのヌクレアーゼによる切断末端の削り込みが起こり、一本鎖 DNA が生成される。ここに、DNA 鎖交換反応を担う Rad51 が結合することで組換え反応が進行する。これら 2 つの経路は拮抗しており、切断末端における Ku と MRE11 の結合が修復経路の決定に重要であることが知られている。また、DNA 損傷チェックポイントの中心的キナーゼである ATM が DNA 二本鎖切断により活性化し、種々のタンパク質をリン酸化することで DNA の修復が促進される。一方、早期老化症状や高発がん性を示す遺伝病であるロスマンド・トムソン症候群の原因遺伝子産物として、DNA ヘリカーゼである RecQ4 が同定されている。研究代表者のこれまでの研究や他の報告から、RecQ4 が DNA 二本鎖切断修復に関与することが示されているが、その詳細な機能についてはほとんど明らかとなっていなかった。ロスマンド・トムソン症候群では RecQ4 の変異が中央のヘリカーゼ領域から C 末端側に集中していることから、N 末側領域のみが機能している状態であると考えられた。患者細胞の病態を理解するため、アフリカツメガエル卵抽出液無細胞実験系を用いて RecQ4 の N 末側領域の機能解析をおこなった結果、研究代表者は RecQ4 の N 末側領域の断片が濃度依存的に Ku と Rad51 のクロマチン (損傷 DNA) への結合を促進または阻害することを見出した。この結果は、RecQ4 が N 末側領域を介して非相同末端結合と相同組換えを促進または抑制する経路選択機能を有する可能性を示しており、これは修復経路選択における新たなメカニズムの発見につながると考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、RecQ4 の N 末側断片 (以後 RecQ4-N) が用量依存的に DNA 二本鎖切断誘発時の Ku70 と Rad51 のクロマチン結合を促進または阻害することを見出している。この結果は、RecQ4 が状況に応じて非相同末端結合と相同組換えを促進または抑制する経路選択機能を有する可能性を示しており、このことは DNA 二本鎖切断修復の経路選択における新たなメカニズムの発見につながる。そこで本研究の目的は、RecQ4-N による非相同末端結合と相同組換えの促進または阻害のメカニズムを明らかとすることであり、これにより DNA 二本鎖切断修復機構および DNA 二本鎖切断修復経路選択機構の一端を分子レベルから解明する。

3. 研究の方法

本研究では、RecQ4-N の機能について、組換えタンパク質による解析とヒト培養細胞を用いた解析をおこなった。組換えタンパク質を用いた解析では、大腸菌で発現させた各組換えタンパク質を精製した後、RecQ4-N と Ku70/Ku80 や MRE11 との相互作用についてプルダウンアッセイや、エンドヌクレアーゼアッセイにより解析した。プルダウンアッセイでは、GST タグを付与した組換えタンパク質と GST タグを付与していない組換えタンパク質を混合した後、グルタチオンセファロースに結合したタンパク質を抽出した。エンドヌクレアーゼアッセイでは、RecQ4-N の存在下または非存在下において phiX174 一本鎖環状 DNA を MRE11 の組換えタンパク質とインキュベートした後、アガロースゲル電気泳動で分離してから未分解の DNA に対応するバンド強度を定量した。ヒト培養細胞を用いた解析では、ゲノム編集技術を用いて RecQ4-N の発現誘導株を作製し、発現誘導時の細胞周期の進行過程への影響をフローサイトメトリーにより、DNA 傷害剤に対する感受性の変化を細胞生存率を指標として解析した。

4. 研究成果

RecQ4-N が Ku70 または Rad51 のクロマチン結合を抑制したことから、DNA 二本鎖切断誘発時において RecQ4-N が非相同末端結合または相同組換えの上流で作用する可能性が考えられた。そこで、それぞれの経路の上流で機能し、RecQ4 と結合することが知られている Ku と MRE11 について、(1) RecQ4-N と Ku70/Ku80 との相互作用および、(2) RecQ4-N と MRE11 との相互作用について解析した。また、(3) RecQ4-N 発現誘導ヒト細胞株を用いた解析をおこなった。

(1) RecQ4-N と Ku70/Ku80 との相互作用の解析

研究代表者は非相同末端結合で機能する Ku70 が RecQ4-N と結合することを見出している。そこで、Ku70 における RecQ4-N との結合領域を調べるため、アフリカツメガエル Ku70 の N 末側領域と C 末側領域の組換えタンパク質を作製し、プルダウンアッセイにより RecQ4-N との結合を調べたところ、C 末側領域で結合することが確認された。Ku70 の C 末側領域には、DNA 結合ドメイン、Ku80 結合ドメイン、SAP ドメインが存在する。Ku70 における RecQ4 の結合領域を同定す

るため、Ku70 全長の発現用プラスミド DNA を鋳型として、インバース PCR により各ドメインを欠失したプラスミド DNA を作製し、これらが大腸菌へ導入して各欠失変異体タンパク質を発現・精製した。これらの組換えタンパク質と RecQ4-N との結合活性を調べたところ、DNA 結合ドメインを欠失した Ku70 において RecQ4-N の結合が減少したことから、RecQ4-N が Ku70 の DNA 結合ドメインと相互作用することが示唆された。また、これまでに RecQ4-N が DNA 二本鎖切断誘発時の Ku70 のクロマチン結合を阻害することを見出しているが、Ku70 は Ku80 と複合体を形成することで DNA 二本鎖切断末端に結合することが知られている。そこで、次に RecQ4-N が Ku70 と Ku80 の複合体形成に与える影響について調べた。GST タグを付与した Ku80 (GST-Ku80) の組換えタンパク質を大腸菌で発現・精製し、Ku70 の組換えタンパク質と混合したところ、GST-Ku80 と Ku70 の結合が確認された。そこで、GST-Ku80・Ku70 とともに RecQ4-N を混合したときの、Ku80 と Ku70 の結合をプルダウンアッセイにより調べたところ、RecQ4-N の添加により Ku80 と Ku70 の結合が減弱する可能性が見出された。この結果は、RecQ4-N が Ku80/Ku70 の複合体形成を阻害することで Ku のクロマチン結合を抑制し、これにより非相同末端結合を阻害することを示唆している。

一方、研究代表者はこれまでに、RecQ4-N の部分的な欠失変異体を用いた解析から、Ku70 との結合性が増強または減弱する変異体を得ている。そこで、Ku70 との結合に関わるアミノ酸領域を絞り込むため、RecQ4-N において高度に保存されている領域を欠失させた各種変異体タンパク質を作製している。今後、これら変異体と Ku70 との結合や、非相同末端結合に与える影響について調べる予定である。

(2) RecQ4-N と MRE11 との相互作用の解析

相同組換えの上流で機能するヌクレアーゼである MRE11 と RecQ4-N との相互作用について調べるため、アフリカツメガエル MRE11 の組換えタンパク質を大腸菌で発現・精製した。まず作製した MRE11 の組換えタンパク質が一本鎖環状 DNA に対しエンドヌクレアーゼ活性を示すこと、一本鎖および二本鎖 DNA との結合活性を有することを確認した。次に、RecQ4-N が MRE11 のエンドヌクレアーゼ活性に対して与える影響について調べたところ、MRE11 のエンドヌクレアーゼ活性は RecQ4-N の濃度依存的に抑制された。この RecQ4-N による MRE11 のエンドヌクレアーゼ活性阻害効果が MRE11 の DNA 結合が阻害された結果であるか確認するため、RecQ4-N の存在下における MRE11 の DNA 結合活性を調べた。その結果、一本鎖および二本鎖 DNA に対する MRE11 の結合活性は、RecQ4-N の添加による影響を受けなかった。また、プルダウンアッセイにより MRE11 と RecQ4-N が直接結合することが確認された。これらの結果より、RecQ4-N が MRE11 と直接結合することでエンドヌクレアーゼ活性を阻害することが示唆された。

一方、これまでに研究代表者は、DNA 二本鎖切断誘発時における RecQ4-N による Ku70 のクロマチン結合の阻害作用が、ATM キナーゼ阻害剤の添加により抑制されることを見出している。そこで、RecQ4-N の非相同末端結合または相同組換えの阻害作用に、ATM による RecQ4-N のリン酸化が関与するか調べるため、RecQ4-N に存在する ATM による推定リン酸化部位 5 カ所をすべてグルタミン酸に置換した疑似リン酸化型変異体 (RecQ4-N 5D) の組換えタンパク質を作製した。RecQ4-N 5D の MRE11 のエンドヌクレアーゼ活性に対する阻害作用について調べたところ、RecQ4-N と同程度の阻害作用が観察されたことから、MRE11 のエンドヌクレアーゼ活性阻害作用には RecQ4-N のリン酸化が影響を与えないことが示唆された。

(3) RecQ4-N 発現誘導ヒト細胞株を用いた解析

ヒト培養細胞を用いて RecQ4-N の機能解析をおこなうため、ヒト乳がん細胞株 MCF-7 細胞のゲノム DNA に CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により RecQ4-N を組み込み、ドキシサイクリンの添加により発現誘導可能な RecQ4-N 発現誘導細胞株を樹立した。まず、RecQ4-N 発現誘導時の細胞周期分布についてフローサイトメトリーにより解析したところ、RecQ4-N の発現は細胞周期の進行に影響を与えなかった。次に、RecQ4-N 発現誘導時の DNA 二本鎖切断誘発剤 (エトポシド、カンプトテシン、プレオマイシン) に対する感受性の変化について調べた。ドキシサイクリンを添加してから 48 時間後に各濃度のエトポシド、カンプトテシンまたはプレオマイシンを添加し、さらに 48 時間インキュベートしてから生存細胞数を計測した。その結果、RecQ4-N の発現はエトポシドおよびカンプトテシンに対する感受性には影響を与えなかったが、プレオマイシンに対する感受性に亢進がみられた。プレオマイシンは DNA 二本鎖切断のみならず、DNA 一本鎖切断や酸化傷害も誘発することから、RecQ4 が種々の DNA 損傷応答に関与することが示唆された。

以上より、RecQ4-N による非相同末端結合または相同組換えの阻害メカニズムの一端が明らかとなった。この結果は、DNA 二本鎖切断修復経路選択機構の解明に寄与するものである。

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 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Tsuyama Takashi, Fujita Kumiko, Sasaki Ryosuke, Hamanaka Shiori, Sotoyama Yuki, Ogawa Akira, Kusuzaki Kana, Azuma Yutaro, Tada Shusuke	4. 巻 787
2. 論文標題 N-terminal region of RecQ4 inhibits non-homologous end joining and chromatin association of the Ku heterodimer in <i>Xenopus</i> egg extracts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145647 ~ 145647
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2021.145647	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東 祐太郎、武藤 南、上迫 美月、大貫 舞里絵、津山 崇、多田 周右
2. 発表標題 高濃度グルコースによるアポトーシスの亢進におけるO-GlcNAc修飾HSP90の役割
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 鹿島 侑樹、津山 崇、東 祐太郎、多田 周右
2. 発表標題 DNA複製ライセンス化機構におけるCdt1の自己会合の関与
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 鹿島 侑樹、津山 崇、東 祐太郎、多田 周右
2. 発表標題 RecQ4のN末側領域はDNA二本鎖切断に対する非相同末端結合修復を阻害する
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022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
---------	---------