

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 4月 8日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2012～2013

課題番号：23770208

研究課題名（和文） ダメージを受けた DNA 複製フォークの修復機構の解明

研究課題名（英文） Investigation of the restart mechanisms of stalled DNA replication forks.

研究代表者

花田 克浩（HANADA KATSUHIRO）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90581009

研究成果の概要（和文）：中断した DNA 複製フォークを再開させる修復機構のメカニズムを明らかにすることを目的として研究を行った。過去に MUS81 構造特異的エンドヌクレアーゼがこの修復に関与していることを明らかにしたので、MUS81 制御機構の解明を目指した。その結果、MUS81 の活性と同調して、ATR 依存のダメージ応答と ATM 依存のダメージ応答が起きていることが明らかになった。さらに、MUS81 とは独立に機能する因子のスクリーニングを行い、いくつかの因子を発見した。現在は、その確認作業を行っている。

研究成果の概要（英文）：Precise DNA replication is important for all organism. If DNA replication does not complete properly, these organisms cannot maintain their cellular metabolisms. Since DNA replication stalls by DNA damages causes of incomplete DNA replication, all organisms provide the repair of stalled DNA replication forks. Here we addressed to understand the mechanisms of stalled DNA replication forks in mammalian cells. We previously showed that the MUS81-structure specific endonuclease is involved in the repair of stalled replication forks. Therefore, we first investigated how MUS81 is regulated in DNA damage networks. Expectedly, ATR-dependent damage responses occur at first. Then MUS81-dependent DNA breakages were introduced. Following this, ATM-dependent responses occurred. This network is important to encourage the repair of stalled forks. In addition, we have done the screening of MUS81-independent pathways and found several candidates. We are now characterizing the biochemical functions of these candidate factors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：DNA 損傷・修復

## 1. 研究開始当初の背景

正確な遺伝情報を次世代に伝えるため、DNA 複製におけるエラーを排除するメカニズムは非常に重要である。それ故に、すべての生物種において複数の DNA 修復機構が備わっている。近年の研究の成果により、各々の遺

伝子修復のメカニズムが明らかにされつつあるが、DNA ダメージによって「中断した DNA 複製の再開機構」のメカニズムは、未だほとんど明らかになっていない。

これまでの我々、および、他のグループの研究により、停止した DNA 複製再開には、相同組換えの機能が必須であることが明らか

になっている。相同組換え以外にも、DNA 複製の停止を認識する DNA ダメージ応答関連因子の機能が重要で、特に ATR キナーゼや CHK1 キナーゼなどは、細胞周期を一時的に停止するチェックポイントを誘発し、DNA 修復が円滑に遂行される場を提供する役割を担っている。近年、ATR や CHK1 は細胞周期の制御因子だけでなく、DNA 修復の酵素やその制御因子を活性化していることが明らかになってきた。そこで、本研究課題では、ATR や CHK1 によりリン酸化されている因子を解析し、その中から、DNA 複製の再開に関与しているものを抽出して分子生物学的解析を行いたいと考えている。

## 2. 研究の目的

正確な DNA 複製はすべて分裂細胞にとって必須である。しかしながら、我々の細胞は、常時、遺伝毒素に曝露されており、その有害物質による DNA ダメージが、DNA 複製阻害の原因となっている。DNA 複製が正確に完結しないと、遺伝子の情報の一部が失われ、細胞分裂後の娘細胞は正常な機能を発揮できなくなる。ゆえに全ての細胞に『中断した DNA 複製フォークを再開させる修復機構』が備わっている。この修復機構は、停止した複製フォークの認識から始まり、DNA ダメージを取り除く DNA 修復、DNA 複製フォークを再開させる相同組換えなどの複雑な連携プレーによって達成されることが明らかになりつつある。本研究では、DNA 複製の再スタートに関わる DNA 代謝系の同定を行い、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

中断した DNA 複製を再開させるために必要な DNA 修復の全容解明のために2つの段階を想定している。まず、第1段階は、DNA 複製が停止したことを感知して、DNA 修復系を活性化するシグナル伝達系の解析である。中断した DNA 複製の修復は、DNA ダメージ応答や細胞周期のチェックポイントと連動している可能性が高いので、その点を念頭において解析を行う。第2段階は、DNA ダメージ応答がどのように相同組換えを活性化して、中断した複製部位の修復を行うか、その分子メカニズムの解明を行う。ここでは、DNA ダメージ応答のメッセンジャーと考えられている FANC タンパク質の機能に注目して、FANC タンパク質が制御している因子の解析を中心に研究を行う。

### (1)細胞周期のチェックポイントと DNA 複製再開機構の解析

細胞周期のチェックポイントのうち DNA 複製異常に対して応答する ATR や CHK1 の下流で機能している DNA 修復経路を同定する。複製を阻害する効果があるヒドロキシウレアやマイトマイシンC処理を行い、リン酸化されたタンパク質を検出する。

### (2)FANC タンパク質による DNA 複製の修復機構の解析

DNA 複製フォーク修復経路において、MUS81-EME1 を介した経路以外の因子として、Fanconi 貧血症の原因遺伝子群の遺伝子産物が同定されている。DNA ダメージ応答のメッセンジャーである FANCD2 が含まれることから、FANCD2 が MUS81-EME1 の活性制御を行うかどうか詳細に解析する。MUS81-EME1 タンパク質および FANCD2 タンパク質を精製し、FANCD2 タンパク質が MUS81-EME1 のヌクレアーゼ活性を活性化するかかどうか決定する。

### (3)MUS81 に依存しない経路の同定

MUS81 遺伝子変異細胞株と siRNA ライブラリーを用いて合成致死スクリーニングを行い、合成致死を示した遺伝子産物の機能を解析する。大腸がん細胞株 HTC116 およびその MUS81 変異株の双方に siRNA をトランスフェクションして MUS81 変異株のみ致死になるクローンをスクリーニングする。

## 4. 研究成果

### (1)細胞周期のチェックポイントと DNA 複製再開機構の解析に関する研究成果

DNA 複製異常のチェックポイント機構である ATR や CHK1 に依存する DNA ダメージ応答を検出するために、DNA 複製阻害効果があるマイトマイシンC処理を行い、各タンパク質の活性化状態をウェスタンブロットで解析した。その結果、DNA 複製阻害により生じる CHK1 や RAD17 のリン酸化がまず見られた (図1)。その後 DNA の2重鎖切断により ATM からリン酸化される CHK2 のゲルシフトも検出できた。しかし、CHK2 のリン酸下は CHK1 より遅れて起きることも明らかになった (図1)。さらに、1本鎖あるいは2本鎖を問わず DNA 切断によりリン酸化されるヒストン H2AX ( $\gamma$ -H2AX) のリン酸化も見られた。DNA の2重鎖切断のみを検出するパルスフィールド電気泳動を行い、2重鎖切断が生じるタイミングを解析したところ、パルスフィールド電気泳動で出現する2重鎖切断と $\gamma$ -H2AX の出

現のタイミングが同じであることから、ここでの $\gamma$ -H2AX 形成は、2重鎖切断を反映していると考えられる。この実験から明らかになったことは、DNA複製を阻害するDNAダメージが存在した場合、まず、ATR (CHK1) 依存のDNAダメージ応答がおきる (CHK1 および RAD17 のリン酸化)。その後、MUS81 依存のDNA切断が生じる。最終段階として、ATM (CHK2) 由来のDNAダメージ応答が起きることが明らかになった (CHK2 のリン酸化)。ATM と ATR の活性化状態は共同研究者の Storgaard Sørensen らのグループが解析し、私も共著者として報告している (Fugger et al. 2013. 下記参照)。

次に、ATR の下流で機能している DNA 修復タ

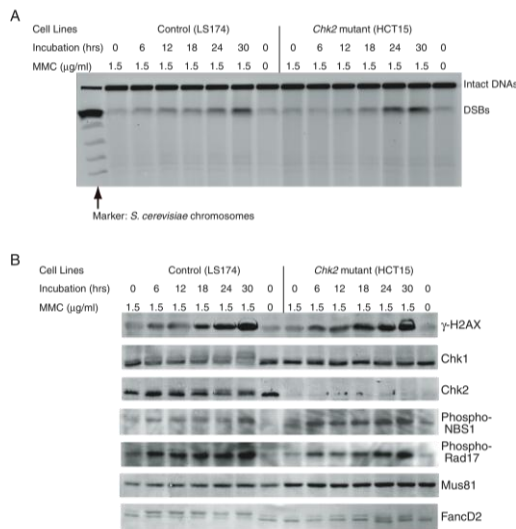


図1. マイトマイシン C 処理後の2重鎖切断とDNAダメージ応答。(A) マイトマイシン C により誘発される2重鎖切断をパルスフィールド電気泳動で解析した結果。(B) マイトマイシン C 処理後に起きるDNAダメージ応答をウエスタンブロットで解析した結果。

ンパク質の同定を試みた。プロテオミクスの手法では候補因子を絞り込むことができなかったため、酵母の遺伝学より予想された因子の解析に変更した。その結果、FBH1 タンパク質がこの修復系に関与する可能性を見出した。FBH1 は相同組換えを負に制御するDNAヘリカーゼあるいはトランスロケースとして機能する酵素であるが、細胞内でどのような代謝に関与しているか明らかになっていなかった。そこで、FBH1 の変異株を作成して解析を行ったところ、FBH1 は MUS81-EME1 と同じ経路で、DNAダメージにより中断したDNA複製フォークを切断することが明らかになった。このことは Storgaard Sørensen らと共同で発表した (Fugger et al. 2013. 下記

参照)。

## (2) FANCD2 タンパク質によるDNA複製の修復機構の解析

上記のDNAダメージ応答の研究から、FANCD2 タンパク質もDNA複製阻害時に活性化していることが明らかになった (図1)。FANCD2 はDNAダメージ応答のメッセンジャーと考えられていることから、FANCD2 が MUS81-EME1 の活性を直接活性化する可能性が考えられた。そこで、これらのタンパク質を精製して、in vitro で MUS81-EME1 のヌクレアーゼ活性テストを行った。

精製したタンパク質を混合して、in vitro で MUS81 の活性を測定した。しかしながら、FANCD2 が MUS81 の活性を促進するという結果は得られなかった (図2)。この実験から、MUS81 の活性化に FANCD2 が関与しているわけではないということが考えられる。

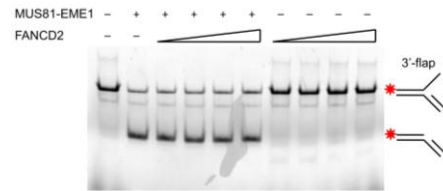


図3. MUS81-EME1 によるDNA切断活性の結果. 2 mM MgCl<sub>2</sub> の存在下で、10 分間 37°C で反応させた。

## (3) MUS81 に依存しない経路の同定

大腸がん細胞株 HTC116 およびその MUS81 変異株の双方に siRNA をトランスフェクションして MUS81 変異株のみ致死になるクローンをスクリーニングした。トランスフェクション後 24 時間の時点からピューロマイシンを添加し選択を行った。1週間程度培養した後、MUS81 変異株でコロニーの形成能が低くなった遺伝子を検索した。その結果、いくつかの候補遺伝子が見つかった。現在、その候補遺伝子の確認作業を行っているところである。

## 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1件)

1. Fugger K, Chu WK, Haahr P, Nedergaard Kousholt A, Beck H, Payne MJ, Hanada K, Hickson ID, Storgaard Sørensen C. (2013) FBH1 co-operates with MUS81 in

inducing DNA double-strand breaks and cell death following replication stress. *Nature Commun.* 4: 1423. 査読あり

〔学会発表〕（計0件）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

花田 克浩 (HANADA KATSUHIRO)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90581009

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし