

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12245

研究課題名（和文）転写ストレスが引き起こすDNA二本鎖切断と細胞応答

研究課題名（英文）Cellular responses to DNA double-strand breaks caused by transcription stress

研究代表者

逆井 良（SAKASAI, Ryo）

金沢医科大学・医学部・准教授

研究者番号：10549950

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：抗がん剤であるカンプトテシン（CPT）で誘導される転写ストレスとして、DNA二本鎖切断（transcription-coupled DSB：tc-DSB）が生じることが分かっているが、tc-DSBの発生・修復機序はよく分かっていない。我々はDNAヘリカーゼであるRecQL5に注目して解析を行った。CPTにより停止した転写近傍でDNA-RNAハイブリッド構造に関連するDNA二次構造が誘導されるが、RecQL5欠損細胞ではDNA二次構造が解消されずに、別のDNA修復であるTC-NERが働くため、DSBが誘導されていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、抗がん剤であるCPTによる細胞影響において、あまり研究が進んでいない転写に対する影響に注目したものである。転写は全ての細胞で起こっており、転写ストレス応答の解明は、CPT誘導体を用いた化学療法における副作用を考える上で重要と考えられる。また、Top1-DPCの代謝異常は神経変性疾患との関連が言われており、本研究の成果はTop1-DPCが神経細胞で毒性を発揮する機構を示唆するもので、神経疾患の病態解明にもつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Transcriptional stress induced by the anti-cancer drug camptothecin (CPT) is known to cause DNA double-strand breaks (transcription-coupled DSBs, tc-DSBs), but the mechanisms of tc-DSB generation and repair have not been well understood. We analyzed tc-DSB response by focusing on RecQL5, a DNA helicase, which suggests that DNA secondary structures related to the DNA-RNA hybrid are induced in the vicinity of stalled transcription machinery, but in RecQL5-deficient cells, the DNA secondary structures are not resolved and leads the involvement of another DNA repair TC-NER, resulting in tc-DSB generation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：DNA二本鎖切断 転写 カンプトテシン

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA二本鎖切断(DSB)はDNA損傷の中でも特に毒性が強く、がん治療にも古くから利用されている。DNAトポイソメラーゼを標的とした抗がん剤もDSBを引き起こす。カンプトテシン(CPT)はDNAトポイソメラーゼI(Top1)の阻害剤であり、Top1の反応をトラップし、異常中間体(Top1 DNA-protein cross-link: Top1-DPC)を蓄積させる。Top1-DPCがDNA複製装置と衝突することでDSBが生じ、強い細胞毒性を示すことがわかっている。一方、Top1-DPCは転写装置とも衝突して転写ストレスを引き起こす。転写ストレスは、神経疾患等との関連が予想されるが、転写ストレス応答の解析はあまり進んでいない。我々は、CPTによる転写ストレス時にDSB(transcription-coupled DSB: tc-DSB)が生じることを報告している。その後、転写共役ヌクレオチド除去修復(TC-NER)に関わる因子CSBが、tc-DSBの発生を促すことを報告した。

我々はtc-DSBに対する関与因子のスクリーニングを進め、RecQL5を見出している。RecQL5はRNAポリメラーゼII(PolIII)と相互作用するDNAヘリカーゼである。RecQL5欠損細胞では、tc-DSBの発生が上昇することを見出しており、Top1-DPCで停止した転写装置近傍に異常なDNA二次構造が生じ、それをRecQL5が解消することでtc-DSBの発生を抑制しているという仮説が考えられた。CPTによるDNA複製への影響は古くから解析されている一方、転写への影響は研究が遅れている。近年、関与因子が少しずつ報告されているが、その細胞応答については不明な点が多い。

2. 研究の目的

CPTによるDNA複製への影響は、抗がん剤としての殺細胞効果と直接的に関わるため非常に研究が進んできたが、増殖がそこまで盛んでない正常細胞に対しては、Top1-DPCによる転写ストレスがかかっていることが想像される。また、CPT誘導体の抗癌剤は、副作用として神経症状が知られている。さらに、Top1-DPCは自然条件下でも生じており、Top1-DPCを取り除く酵素TDP1は、その変異により神経変性疾患を引き起こすことが知られている。これらのことは、Top1-DPCによる転写ストレスが神経毒性を示す可能性を示唆しており、神経変性疾患におけるtc-DSBの関与が考えられるが、明らかにはなっていない。そこで本研究の目的は、tc-DSBの発生機構および修復機構を解明し、Top1-DPCによる転写ストレスが引き起こす細胞毒性を評価することである。

3. 研究の方法

(1) DNA二次構造のtc-DSB形成への影響解析

Top1-DPCで停止したPolIII近傍の異常DNA二次構造としては、転写されたRNAにより形成されるDNA-RNAハイブリッドを含むR-loop構造が考えられる。また、R-loopのようなループ構造が形成されるのであれば、1本鎖DNA領域でさらなるDNA二次構造が形成されることも考えられる。

R-loopの関与は、RecQL5欠損細胞にDNA-RNAハイブリッドを解消するRNase H1を過剰発現させた細胞で、53BP1の免疫染色により評価する。またDNA-RNAハイブリッド特異的抗体によるスロットブロットアッセイ、もしくは、免疫染色等でR-loopの関与を評価する。R-loop以外の可能性についても、特異的抗体を用いた同様の方法により解析する。

また、tc-DSBはゲノム中の特定の場所で形成されている可能性も考えられ、核小体や核スペックル、PML体等の核内構造体に関連しているか解析する。核内構造体とtc-DSBとの関連は、RecQL5欠損細胞において各核内構造マーカーと53BP1 fociとの局在比較により評価する。

(2) TC-NER経路のtc-DSB形成への影響解析

我々は以前、CSBがtc-DSB形成に関与することを報告しており、TC-NER経路がtc-DSB形成に関与することが示唆されている。そこで、CRISPR-Cas9を用いてTC-NERの中心的な制御因子であるCSBおよびCSAのノックアウト細胞を作製し、RecQL5をノックダウンした状態で、53BP1 fociの数を解析する。さらに、TC-NERにおけるヌクレアーゼXPGおよびXPFについても、RNAiにより検討する。

(3) tc-DSBの修復経路と細胞毒性解析

tc-DSBによる53BP1 fociはS期以外の細胞で観察されることから、tc-DSBはNHEJで修復されることが予想される。そこで、NHEJの関与を検討するため、NHEJ因子であるDNA ligase IVの欠損細胞で、53BP1 fociの数を解析する。NHEJの関与が認められなかった場合には、別のNHEJ経路について、RNAiや阻害剤により解析する。

tc-DSBの細胞毒性はCPT感受性で評価するが、DNA複製ストレスの影響を排除するため、G1期に同調させた細胞に対してCPTを暴露させ、S期への進行を抑制した状態で培養し、細胞生存

率を解析する。また、神経系細胞においても同様の影響が観察されるか否か、神経芽腫細胞である SH-SY5Y 等の細胞を用いて神経細胞に分化させ、CPT に対する毒性試験を行う。

4. 研究成果

(1) DNA 二次構造の tc-DSB 形成への影響解析

DNA-RNA ハイブリッドの影響を解析するため、同構造を解消する RNaseH1 の過剰発現細胞を樹立した。本細胞で RecQL5 をノックダウンし、53BP1 foci で tc-DSB を評価したところ、RNaseH1 過剰発現により foci 数が減少した (図 1)。したがって、R-loop 構造が tc-DSB の形成に関わっていることが示唆されるため、RecQL5 欠損細胞では、CPT 処理により R-loop が蓄積している可能性が考えられる。そこで、CPT 処理後の細胞からゲノム DNA を抽出し、スロットブロット法による DNA-RNA ハイブリッドの定量解析を進めている。現在のまでのところ、RecQL5 欠損による R-loop の蓄積は観察されていない。DNA-RNA ハイブリッドは RecQL5 の直接のターゲットではない可能性も考えられ、別の DNA 二次構造についても検討を進める予定である。また、核内構造体との関連については、まだ明確な関連は認められておらず、今後も検討予定である。

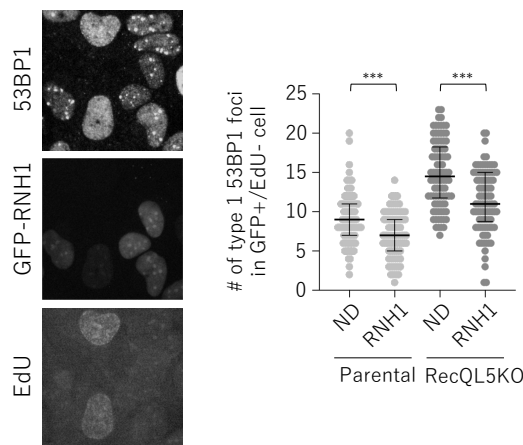


図1 RNaseH1過剰発現によるtc-DSBへの影響
ND: Nuclease dead mutant
RNaseH1: Wild type RNaseH1

(2) TC-NER 経路の tc-DSB 形成への影響解析

TC-NER 経路の tc-DSB 形成への影響を解析するため、まずは RNAi により TC-NER 因子である CSB および CSA のノックダウンを行い、tc-DSB の形成への影響を解析した。CSB および CSA ノックダウンにより、RecQL5KO 細胞での 53BP1 foci は減少し、tc-DSB が減少したことが示唆された (図 2)。同様に、CRISPR-Cas9 法を用いて CSB および CSA ノックアウト作成して解析したところ、同様の結果が得られた。したがって、RecQL5 欠損により、停止した転写装置近傍で何らかの DNA 二次構造が誘導された際に、CSB-CSA が関わることで DSB が誘導されていると考えられる。そこで、TC-NER のヌクレアーゼである XPF および XPG について、RNAi で検討した。その結果、ダブルノックダウンすることで、RecQL5 欠損細胞における tc-DSB の減少が観察された。現在は、これらの因子が、紫外線 DNA 障害等に対する TC-NER と同じ経路として働いているかどうかについて検討を進めている。

また、RecQL5 の tc-DSB 抑制機構をさらに解析するため、CPT 処理後の RecQL5 のクロマチンへの集積についても解析した。その結果、CPT 処理依存的に RecQL5 はクロマチン上へとリクルートされ、転写阻害剤で抑制された。さらに、CSB 欠損細胞では RecQL5 のリクルートは影響を受けず、CSA のリクルートも RecQL5 欠損により影響を受けなかった。したがって、Top1-DPC による転写ストレスに対し、RecQL5 は TC-NER 因子とは独立してクロマチン上にリクルートされてくると考えられる。

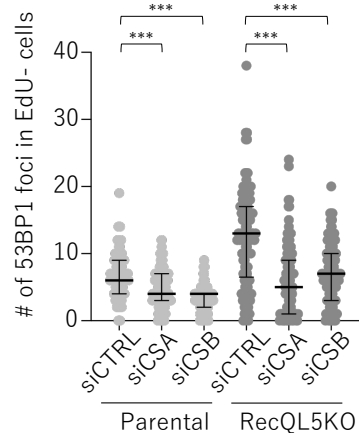


図2 CSB、CSA依存的なtc-DSB生成

(3) tc-DSB の修復経路と細胞毒性解析

tc-DSB は S 期以外で観察されることから NHEJ の関与が疑われる。そこで、NHEJ 因子である DNA ligase IV (LIG4) のノックアウト細胞を作成し、CPT 処理後の 53BP1 foci の減少で修復効率を評価した。コントロール細胞では、LIG4KO により 53BP1 foci の現象はほとんど見られなくなり、その修復は NHEJ 経路に大きく依存していると考えられる。一方、RecQL5 欠損細胞では、LIG4KO による影響は部分的であり、NHEJ 以外の経路も関わる可能性が示唆された。そこで、まずは別の NHEJ 経路に関わる DNA Polymerase θ のノックアウト細胞で解析を行ったが影響は見られなかった。さらに、転写依存的な NHEJ 経路に関わるものが報告されている Rad52 についても検討を進めているが、現在までのところ明確な寄与は見られていない。今後も修復経路については更なる検討が必要である。

tc-DSB がどの程度の毒性があるか、CPT に対する感受性で検討した。増殖細胞ではアフィジコリン等で DNA 複製を止めて解析する必要があるが、複製を止めることによるストレスを回避するため、静止期の細胞を用いて細胞毒性試験を試みた。静止期細胞としては、RPE-1 細胞を血清飢餓により調整した。しかし、現在までのところ細胞毒性の評価には至っておらず、細胞死を観察するためのさらなる条件検討が必要である。今後は、神経系の細胞も含め、検討する予定である。

以上の結果から、CPT 処理により生じた Top1-DPC が転写とぶつかった際の転写ストレス応答として、おそらくは R-loop を含む二次構造が形成され、その二次構造依存的に RecQL5 がリクルートされる。一方、転写ストレスそのもので TC-NER 因子もリクルートされ、RecQL5 による二次構造の解消が起こらない場合には、XPF, XPG を含むヌクレアーゼが DNA を消化することで tc-DSB が生成されることが考えられる。この tc-DSB は、RecQL5 存在下での tc-DSB とは性質が異なり、NHEJ だけでは修復されず、他の経路も関わっている可能性が考えられる。

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 1件）

1. 著者名 Sakasai Ryo, Matsui Tadashi, Sunatani Yumi, Iwabuchi Kuniyoshi	4. 巻 668
2. 論文標題 UbcH5c-dependent activation of DNA-dependent protein kinase in response to replication-mediated DNA double-strand breaks	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 42 ~ 48
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2023.05.068	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 Sakasai Ryo, Wakasugi Mitsuo, Matsui Tadashi, Sunatani Yumi, Saijo Masafumi, Matsunaga Tsukasa, Iwabuchi Kuniyoshi	4. 巻 113
2. 論文標題 Camptothecin compromises transcription recovery and cell survival against cisplatin and ultraviolet irradiation regardless of transcription-coupled nucleotide excision repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 103318 ~ 103318
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2022.103318	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 Shibata Teppei, Ikawa Masahito, Sakasai Ryo, Ishigaki Yasuhito, Kiyokawa Etsuko, Iwabuchi Kuniyoshi, Singh Dharendra P, Sasaki Hiroshi, Kubo Eri	4. 巻 196
2. 論文標題 Lens-specific conditional knockout of tropomyosin 1 gene in mice causes abnormal fiber differentiation and lens opacity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Mechanisms of Ageing and Development	6. 最初と最後の頁 111492 ~ 111492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.mad.2021.111492	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 逆井良、松井理、砂谷優実、岩淵邦芳
2. 発表標題 DNA複製を介したDNA二本鎖切断に対し、BRCA2は53BP1-核ラミナ-LINC複合体を介した核の断片化を抑制する
3. 学会等名 第27回DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 逆井良、松井理、砂谷優実、岩淵邦芳
2. 発表標題 DNA複製を介したDNA二本鎖切断の修復機構とその破綻による核の断片化
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 逆井良、岩淵邦芳
2. 発表標題 53BP1- and BRCA2-dependent biphasic repair of replication-mediated one-ended DSBs
3. 学会等名 第9回DNA損傷応答ワークショップ
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Sakasai, Yumi Sunatani, Tadashi Matsui, Kuniyoshi Iwabuchi
2. 発表標題 53BP1- and BRCA2-dependent biphasic repair of replication-mediated one-ended DSBs
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryo Sakasai, Yumi Sunatani, Tadashi Matsui, Kuniyoshi Iwabuchi
2. 発表標題 BRCA2 prevents nuclear fragmentation mediated by LINC-lamina-53BP1 axis in response to one-ended DNA double-strand breaks
3. 学会等名 The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 逆井良、若杉光夫、松井理、砂谷優実、西條将文、松永司、岩淵邦芳
2. 発表標題 カンプトテシンはDNA損傷後の転写の回復を阻害しスプラチンに対する殺細胞効果を増強する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

金沢医科大学 医学部 生化学I https://kmu-bc1.jimdofree.com/
--

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
研究分担者	西 良太郎 (NISHI Ryotaro) (80446525)	東京工科大学・応用生物学部・准教授 (32692)	

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