

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15069

研究課題名（和文）ヒト細胞のゲノム安定性維持におけるマイナーな二本鎖DNA切断修復機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of minor double-strand DNA break repair mechanisms in the maintenance of genomic stability in human cells.

研究代表者

齋藤 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） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、alt-EJに必要な不可欠なPol $\beta$ の機能に着目し、このタンパク質の構造機能相関解析を行い、ATPaseドメインとPolymeraseドメインだけでなく、Pol $\beta$ のユニークな3ヶ所の挿入配列もalt-EJに重要な機能を果たしていることを明らかにした。また、独自に構築した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利用し、種々の遺伝学的な解析を行った結果、Alu-Alu組換えに関わる新規因子を複数同定した。本研究の成果は、二本鎖DNA切断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示唆を与えることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

二本鎖DNA切断は最も危険なDNA損傷であり、不完全な修復はがん化や細胞死を引き起こす。そのため、二本鎖DNA切断が細胞内でどのように修復されるのかを理解することは、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に重要な示唆を与える。本研究ではDSB修復経路であるalt-EJおよびAlu-Alu組換え（SSA）の分子機構の一旦を明らかにすることができた。これらの結果は、DSB修復機構の全容解明のみならず創薬医療分野への応用（特に抗がん剤開発）に向けて重要な示唆を与えると期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, I performed structure-function relationship analysis of DNA polymerase  $\beta$  (Pol $\beta$ ), which is essential for alt-EJ. In a series of experiments, I found that in addition to the ATPase and polymerase domains, three unique insertion loops of Pol $\beta$  also play important functions in alt-EJ. I also identified several novel factors involved in Alu-Alu recombination through various genetic analyses. These findings are expected to provide significant insights into the understanding of the mechanism of DNA double-strand break repair and potentially for medical applications in the field of drug discovery.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA修復 組換え 二本鎖切断 Alu

## 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おり、とりわけ二本鎖 DNA 切断 (以下、DSB は最も危険な DNA 損傷である。DSB は、通常、非同相末端連結 (non-homologous end joining; 以下「NHEJ」) または相相組換え (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。このうちの一つが alternative end-joining (以下「alt-EJ」)、もう一つが一本鎖 DNA アニール (single-strand annealing; 以下「SSA」) である。alt-EJ の実体は長きに渡り不明であったが、私は最近、NHEJ 以外の非同相組換えはすべて MMEJ (microhomology-mediated end-joining) 型 (数 bp 程度の短い相同性を必要とするタイプ) 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 (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 を同時に欠損させた細胞では、離れた 2 つの Alu 配列間での組換えでしか再連結を行うことができず、この Alu を介した組換え反応が SSA の主要因子である Rad52 に依存していることも明らかにした。

しかし、これらマイナーな修復経路のメカニズムや意義の詳細はいまだ不明である。また、複数の異なる DSB 修復経路が細胞の中でどのように使い分けられているのか、特に、どのような状況下でマイナーな経路が実際に修復に携わるのか、どのように経路選択が制御されているのか等、未解明の重要な課題が数多く残されている。これらを明らかにしていくことは、DSB 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。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。また、独自に構築した 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利用し、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

ヒト細胞を使った逆遺伝学的解析により、マイナーな DSB 修復経路である alt-EJ と SSA の分子機構と細胞内での役割・意義を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

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 (ATPase ドメイン、Polymerase ドメイン及び Polymerase ドメイン中に存在する 3 ヶ所の挿入配列) 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 Pol を安定に発現する細胞株の作製

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 Pol や、アミノ酸を欠失させた Pol をコードする変異型 POLQ cDNA を作製した。これらの各種変異型 POLQ をコードする Super Exon を *LIG4/POLQ* 二重破壊株 (ヒト Nalm-6 細胞由来) POLQ 遺伝子座にノックインすることにより、変異型 Pol を安定に発現する細胞株を作製した。

### (2) ランダム挿入頻度の解析

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* 二重破壊株または各変異型 Pol を安定に発現する細胞株に導入した。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

*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、または各変異型 Pol を安定に発現する細胞株に導入した。遺伝子導入した細胞は増殖培地中で 7 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 (BioDynamics Laboratory Inc.) にサブクローニングし、シークエンス解析により修復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

###### 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

Lig4 と PolQ 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 タンパク質の変異が alt-EJ に及ぼす影響を正確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。また、Polymerase ドメイン中に存在する PolQ にユニークな 3 ヶ所の挿入配列をそれぞれ欠損させた PolQ を発現させた場合において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 ドメインだけでなく PolQ にユニークな 3 ヶ所の挿入配列もそれぞれ必須の機能を果たしていることを示している。

###### 染色体上の DSB 修復における PolQ の各ドメインの重要性

各ドメインの染色体上に生じた DSB の修復における役割を調べるため、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。Lig4 と PolQ 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 を安定に発現する細胞株に DSB を誘発した際の修復効率を調べた。その結果、Polymerase ドメインに変異をもつ PolQ を発現する細胞では、野生型 PolQ を発現する細胞の 1/10 以下の頻度であるものの alt-EJ による修復が起こることがわかった。このことから、染色体上に生じた DSB の修復においては、PolQ の Polymerase 活性は必須ではない可能性が示唆される。しかし、残存する Polymerase 活性に依存した Alt-EJ が起こった可能性も考えられるため、PolQ 阻害剤を用いた実験などにより詳細に解析する必要がある。また、各挿入配列を欠損させた PolQ を発現する細胞においても、低頻度ながら alt-EJ による修復が起こっていた。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) に重要であることが報告されていることから、染色体上に生じた DSB を修復する際には PolQ の TLS 活性が重要な役割を担っている可能性が示唆される。

##### (2) Alu-Alu 組換えのメカニズムの解析

###### Alu-Alu 組換え反応の特徴

上述した通り、Lig4 と PolQ 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。さらに、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 組換えについて網羅的に解析を行った。既報の論文 (Deininger, PL and Batzer MA. Mol. Genet. Metabol. **67**, 183-193, 1999, Belancio VP et al. Seminars in Cancer Biol. **20**, 200-210, 2010, Larsen, PA et al. Chromosome Res. **26**, 93-111, 2018 など) に記載されている 300 以上のジャンクションの配列について、その特徴を調べたところ、隣接する Alu 配列や、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っており、上記の LIG4/POLQ 二重破壊株における Alu-Alu 組換えの特徴と一致していた。このことから、疾患の原因となった Alu-Alu 組換えは、Lig4/PolQ 欠損下において起こる Alu-Alu 組換えと同様の作用機序で起こった可能性が示唆される。

###### Alu-Alu 組換えの制御機構

これまでの私の研究結果から、相同組換えの必須因子である Rad51 を阻害すると、Alu-Alu 組換え頻度が上昇することが明らかになっている。一方、LIG4/POLQ 二重破壊株において SSA の主要因子である Rad52 を欠損させると、Alu-Alu 組換えの頻度が低下したことから、Alu-Alu 組換え反応は SSA に依存していることが示唆される。しかし、Rad52 を欠損しても Alu-Alu 組換えが依然として起こることから、SSA には Rad52 非依存的なサブ経路が存在する可能性がある。そこで、DSB 修復に関与する因子の阻害や発現抑制、またはノックアウトを行い、Alu-Alu 組換え頻度への影響を調べたところ、Alu-Alu 組換えの頻度を低下させる因子が複数見つかった。これらの因子による Alu-Alu 組換えの制御機構は不明であるため、今後、SSA の主要因子である Rad52 との関連 (新たに見つかった因子による SSA 反応が Rad52 依存的であるか) や、既知の SSA 抑制

因子である Msh2 の欠損との関連（新たに見つかった因子と Msh2 を二重欠損させることにより、相加・相乗的に Alu-Alu 組換え頻度が低下するか）を調べる必要があると思われる。

以上述べた通り、本研究によりマイナーな DSB 修復経路である alt-EJ および Alu-Alu 組換え（SSA）の分子機構の一旦を明らかにすることができた。これらの結果は、DSB 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重要な示唆を与えることが期待される。特に、PolQ は乳がんや卵巣がんをはじめとするさまざまな種類のがんで高発現しており、悪性度や予後と深い相関があることが報告されている。PolQ 阻害剤はこうしたがん（特に相同組換え欠損がん）の治療に有効と考えられており、本研究で得られた成果は PolQ 阻害剤の開発において重要な知見になると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------