

134. DNA 二本鎖切断修復経路を決定する修復開始起点の同定

柴田 淳史

Key words : DNA 修復, 放射線, 相同組換え修復,
MRE11

群馬大学
先端科学研究指導者育成ユニット

緒 言

放射線照射によって誘発される二本鎖 DNA 切断 (DNA double strand break: DSB) は, 細胞の生死を決定する重要な DNA 損傷である. DSB は異なる二つの経路, NHEJ と HR のいずれかにより修復される. NHEJ は全ての細胞周期を通じて働くが, HR は複製後の S/G 期にのみ CDK の活性化を介して機能する. 我々は NHEJ 及び HR の両経路が働く G2 期での修復経路選択機構について研究を行っている. これまでの研究により, 放射線照射等により直接的に DSB が生じた場合, NHEJ が第一に働き, NHEJ が停滞又は遅延した時に HR に移行すること, また CtIP 依存的な DSB 末端の削り込み (DSB end resection) が経路決定の第一ステップであることを見出し報告している¹⁾. これまで DSB end resection における MRE11 の関与は多く示唆されていたが, MRE11 が有するエンド及び 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性がどのように resection を進行させるかについてはほとんど明らかになっていない. 我々は X 線構造解析と化合物スクリーニングを組み合わせて, MRE11 のエンド及び 3'-5'エキソヌクレアーゼ活性に対し特異的な阻害剤を開発した. MRE11 のそれぞれのヌクレアーゼ活性が DSB 修復経路決定にどのように関わるかを検討したところ, エンドヌクレアーゼ阻害剤処理の場合には CtIP と同様, HR から NHEJ 経路への移行が認められた. また同様な NHEJ への移行が MRE11 変異 ATLD 細胞においても認められた. 一方, MRE11 3'-5'エキソヌクレアーゼ阻害剤存在下では, DSB は HR によって修復されず, NHEJ 経路への移行も認められなかった. さらに我々は, MRE11 3'-5'エキソヌクレアーゼと, 5'-3'エキソヌクレアーゼ活性を有する EXO1/BLM を同時に抑制することにより, 修復経路が HR から NHEJ へ移行する事を見出した²⁾. さらに本研究では, 正常細胞における DSB end resection を独自のアッセイ系により測定した結果, resection の開始は DSB 末端から 300-800bp の範囲で生じることが示唆された.

方 法

本研究では DSB により誘発される resection のレベルを部位特異的 DSB 誘導系 AsiSI-U2OS 細胞を用いて測定した. 細胞は Gaëlle Legube 博士より譲渡頂いた. 本細胞を 4OHT 処理することにより, 制限酵素 AsiSI が発現誘導されるため, 部位特異的に DSB を誘発することが出来る. 2×10^5 の AsiSI-U2OS 細胞に対し, $0.05 \mu\text{L/mL}$ の 4OHT 処理し, 4 時間後に細胞を回収した. 回収した細胞からフェノール・クロロホルム及びエタノール沈殿法を用いて DNA を精製した. 精製 DNA を 50 U の RNaseH で 37°C , 15 分間処理した後, 50 U の BanI で 37°C , 一晚処理した. 本 DNA を, 3つのプライマーセット, DSB 末端より 231 bp, 918 bp, 1656 bp 離れた領域において (Taqman probe 法) を用いてリアルタイム PCR (Life Technologies StepOnePlus) により増幅し DSB end resection のレベルを測定した.

結 果

4OHT 処理後の DSB の誘導を DSB マーカーである gH2AX で蛍光染色することにより確認したところ, 4OHT 添加後 2 時間以降には DSB の発生が認められた (data not shown). 本条件検討をもとに, 4OHT 添加後 4 時間の時点での resection レベルを測定した (図 1). 次に DSB 発生後の resection の継時的進行を検討するために, 4OHT 添加 2, 4,

8時間後にDNAを回収し、resectionレベルの測定を行った。その結果、DSB発生部位から231 bp離れた領域でのみ、継時的なresectionの増大が認められた(図2)。

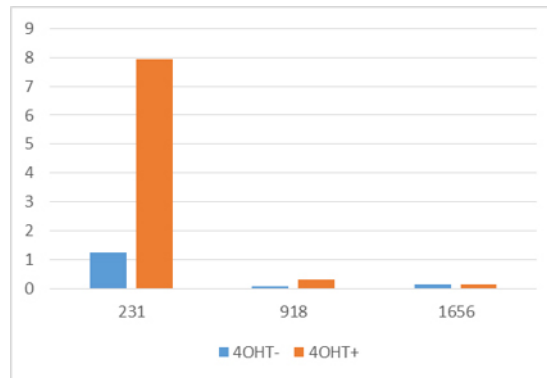


図1. 4OHT処理後4時間のDSB end resectionレベルの確認。

AsiSI-U2OS細胞に対し、0.05 μL/mL 4OHT添加後、4時間でのresectionレベルをリアルタイムPCRにより測定した。縦軸はtotal DSBに対するresectionの量を%として示す。

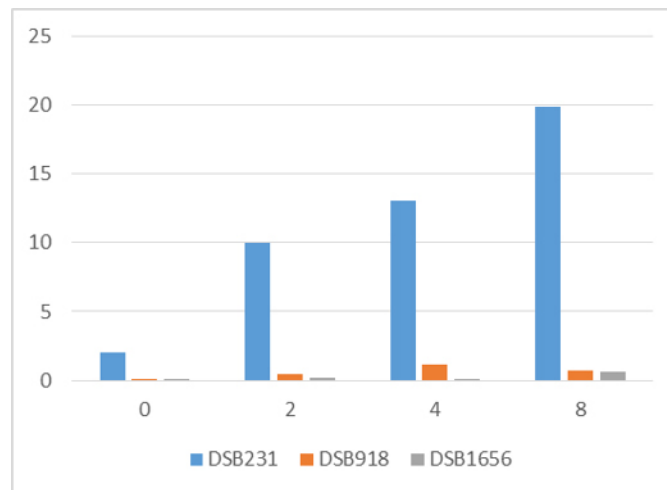


図2. 4OHT処理後のDSB end resection発生のタイムコース。

4OHT添加2, 4, 8時間後のDSB end resectionをリアルタイムPCRにより測定した。縦軸はtotal DSBに対するresectionの量を%として示す。

考 察

DSB末端より231 bp離れた領域では、再現性良くDSB依存的resectionが確認された。918 bp部位では1~2%程度であるが、4OHTと比較して若干のresectionの発生が確認された。一方で1656 bp部位では全くresectionが認められなかった。また、4OHT添加して8時間までのタイムコースで同様の傾向が認められた。本研究結果から、DSBによって誘発されるresectionの領域は300-800 bp程度であると考えられる。我々が提唱しているモデルでは、MRE11エンドヌクレアーゼ活性が、resectionの中心領域にニックを生成することによりresectionが開始される。その後、MRE11及びEXO1のエキソヌクレアーゼ活性により、それぞれ逆方向にresectionを促進する。今後は我々が

所有する MRE11 エキソヌクレアーゼ阻害剤及び EXO1 siRNA を用いて、231 部位の resection が変動するかを測定し、MRE11 エンドヌクレアーゼ活性がニックを導入する部位を予測する。また本アッセイ系は ChIP 解析にも応用が可能であるため、HRR 開始に関わるヒストンアセチル化及びヒストンメチル化状態の変動をヒストン H3K9 のアセチル化及びメチル化抗体により解析する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は、群馬大学未来先端機構の新美敦子助教である。

文 献

- 1) Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A. S., Perry, J., Harding, S. M., Genois, M. M., Maity, R., Rossum-Fikkert, S. V., Kertokallio, A., Romoli, F., Ismail, A., Ismalaj, E., Petricci, E., Neale, M. J., Bristow, R. G., Masson, J. Y., Wyman, C., Jeggo, P. A. & Tainer, J. A. : DNA double strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol. Cell*, **53** : 7-18, 2014.
- 2) Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M. & Jeggo, P. A. : Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.*, **30** : 1079-1092, 2011.