

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K18030

研究課題名（和文）MRE11の新機能に着目したMRNの動的構造解析

研究課題名（英文）Elucidation of novel function of MRE11

研究代表者

清水 直登（Shimizu, Naoto）

広島大学・統合生命科学研究科（理）・助教

研究者番号：10911589

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）：TK6細胞において、MRE11ヌクレアーゼは、5'末端の削り込み反応以降に形成される組換え中間体の解消に重要な役割を果たしていることがわかった。相同組換え進行を調べるために、MRE11を条件的に欠損（MRE11-/-）あるいはヌクレアーゼ活性欠損（MRE11-/H129N）することが可能なヒトTK6細胞を使い、RAD51 fociの免疫染色と染色体分析を行った。これらの結果からMRE11ヌクレアーゼは、5'末端の削り込み反応以降に形成される組換え中間体の解消に重要であると結論づけた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、MRE11によるJM構造の解消を一分子レベルで可視化することができれば、JM構造解消機構を詳細に調べられる。JM構造解消機構を明らかにすることは、がんや一部の遺伝病の発症機構の解明に貢献する。

研究成果の概要（英文）：I find that the MRE11 nuclease promotes homologous recombination not only in DNA double-strand break resection but also in post-resection in human TK6 cells. To investigate the mechanism of homologous recombination, I performed immune-staining and chromosome analysis using MRE11-null (MRE11-/-) mutant cells and nuclease-deficient (MRE11-/H129N) cells derived from the human TK6 cell line. The results show the nuclease activity of MRE11 promote the resolution of homologous recombination intermediate.

研究分野：DNA損傷修復

キーワード：MRE11 相同組換え DNA修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖切断 (DSB) は、1 つでも発生後一定時間再結合されないまま残ると細胞自殺を起こす。DSB の発生が放射線治療の作用機序である。DSB は、非相同末端結合経路と相同組換え経路によって修復 (再結合) される。非相同末端経路は、細胞周期を通じて DSB 修復を行うのに対し、相同組換え経路は S/G₂ 期で活性化する。相同組換え欠損細胞では、放射線に超感受性を示すことから、DSB 修復における相同組換えの役割は極めて大きい。相同組換えの修復効率は、放射線の治療効果を決定する。相同組換えは、DSB 端の 5' 末端からヌクレアーゼによる削り込みを受けると開始される (図 1A,B)。削り込みによってできる 3' 末端が突出した一本鎖 DNA は、RAD51 蛋白質依存的に姉妹染色分体の相同領域に侵入する (図 1C,D)。侵入した一本鎖 DNA の 3' 末端から DNA 合成が起こる。DNA 合成後、DNA 四本鎖からなる組換え中間体、Joint Molecule (JM) 構造が生じる (図 1E)。この JM 構造は、GEN1 ヌクレアーゼなどによって切断され、相同組換えが完結する (図 1F)。MRE11 ヌクレアーゼは、相同組換え修復の初期反応である DSB 切断端の 5' 末端の削り込み反応に関与する (図 1B)。申請者は、TK6 細胞において、MRE11 ヌクレアーゼは、5' 末端の削り込み反応以降に形成される JM 構造の解消 (図 1E) にも重要な役割を果たしていることを明らかにした。しかし、MRE11 ヌクレアーゼが JM 構造を解消する分子機構は不明である。

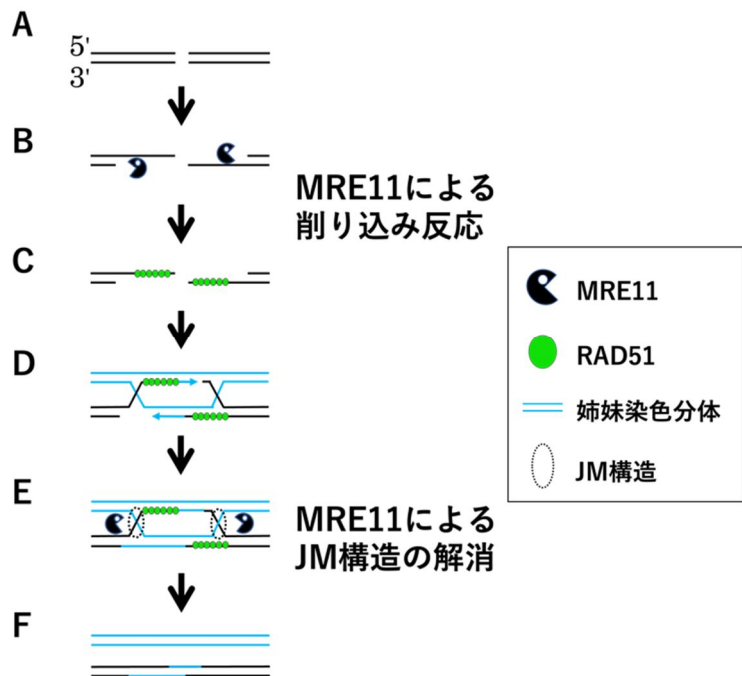


図 1 MRE11 による JM 構造の解消機構の解明

2. 研究の目的

MRE11 ヌクレアーゼが JM 構造を解消する分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでに多くの変異が、ヒト MRE11 で見つかった。見つかった MRE11 の変異は、疾患を引き起こすことがある。例えば、243 番目のアミノ酸がトリプトファンからアルギニンに変異すると、毛細血管拡張性運動失調様症候群を引き起こす。この疾患は、免疫系や神経系に障害を起こす難病である。243 番目のアミノ酸をアルギニンに置換した MRE11 (*MRE11*^{W243R/W243R}) を発現する TK6 細胞を作り、これまで同様に RAD51 foci の免疫染色や染色体分析を行い、相同組換え過程における影響を調べていく。また、野生型ヒト MRN および MRE11 の 243 番目のアミノ酸をアルギニンに置換したヒト MRN タンパク質を精製する。この精製したタンパク質とモデル DNA を用いて、MRE11 変異体による相同組換え中間体の解消を生化学と高速原子間力顕微鏡 (HS-AFM) を用いた一分子レベルの可視化解析を統合的に行い調べる。MRN がどのような構造変化によって JM 構造を解消するのかが分かると同時に、2 分子の MRE11 が協調して、JM 構造を解消するのかも可視化を通して明らかにする。

4. 研究成果

TK6 細胞において、MRE11 ヌクレアーゼは、5' 末端の削り込み反応以降に形成される組換え中間体の解消に重要な役割を果たしていることがわかった。相同組換え進行を調べるために、MRE11 を条件的に欠損 (*MRE11*^{-/-}) あるいはヌクレアーゼ活性欠損 (*MRE11*^{-/H129N}) することが可能なヒト TK6 細胞を使い、DSB 発生に応答して形成される RAD51 foci の経時変化を調べた。RAD51 は、姉妹染色分体の相同領域に侵入する反応に必須であり、相同組換え進行を解析する分子マーカーである。*MRE11*^{-/-} 及び *MRE11*^{-/H129N} 細胞は、放射線照射後、RAD51 foci 形成が野生型細胞と同程度であった (図 2,3)。一方で、これらの細胞では、RAD51 foci

消失が遅れた(図 3)。これらのことは、5'末端の削り込み反応以降の相同組換え過程に MRE11 が重要な機能を担っていることを意味している。また、*MRE11*^{-/-} 及び *MRE11*^{-H129N} 細胞では、野生型に比べ、相同組換え中間体(JM 構造)である Iso-chromatid break が顕著に増加した(図 4)。GEN1ヌクレアーゼの過剰発現によって、放射線照射によって増加した Iso-chromatid break 形成が抑制された(図 4)。このことから、TK6 細胞において、MRE11ヌクレアーゼは、5'末端の削り込み反応以降に形成される組換え中間体の解消に重要な役割を果たしている。

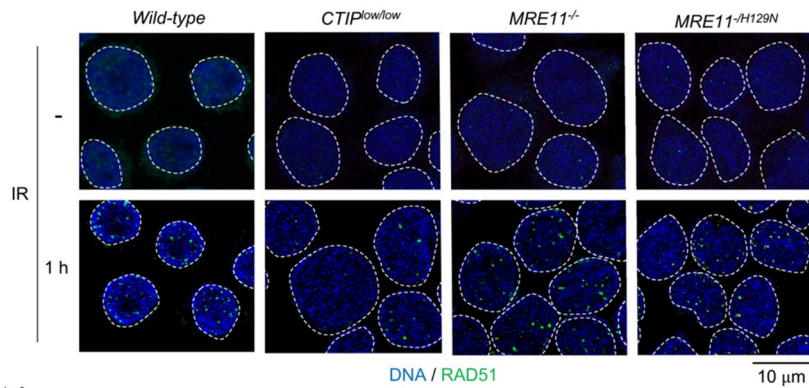


図 2 各細胞の放射線照射前と照射後 1 時間の RAD51 foci

RAD51 foci 形成に関して、*MRE11*^{-/-} 及び *MRE11*^{-H129N} 細胞は、放射線照射後、野生型細胞と同程度である。

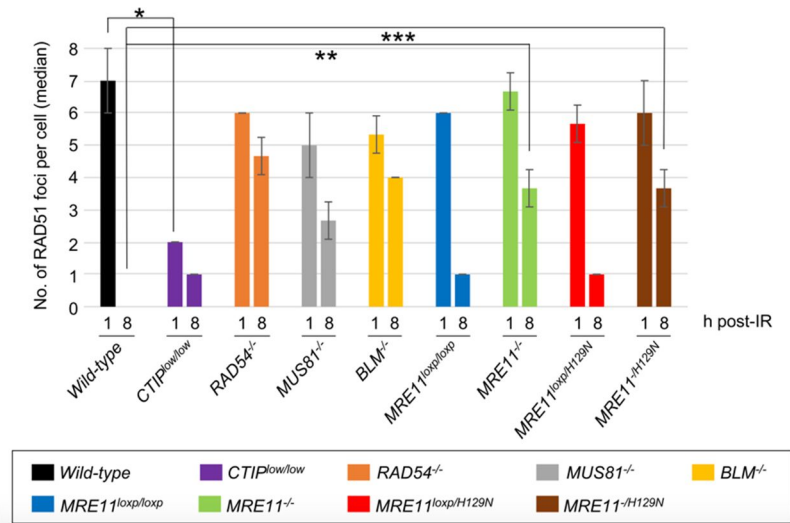


図 3 各細胞の放射線照射後 1 時間と 8 時間の RAD51 foci 数

RAD51 foci 形成に関して、*MRE11*^{-/-} 及び *MRE11*^{-H129N} 細胞は、放射線照射後、野生型細胞と同程度である。一方で、RAD51 foci 消失に関しては野生型細胞より遅れている。

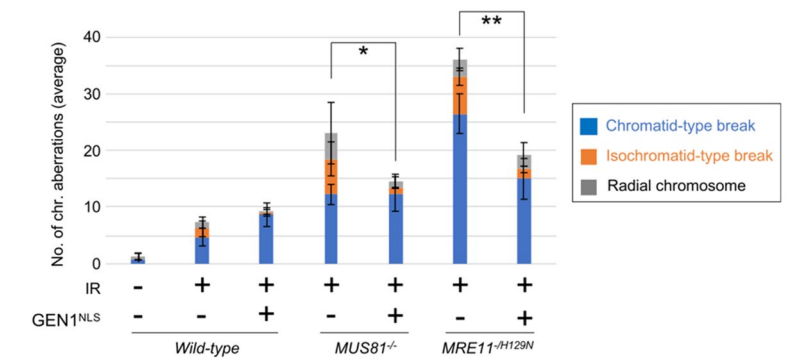


図 4 細胞内で MRE11 のヌクレアーゼ活性は JM 構造の解消を行う。

5．主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 3件）

1．発表者名 津田雅貴，濱田優作，清水直登
2．発表標題 相同組換え中間体解消における動的変化の可視化
3．学会等名 第46回日本分子生物学会年会（国際学会）
4．発表年 2023年

1．発表者名 津田雅貴，清水直登
2．発表標題 相同組換え中間体解消における動的変化を可視化する技術の開発
3．学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会（国際学会）
4．発表年 2023年

1．発表者名 津田雅貴，濱田優作，清水直登
2．発表標題 相同組換え中間体解消における動的変化を可視化する技術の開発
3．学会等名 日本放射線影響学会第66回大会（国際学会）
4．発表年 2023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
---------	---------