

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：17501

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25710010

研究課題名(和文) DNA複製フォークの修復機構におけるMUS81とRecQの機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of DNA replication restart mediated by MUS81-EME1 structure-specific endonuclease, RecQ helicases, and others.

研究代表者

花田 克浩 (HANADA, Katsuhiko)

大分大学・医学部・助教

研究者番号：90581009

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 19,900,000円

研究成果の概要(和文)：日常生活の中にはDNA複製を阻害する多くの要因が存在し、それに対処するためにDNA複製の修復機構が存在する。本研究はDNA複製の修復機構のメカニズムを解明することを目標として研究を行った。我々は、MUS81-EME1ヌクレアーゼが中断した複製フォークを切断することで2重鎖切断を導入することと、その機能が相同組換えタンパク質(RAD51やRAD54)誘導することでDNA複製の修復が起きていることを明らかにしたが、それに関わる新しい因子としてFBH1を発見し、その機能解析を行った。我々の解析から、FBH1はRAD51の機能を制御することでDNA複製の修復機構に貢献することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In our daily life, various DNA stresses inhibit the progression of DNA replications. Remained unreplicated regions on chromosomes often cause chromosomal instabilities. Therefore, the repair of stalled DNA replication is crucial for maintenance of genome integrity. Previously, we have shown that MUS81-EME1 structure-specific endonuclease is involved in the restart mechanism. Here we have identified a new factor involved in the restart mechanism of DNA replication. FBH1 is the DNA helicase in which contains the F-box domain. DNA unwinding activity of FBH1 encouraged the dissociation of RAD51 from DNAs, and the F-box domain of FBH1 was required for the ubiquitin ligase activity. Indeed, FBH1 was involved in the ubiquitination of RAD51. Here we report the new functions of FBH1, contributing the restart mechanism of DNA replication.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：ゲノム不安定性 DNA修復 組換え

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の細胞は、単に細胞数を増やすだけでなく、役割が異なる細胞に分化し、組織を構成する。この細胞増殖と分化は遺伝子発現レベルで制御されていることから、遺伝子の情報は受精後から死を迎えるまで正確に伝達される必要がある。しかしながら、我々の細胞は常時 DNA ストレスを受けており、それにより DNA 複製が中断することがある。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。それを回避するために、全ての種の細胞で『中断した DNA 複製フォークの修復機構』が備わっている。しかし、哺乳類細胞(真核生物)においては、そのメカニズムの全容は解明されていない。

近年、我々は、MUS81-EME1 ヌクレアーゼが DNA ダメージにより中断した複製フォークを切断することで二重鎖切断を導入することと、MUS81-EME1 自身が相同組換えに関与するタンパク質 (RAD51 や RAD54) と結合すること介して相同組換えを DNA 切断部位に呼び込むことを明らかにし、報告した (Hanada et al. EMBO J. 2006; Nature Struct Mol Biol. 2007)。この機能は染色体の安定維持に重要な機構であることも明らかになっている。しかし、二重鎖切断は染色体にとって非常に危険な状態である。二重鎖切断は染色体異常の原因となるからである。我々は、MUS81-EME1 の活性は精密に制御されていると考え、その因子を探索したところ、ファンコーニ貧血症 (Fanconi anemia) の原因遺伝子が MUS81-EME1 と相互作用することを発見した。ファンコーニ貧血症は、先天性の再生不良生貧血で、貧血に加え、高頻度に癌を発症する。しかし、その病態メカニズムが明らかになっていない。ファンコーニ貧血症の原因遺伝子は多数知られており、FANCA, B, C, E, F, G, L, M が FANCD2 と FANCI をユビキチン化して形成し、FANCD2 と FANCI をユビキチン化する。ユビキチン化された FANCD2 や FANCI は伝達物質として機能し、下流の DNA 修復を活性化する。その 1 つが相同組換えである。相同組換えは DNA の二重鎖切断修復や中断した DNA 複製の修復を行う必要がある。

MUS81-EME1 以外に DNA 複製の修復を行う因子として、染色体不安定性を示す遺伝病で

あるブルーム症候群の原因遺伝子 *BLM* や、染色体不安定性に加え若年性老化症を示すウェルナー症候群の原因遺伝子 *WRN* が知られている。*BLM* や *WRN* は、ヒトでは 5 つある *RecQ* 遺伝子ファミリーに属する。両患者とも DNA 複製に関連した DNA 障害により、染色体が不安定で、癌を高発症する。しかし、これらの分子が関与する DNA 修復のメカニズムについては未だ不明な点が多い。近年、*BLM* は FANCD2 タンパク質の制御を受けていると報告された。しかし、その他の因子については詳細な知見はない。DNA 複製の再開機構に関しては、まだ多くの未同定の因子が関与することが予想されており、それらを明らかにすることで、DNA 複製の再開機構を解明することが可能となる。

2. 研究の目的

DNA 複製の修復に関する‘経路選択’のメカニズムの解明を目的として研究を行う。研究開始当初は、*FANCD2* 遺伝子と *RecQ* 遺伝子や MUS81-EME1 の関連性を明らかにし、DNA 複製の再開機構に選択される経路選択のメカニズムを解明することを第 1 の目標と設定した。しかし、この分野の世界的な競争が非常に激しく、MUS81-EME1 と *RecQ* や FANCD2 との関連性に関しては世界の競争研究室との競争に負けてしまった。そこで、研究期間の中盤以降は、DNA 複製の再開機構に関わる新規の因子の探索とその機能解析に集中した。DNA 複製の再開機構は *RecQ*、FANCD2、MUS81-EME1 だけで全容を説明することはできず、未だ同定されていない多くの因子が存在すると想定されている。そこで、我々は、合成致死スクリーニングや酵母の遺伝学研究を参考としたスクリーニングなどで DNA 複製の再開に関連する新規の因子を探索し、その因子の機能を解析することにした。

3. 研究の方法

MUS81-EME1 の活性化因子の探索

MUS81-EME1 の活性を細胞レベルおよび分子レベルで解析する。

- (1) ヒト培養細胞において、抗癌剤マイトマイシン C (MMC) やヒドロキシウレア (HU) 処理後に起きる DNA 二重鎖切断をパルスフ

フィールド電気泳動で検証する。

- (2) MUS81-EME1の制御に関わっていると考えられるタンパク質を精製し、実際にMUS81-EME1のDNA切断活性を制御するか試験管内のDNA切断検出系で解析する。

DNA複製の再開機構の解明

- (1) *MUS81* 変異株やその他の変異株などを用いて、DNA切断活性をパルスフィールド電気泳動で解析する。
- (2) DNA複製の再開機構に関しては、DNAファイバー法による解析を行う。まず、IdU処理を行い、その後、ヒドロキシウレアでDNA複製を停止させる。DNA複製が停止した後、CldUを入れ複製の再開効率を検証する。
- (3) DNA複製の再開に関して、新規の経路を同定するために、既知の経路に関わる因子の変異株と合成致死となる変異株の探索を行う。*MUS81* 変異株、*FANCD2* 変異株、コントロール株に siRNA ベクターをトランスフェクションして *MUS81* 変異株、*FANCD2* 変異株と合成致死を示す遺伝子を探索する。siRNA のベクターにはピューロマイシン耐性遺伝子を導入している。ピューロマイシンは速やかに細胞を死滅させるので、トランスフェクションが成功していない細胞は排除できる。1~2週間程度培養して野生型細胞株+siRNA ベクターでは細胞が生育し、*MUS81* 変異株や *FANCD2* 変異株 siRNA ベクターでは死滅するという形質を示す遺伝子を探索する。
- (4) 上記のスクリーニングで選定された遺伝子や、酵母の遺伝学的研究からDNA複製フォークの再開に関与することが示唆されている遺伝子に関して、その変異細胞株を作成し、その変異細胞株の表現型の解析を行う。パルスフィールド電気泳動で、DNA切断の蓄積状況を解析するほか、免疫染色DNA複製修復に関わる因子の状態を解析する。

4. 研究成果

MUS81-EME1の活性制御に関する解析

MUS81-EME1のヌクレアーゼ活性を制御する因子を同定するために、可能性がある因子を精製し、MUS81-EME1のヌクレアーゼ活性に

対する制御作用の評価を行った。基質として、3'末端側に1本鎖のDNA末端を持つ3'-flap構造のものを用いた。我々は、以前の科研費研究(若手研究B 課題番号23770208 課題名:ダメージを受けたDNA複製フォークの修復機構の解明)において、FANCD2がMUS81-EME1を制御するかどうかを検証し、その結果を報告しているが(論文未発表)、それと同様の手法を用いて、検証実験を行った。その結果、試験管内でのヌクレアーゼ活性においては、RAD54とRAD54BがMUS81-EME1のヌクレアーゼ活性を阻害する可能性を示唆する実験結果を得ることができた(図1)。

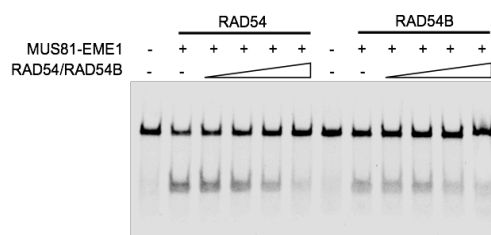


図1 MUS81-EME1のヌクレアーゼ活性に対するRAD54とRAD54Bの効果。3'-flap構造の基質に対して、精製したMUS81-EME1タンパク質とRAD54タンパク質、または、RAD54Bタンパク質を添加し、15分間反応させ、3'-flap構造の切断活性を電気泳動で解析した。上段のバンドが3'-flap、下段のバンドが切断産物である。

実際、我々は、過去の研究で、MUS81とRAD54が免疫共沈により、共沈されてくることから、同一の複合体内に存在することを報告している(Hanada et al. EMBO J. 2006)。図1の結果は、RAD54やRAD54BがMUS81-EME1の活性を抑制的に制御する可能性を示唆している。この点に関して、より断定的な結論を導くため、細胞レベルでRAD54、RAD54BとMUS81-EME1の活性との関連性を解析するとにした。我々はMUS81-EME1の細胞レベルでの活性を検出する手段として、パルスフィールド電気泳動が有効であることを発見し、報告している(Hanada et al, EMBO J, 2006, & Nature Stuc Mol Biol, 2007)。*Rad54* 遺伝子、*Rad54b* 遺伝子、*Rad54* 遺伝子と *Rad54b* 遺伝子の両方を欠損した二重変異を持つマウスES細胞株を用いて、MMC処理およびHU処理後の切断DNA断片を解析したところ、*Rad54* 変異株、*Rad54b* 変異株、*Rad54 Rad54b* 二重

変異株のいずれにおいても二重鎖切断の蓄積が増加するという結果は得られなかった (図 2)。したがって、RAD54 や RAD54B が MUS81-EME1 の活性を抑制的に制御すると提唱できないことが分かった。この点に関しては、今後も検証を重ね、RAD54、RAD54B と MUS81-EME1 との相互作用の生物学的な役割を解明したいと考えている。

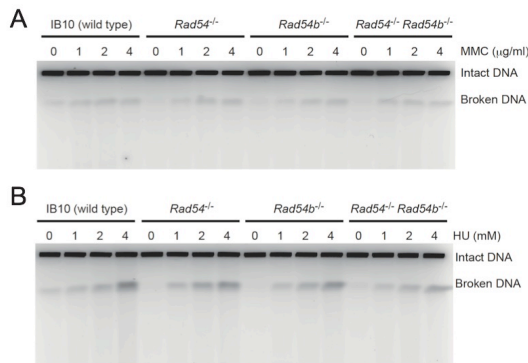


図 2. *Rad54*, *Rad54b*, *Rad54 Rad54b* 二重変異細胞株における二重鎖切断の検出. 二重鎖切断はパルスフィールド電気泳動を用いて検出した. (A) MMC 処理後に誘発される二重鎖切断. (B) HU 処理後に誘発される二重鎖切断.

DNA 複製フォークの再開機構の解析

これまでの研究から、MUS81-EME1 と RecQ の 1 つである WRN (ウェルナー症候群原因遺伝子) は、独立に DNA 複製フォークの再開に関与することが提唱されている (Franchitto A et al. J Cell Biol, 2008)。そこで、本研究では、別の RecQ 遺伝子である BLM (ブルーム症候群原因遺伝子) と MUS81-EME1 との関連性について検証を試みた。ブルーム症候群の患者由来細胞では、姉妹染色体間交叉 (Sister Chromatic Exchange: SCE) が上昇していることから、SCE の原因の 1 つと考えられている DNA の二重鎖切断の量が増加していることが考えられた。そこで、*BLM* 変異細胞での DNA 二重鎖切断の蓄積状態をパルスフィールド電気泳動で解析した。その結果、*Blm* 遺伝子に変異がある ES 細胞においては、DNA 二重鎖切断の蓄積については野生株と同等であることが明らかになった (図 3)。この結果は、*BLM* 遺伝子の有無は二重鎖切断の蓄積量に相関がないことを示唆している。一方、過去の報告では、*BLM* が MUS81-EME1 のヌクレアーゼ活性を促進するという報告があった

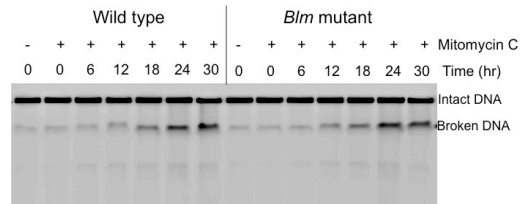


図 3. *Blm* 変異細胞株における MMC 処理後の二重鎖切断の検出. 二重鎖切断はパルスフィールド電気泳動を用いて検出した.

が (Zhang et al, Cancer Research, 2005)、これに関しては、細胞および試験管内の検出系の両方において再現できなかった。これらの実験結果から、我々は、MUS81-EME1 と BLM は独立に作用するのではないかと考えた。しかし、全く同じ内容の研究がカナダのグループより報告された (El Ghamrasni, S et al. Cancer Research, 2015)。彼らの論文では、MUS81 と BLM は独立に染色体の維持に関与すること、その両方の遺伝子に変異があるノックアウトマウスではそれぞれの単独の変異では見られない発育不全や生殖機能低下などが見られるようになるといったことが報告されている。この研究は、明らかに MUS81-EME1 と BLM が独立に作用していることを示すものであり、我々が目指していた研究そのものであった。競争に負けてしまったので、この点に関してさらに追求することを止め、BLM とは別の因子を探索することを研究の中心と再設定し、その研究に集中した。

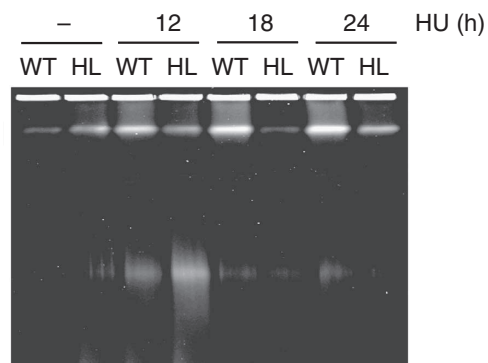


図 4. *Fbh1* 遺伝子の変異 (ヘリカーゼドメインの欠失株) を用いた DNA 切断の検出. WT: 野生型 ES 細胞, HL: *Fbh1* 遺伝子の変異 ES 細胞 (ヘリカーゼドメインの欠失株) を示す. DNA 切断はパルスフィールド電気泳動を用いて検出した. 図は Fugger K et al, (2013) Nature Commun, 4, 1423 より改変.

合成致死スクリーニングや、酵母での研究成果をもとにしたスクリーニングから、FBH1 が DNA 複製の再開機構に関与していることを発見した。我々は、*Fbh1* 遺伝子を破壊した ES 細胞株を樹立し、HU 処理後の DNA 切断の検出を行った。その結果、*Fbh1* 変異株では、HU 処理後の二重鎖切断の蓄積が減少することを発見した (図 4)。

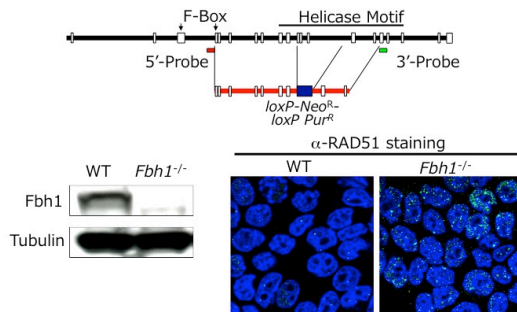


図 5. *Fbh1* 変異株の作成と RAD51 の核内局在の解析. ジーンターゲティング法により、マウス ES 細胞で *Fbh1* 遺伝子の改変を行った。その後、RAD51 に対する抗体で免疫染色を行い、RAD51 の核内局在を、蛍光顕微鏡を用いて解析した。図は、Simandlova J et al, (2013) *J Biol Chem*, 288, 34168-34180 より改変。

FBH1 は、ユビキチンリガーゼの E3 サブユニットに保存されている F-box ドメインとヘリカーゼドメインを持った酵素である。我々は、DNA 複製の再開機構における FBH1 の機能を解析すると同時に、FBH1 が持つドメインがどのような役割を担っているのか、生化学的な検証も行った。

まず、FBH1 タンパク質を精製して、その活性を解析したところ、FBH1 のヘリカーゼとしての活性が RAD51 を DNA から解離させることを誘導する働きを示すことを発見した (Simandlova, *J Biol Chem*, 2013)。この点に関する細胞レベルでの検証を行うために、ヘリカーゼドメインを欠失するように設計したジーンターゲティングベクターを作成して *Fbh1* 遺伝子を破壊した ES 細胞を作成し、その表現型を解析した。その結果、*Fbh1* 変異株では、RAD51 の核内の局在が増加することが認められた (図 5)。このことは、FBH1 が細胞内で RAD51 の DNA 結合に対して抑制的に作用していることを示唆している。以上の解析から、我々は、FBH1 のヘリカーゼ活性は、RAD51 の DNA からの解離に関わっていると結論づけることができた。

次に、FBH1 の F-box ドメインに関する解析

を行った。F-box タンパク質は SKP1、CUL1、ROC1 と共にユビキチンリガーゼの E3 サブユニットを形成することが知られている。そこで、FBH1 を組み込んだバキュロウイルスと共に、SKP1、CUL1、ROC1 を組み込んだウイルスを同時感染させ、FBH1-SKP1-CUL1-ROC1 複合体を発現させ、その精製を行った。我々は、この複合体の精製に成功したので、試験管内でのユビキチン付加反応を実施した。F-box タンパク質は、F-box タンパク質と結合する因子にユビキチンを付加することが知られている。先の研究で FBH1 が RAD51 に作用することを見出していたので、RAD51 を基質として、試験管内でユビキチン付加反応を実施した。その結果、FBH1-SKP1-CUL1-ROC1 複合体は RAD51 にユビキチンを付加すること発見した (図 6A, B) (Chu, *Nature Commn*, 2015)。また、このユビキチン化は、HU 誘発の DNA 切断にも関与することも明らかになった (図 6C)。以上の研究から、FBH1 は RAD51 の制御を介して DNA 複製の再開機構に関与していると判断した。FBH1 が前述の RecQ や FANC などどのように関連しているかについては解明できていない。今後は、この点に関して検証を進め、FBH1 の DNA 複製の再開機構に関わる詳細なメカニズムを理解したい。

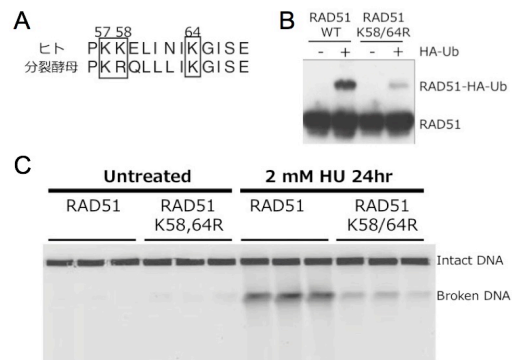


図 6. FBH1-SKP1-CUL1-ROC1 複合体は RAD51 にユビキチンを付加する反応と RAD51 ユビキチン付加部位変異体の機能解析. (A) RAD51 に含まれるユビキチン付加部位. (B) FBH1 複合体による RAD51 のユビキチン化. (C) RAD51 付加部位変異体での HU 誘発 DNA 二重鎖切断の解析. パルスフィールド電気泳動を用いて切断 DNA 断片を解析した。図は、Chu WK et al. (2015) *Nature Commun.* 6, 5931 より改変。

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 6 件)

- ① **花田克浩**. 2重鎖切断修復機構としての相同組換え. *生物工学会誌*, In press (2016)
- ② Hashimoto S, Anai H, **Hanada K**. Mechanisms of interstrand DNA crosslink repair and human disorders. *Genes Environ.*, 38, 9 (2016)
- ③ Hirose-Matsuda H, Okamoto O, Sakai T, Ito A, Kai Y, Hatano Y, **Hanada K**, Yamaoka Y, Fujiwara S. Multiple malignant changes and recurrent infections in the skin associated with long-term exposure to ultraviolet light and topical psoralen plus ultraviolet A therapy. *J. Dermatol.*, 42, 536-537 (2015)
- ④ Chu WK, Payne MJ, Beli P, **Hanada K**, Choudhary C, Hickson ID. FBH1 influences DNA replication fork stability and homologous recombination through ubiquitylation of RAD51. *Nature Commun.* 6, 5931 (2015)
- ⑤ Tokunaga A, Anai H, **Hanada K**. Mechanisms of gene targeting in higher eukaryotes. *Cell Mol Life Sci.*, 73:523-533 (2015)
- ⑥ Simandlova J, Zagebaum J, Payne MJ, Chu WK, Shevelev I, **Hanada K**, Chatterjee S, Reid DA, Liu Y, Janscak P, Rothenberg E, Hickson ID. FBH1 disrupts RAD51 filaments in vitro and modulates homologous recombination in mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 288, 34168-34180 (2013)

[学会発表] (計 3 件)

- ① **花田克浩**. 相同組換えを介した DNA 複製の再スタート機構の解析. 第 38 回日本分子生物学会, 2015 年 12 月 3 日, 神戸ポートピアホテル (兵庫県神戸市).
- ② **花田克浩**. DNA 損傷により中断した DNA 複製の再スタート機構の解明. 第 23 回 DNA 複製・組換え・修復ワークショップ, 2015 年

10月20日, 焼津グランドホテル (静岡県焼津市).

- ③ **花田克浩**. DNA 損傷により中断した DNA 複製フォークの再スタート機構の解明. 第 39 回蛋白質と酵素の構造と機能に関する九州シンポジウム, 2015 年 9 月 12 日, 豊泉荘 (大分県別府市).

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: DNA 損傷型物質のスクリーニング方法
発明者: **花田克浩**、川島友莉、西田欣広、山岡吉生

権利者: 国立大学法人大分大学

種類: 用法特許

番号: 特願 2014-244935

出願年月日: 平成 26 年 12 月 3 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

花田 克浩 (HANADA, Katsuhiko)

大分大学医学部附属臨床医工学センター・

助教

研究者番号: 90581009

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし