

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 29 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710053

研究課題名（和文）相同組換え修復の新規制御機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of a new mechanism on homology-dependent repair

研究代表者

加藤 晃弘（KATO AKIHIRO）

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：70423051

研究成果の概要（和文）：DNA 二重鎖切断修復で機能する NBS1 と RAD51 の物理的な相互作用がもつ生物学的な意義を明らかにするため、RAD51 と結合できない変異型 NBS1 の作製を試みた。この過程で RAD51 は MRE11 を介して NBS1 と結合していることが明らかとなった。RAD51 と結合できない変異型 MRE11 は DNA 二重鎖切断の組換え修復能を失っておらず、また放射線感受性も示さなかったことから、NBS1 と RAD51 の相互作用は DNA 二重鎖切断修復ではあまり重要な機能をもたず、別の機構での役割が示唆された。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the biological significance of the physical interaction between NBS1 and RAD51, we tried to establish a NBS1 mutant that was not able to bind to RAD51. In this process, we found that NBS1 interacted with RAD51 through MRE11. The MRE11 mutant that could not interact with RAD51 had full activity of homology-dependent repair of DNA double-strand breaks (DSBs). Cells expressing the MRE11 mutant did not show sensitivity to ionizing radiation. These results indicate that the interaction between NBS1 and RAD51 does not have an important role in DSB repair but has a role in other mechanisms.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線・化学物質影響科学

キーワード：DNA 修復、相同組換え

1. 研究開始当初の背景

放射線は最も重篤な DNA 損傷である DNA 二重鎖切断（DSB）を作るが、これは主に二つの経路、すなわち相同組換え修復（homology-dependent repair: HDR）と非

相同末端結合（NHEJ）によって修復される。NHEJ が突然変異を生じやすい経路であるのに対し、HDR はゲノム情報を維持したまま修復する経路であるため、ゲノム安定性の維持に大きく貢献している。その初期過程ではまず DSB 末端が消化されて一本鎖 DNA

領域が形成され、そこに一本鎖 DNA 結合タンパク質 RPA が結合する。RPA はその後 RAD51 と置き換わり、RAD51 が巻き付いた一本鎖 DNA (ヌクレオプロテインフィラメント) が姉妹染色分体の相同配列に入り込むことで組換えが始まる。HDR の主要因子は RAD51 であり、組換え反応の分子メカニズムについても試験管内アッセイにより詳細に研究されている。しかしながら、DNA 損傷検出機構や損傷シグナル増幅/伝達機構とのつながりについては解析が進んでおらず、上流因子による RAD51 の制御機構は未解決の問題として残されている。

ヒト常染色体劣性遺伝病であるナイミーヘン症候群 (NBS) は、高発がん性、免疫不全、成長遅滞を特徴とし、その患者由来細胞は放射線高感受性やゲノム不安定性を示す。NBS の原因遺伝子産物である NBS1 は、放射線照射後すばやく DSB に集結するため、DNA 損傷初期応答因子とみなされている。NBS 患者細胞では HDR 活性が低いことが示されており、NBS1 が HDR に関与していることが示唆されている。特に、NBS1 はヌクレアーゼである MRE11 と結合することから、HDR の最初のステップである DSB 末端の消化を行っているというモデルが多く、研究者によって提唱されてきた。しかしながら、MRE11 のヌクレアーゼ活性は末端の消化に影響しないという報告もあり、この仮説には疑問も呈されている。また我々の研究結果では、NBS 患者細胞でも RAD51 が DSB 部位に集結することが観察されており、この結果は NBS1 非依存的に RAD51 ヌクレオプロテインフィラメントが形成されている可能性を示唆している。こういった状況から、NBS 細胞での HDR 活性の低下は、組換え反応の初期過程である末端の消化だけでなくその後の過程にも起因しているのではないかと考えられる。

そこで、NBS1 が RAD51 と直接相互作用して RAD51 の働きを制御している可能性を考え、両者の物理的相互作用について調べたところ、両者の結合が明らかとなった (未発表)。この結果は、NBS1 が RAD51 の働きを制御していることを示唆している。NBS 細胞でも RAD51 の損傷部位への集結は観察されるので、この結合はそれぞれ独立に損傷部位に集結した NBS1 と RAD51 との間で起こっていると考えられる。RAD51 が損傷初期応答因子と結合するという報告はこれまで無いため、この新たな発見を手がかりに初期応答から相同組換え修復までのつながりが解明されると期待される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RAD51 と NBS1 が結合

することの生物学的意義を培養細胞レベルで解析し、相同組換え修復における NBS1 の新規機能を解明することにある。NBS1 は初期過程で機能することが明らかにされているが、後期過程での機能は未知であり、NBS1 がどのような機能を持つかを明らかにすることで、相同組換え修復機構の未知の制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

FLAG タグ付き NBS1 をヒト 293E 細胞で発現させ、FLAG 抗体ビーズを用いた免疫沈降を行い、RAD51 が結合するかどうかを RAD51 抗体によるウエスタンブロッティングにより調べる。野生型 NBS1 では RAD51 が結合することがわかっているため、変異型 NBS1 を作製して RAD51 が結合できないような変異を探索することで RAD51 の結合部位を特定した。

続いて、NBS1 が RAD51 と結合できない場合にはどういった表現型になるのかを解析した。RAD51 は相同組換え修復蛋白質であるため、まず GFP レポーターアッセイにより相同組換え修復活性を測定した。また、DSB 修復欠損を示すかどうか調べるため、コロニー形成法により放射線感受性の測定を行った。

4. 研究成果

RAD51 が NBS1 のどこに結合するのかを調べるため、NBS1 の N 末端断片と C 末端断片を作製し、免疫沈降により RAD51 との結合の有無を調べた。その結果、NBS1 の C 末端側に RAD51 が結合することが明らかとなった (図 1)。NBS1 の C 末端には MRE11 が結合することがわかっているため、この領域を欠損した断片でも同様に免疫沈降を行った。その結果、MRE11 結合ドメインを欠失させると (Δ MBD)、MRE11 だけでなく RAD51 の結合もなくなることが明らかとなった (図 1)。この結果から RAD51 は MRE11 を介して NBS1 に結合することが示唆された。

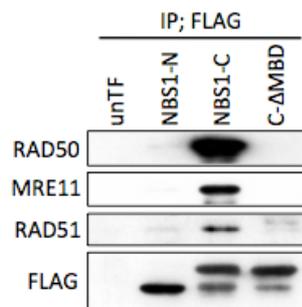


図 1. NBS1 と RAD51 の結合

次に NBS1 の場合と同様に、MRE11 のどこに RAD51 が結合するのかを調べるため、MRE11 の N 末端断片と C 末端断片を作製し、免疫沈降により RAD51 との結合の有無を調べた。その結果、MRE11 の C 末端側に RAD51 が結合することが明らかとなった (図 2)。

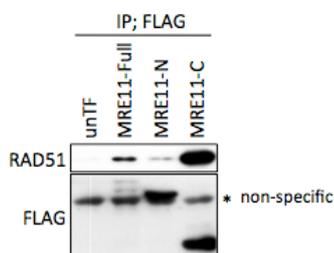


図 2. MRE11 と RAD51 の結合

続いて、異なる領域を欠失させた MRE11 の C 末端断片 R1、R2、R3 を作製し、同様に RAD51 との結合を調べた。その結果 R3 断片でのみ RAD51 との結合がみられなかった (図 3)。この結果から、R3 で欠失している領域が RAD51 との結合に重要であることが示された。R3 では NBS1 と RAD50 との結合は失われていなかったため、RAD51 と MRE11 の結合は NBS1 や RAD50 を介したものではないことが示唆された。

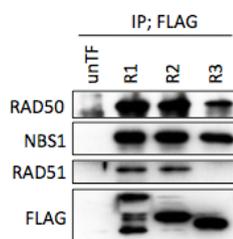


図 3. RAD51 と結合できない MRE11 断片

この領域を欠失したときの相同組換え修復能を調べるため、MRE11 欠損細胞である ATLD 細胞に相同組換え測定 GFP レポーターを導入し、野生型 MRE11 と変異型 MRE11 を発現させた時の修復能を測定した。野生型 MRE11 (WT) を発現させた場合では空ベクター (Ev) 導入時よりも相同組換え修復活性が 2 倍高くなり、変異型 MRE11 ($\Delta 1$ 、 $\Delta 2$) を発現させた場合でもほぼ 2 倍高くなった。この結果から、MRE11 の C 末端側で RAD51 が結合できなくなっても、DSB の相同組換え修復に大きな影響はないことが示された。また、コロニー形成法により放射線感受性を測定したが、変異型 MRE11 発現細胞でも野生型 MRE11 発現細胞と同程度の生存率を示し、高感受性は認められなかった。以上の結果は、MRE11 を介した NBS1 と RAD51 の結合は放射線による DSB の相同組換え修復に重要ではないとい

うことを示している。RAD51 は DSB 修復でも機能するが、複製阻害時の回避機構でも重要な役割を持つことが知られている。NBS1 も同様に複製阻害の回避に必要とされるため、NBS1 と RAD51 との結合は DSB 修復ではなく複製阻害の回避機構で重要な役割を果たしているのかもしれない。今後は複製阻害回避機構の欠損について解析を行うことで NBS1 と RAD51 との相互作用の役割が明らかにされることを期待する。本研究で作製した変異細胞はこういった今後の解析にも有用である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

- 1) Shimada M, Kato A, Habu T, Komatsu K. Genistein, isoflavonoids in soybeans, prevents the formation of excess radiation-induced centrosomes via p21 up-regulation. *Mutation Research*, Volume 716, Number 1-2, p27-32, 2011
査読有り
10.1016/j.mrfmmm.2011.07.017
- 2) Izawa N, Wu W, Sato K, Nishikawa H, Kato A, Boku N, Itoh F, Ohta T. HERC2 Interacts with Claspin and regulates DNA origin firing and replication fork progression. *Cancer Research*, Volume 71, Number 17, p5621-5625, 2011
査読有り
10.1158/0008-5472.CAN-11-0385
- 3) Yanagihara H, Kobayashi J, Tateishi S, Kato A, Matsuura S, Tauchi H, Yamada K, Takezawa J, Sugawara K, Masutani C, Hanaoka F, Weemaes CM, Mori T, Zou L, Komatsu K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol η -dependent translesion DNA synthesis. *Molecular Cell*, Volume 43, Number 5, p788-797, 2011
査読有り
10.1016/j.molcel.2011.07.026
- 4) Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Yanagihara H, Sakamoto S, Oliveira DV, Shimada M, Tauchi H, Suzuki H, Tashiro

S, Zou L, Komatsu K.
Regulation of homologous recombination
by RNF20-dependent H2B ubiquitination.
Molecular Cell, Volume 41, Number 5,
p515-528, 2011
査読有り
10.1016/j.molcel.2011.02.002

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 加藤晃弘
MRN 複合体と RAD51 の相互作用
日本放射線影響学会 第 54 回大会 (神戸
2011 年 11 月 18 日)
- 2) 加藤晃弘
Physical and functional interaction
between MRN complex and RAD51.
第 70 回日本癌学会学術総会 (名古屋 2011
年 10 月 5 日)
- 3) 加藤晃弘
The link between MRN complex and RAD51.
ICRR2011 (ポーランド 2011 年 8 月 30 日)
- 4) 加藤晃弘
MRN 複合体と RAD51 との関係
日本放射線影響学会第 53 回大会 (京都
2010 年 10 月 20 日)
- 5) 加藤晃弘
RAD51 が MRN 複合体に結合する
第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪 2010
年 9 月 24 日)
- 6) 加藤晃弘
Control of homologous recombination by
RNF20-dependent H2B ubiquitination
EMBO workshop 「The Interface between
the Ubiquitin Family and the DNA Damage
Response」 (クロアチア 2010 年 9 月 4 日)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 晃弘 (KATO AKIHIRO)
京都大学・放射線生物研究センター
研究員
研究者番号 : 70423051