

23. ヒト二本鎖 DNA 切断修復機構とゲノム安定性維持

足立 典隆

横浜市立大学 大学院生命ナノシステム科学研究科

Key words : 二本鎖 DNA 切断, alternative end-joining, PolQ, Alu 配列

緒言

細胞のゲノムDNAは、さまざまな内的・外的要因により絶えず損傷を受けている。とりわけ二本鎖DNA切断(double-strand break : DSB) は最も危険なDNA損傷であり、不完全な修復はがん化や細胞死を引き起こす。通常DSBは非相同末端連結(non-homologous end-joining : NHEJ) または相同組換えによって修復されるが、これら2つの主要経路とは全く別の修復機構も存在する [1]。しかし、こういったマイナーな修復経路の意義や分子機構、関与する因子についての詳細は明らかになっていない。alternative end-joining (alt-EJ) はマイナーなDSB修復機構の一つであるが、その実体は長きに渡り不明であった。特に、短い相同性を必要とするDSB修復であるMMEJ (microhomology-mediated end-joining) との関係性についての定義は曖昧であった。しかし、私はごく最近、NHEJ以外の非相同組換えはすべてMMEJ型か非MMEJ型(挿入を伴う)のどちらかに分類されること、また、いずれの反応もDNAポリメラーゼθ(PolQ)に完全に依存していることを突きとめた [2]。PolQは、ヒト細胞に存在する他の16種類のDNAポリメラーゼと異なり、N末端側にATPaseドメインをもつという特徴的な構造を有している。また、相同組換えに必須なRad51との結合に関わるドメインも存在する。しかし、C末端側に存在するPolymeraseドメインも含め、こうしたドメインの重要性については解明されていない。大変興味深いことに、NHEJの必須因子であるDNA ligase IV (Lig4) を欠損した細胞でPolQ遺伝子(POLQ)をノックアウトすると染色体DSBの修復効率が著しく低下し、離れたAlu配列の間で起こる稀な組換え(Alu-Alu組換え)でしか再連結が行われなくなる [2]。Alu配列はヒトゲノムの11%を占める反復配列であり、Alu-Alu組換えはがんや遺伝病の直接的原因となる危険な組換えである [3]。Alu-Alu組換えがPolQ非依存性の反応であることが証明されたことから、もう一つのマイナーなDSB修復機構である一本鎖DNAアニーリング(single-strand annealing : SSA)の関与が強く示唆されるが、詳細は不明である。本研究では、ヒトPolQにユニークな機能ドメインの役割についての解析を進めるとともに、ヒト細胞の染色体中で起こるAlu-Alu組換えの特徴と制御機構に関する先駆的な研究を行った。

方法

1. 変異型POLQ発現ベクターの構築

ヒトPOLQ発現ベクターは韓国基礎科学研究院(IBS)の高田慶一博士より分与を受けた。このベクターをベースに、PCRと一般的な遺伝子組換え技術(制限酵素とリガーゼの使用)により変異型POLQ発現ベクターの構築を行った。具体的には、ATPase欠損型POLQ発現ベクターは、216番目のアスパラギン酸と217番目のグルタミン酸をアラニンに置換することで構築した。Polymerase欠損型POLQ発現ベクターの構築は、2,540番目のアスパラギン酸と2,541番目のグルタミン酸をアラニンに置換することで行った。Rad51結合ドメインを欠損したベクターは、847番目から894番目までのアミノ酸を欠失させることで構築した。核移行シグナル(NLS)欠損型POLQ発現ベクターは、NLS配列中の塩基性アミノ酸をアラニンに置換することで構築した。作製したベクターはすべてQIAGEN Plasmid Plus Midi Kit(QIAGEN)を用いて精製したのち実験に使用した [4]。

2. ランダム挿入頻度の解析

作製した各変異型 *POLQ* 発現ベクター（または野生型ヒト *POLQ* 発現ベクター）とネオマイシン耐性遺伝子をもつベクター（pPGKneo）をエレクトロポレーション法により *LIG4/POLQ* 二重破壊株（ヒト Nalm-6 細胞由来のノックアウト細胞）に共導入した [2]。細胞を G418 含有アガロース培地中で 3 週間培養した後、生じたコロニーの数を測定することで、ランダム挿入頻度（ベクター-DNA が染色体中に組み込まれる頻度）を算出した。

3. 染色体内組換えの解析

HPRT 遺伝子のコード領域（第 3 エクソン）を標的とした gRNA（5'-GATGTGATGAAGGAGATGGGAGG-3'；下線は PAM 配列を示す）を組み込んだ CRISPR/Cas9 発現ベクター（pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9; Addgene Plasmid #42230）をエレクトロポレーション法により *LIG4/POLQ* 二重破壊株に導入した [2]。6 チオグアニン（6-TG）を含むアガロース培地中で 3 週間培養した後、生じた 6-TG 耐性クローンからゲノム DNA を抽出し PCR 解析とシーケンス解析を行った。PCR 反応には Tks Gflex DNA Polymerase または EmeraldAmp PCR Master Mix（ともにタカラバイオ）を用い、得られた PCR 断片を用いてジャンクション部位のシーケンス解析を行った。Alu 配列についての情報は UCSC ゲノムブラウザ（<https://genome.ucsc.edu/>）より取得した。相同性の検索には BLAST（<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>）を、ジャンクション配列のアライメントには GENETYX-MAC を使用した。以上の方法により、*HPRT* 遺伝子の標的部位において Alu-Alu 組換えによる再連結を起こしたクローンを同定するとともに、各クローンにおける組換えのパターンや特徴を解析した。阻害剤を用いた実験は、遺伝子導入後の細胞を阻害剤存在下で 2 日間培養したのち 5 日後に 6-TG 含有アガロース培地でのコロニー形成を開始するという手順で行った。Rad51 阻害剤は B02 (10 μ M) または RI-2 (75 μ M) を、Rad52 阻害剤は 6-OH-DL-DOPA (10 μ M) を使用した [5]。

結果および考察

1. ヒト PolQ の機能ドメインの役割と意義

PolQ と Lig4 を同時に欠損したヒト細胞では、導入した外来遺伝子が染色体中に全く組み込まれない [2]。この細胞に PolQ を一過性に発現させるとランダム挿入体が出現するようになる。こうした表現型を利用することで、PolQ タンパク質の変異による活性への影響を正確かつ容易に調べることができる。各変異型 *POLQ* 発現ベクターを pPGKneo とともに *LIG4/POLQ* 二重破壊株に導入した際のランダム挿入頻度を調べたところ、Polymerase ドメインと同様、ATPase ドメインに変異を入れた場合もランダム挿入体が出現しなくなることがわかった (図 1)。この結果は、alt-EJ 依存性のランダム挿入において、PolQ の Polymerase ドメインに加え ATPase ドメインも必須の機能を果たしていることを示すが、alt-EJ 反応における ATPase 活性の具体的な役割については引き続き検討が必要である。一方、Rad51 結合ドメインは alt-EJ 依存性のランダム挿入反応に必須ではなかったが (図 1)、導入するベクター量を減らすと挿入頻度の低下がみられたことから (データ非掲載)、このドメインの存在が PolQ の活性に影響を与えている可能性がある。NLS 配列中に変異をもつ PolQ は細胞質に局在したにもかかわらずランダム挿入反応に関与できることがわかった (図 1)。この意外な結果は核の中にわずかに存在する PolQ がランダム挿入を引き起こした可能性を示唆しており、現在さらに解析を進めている。

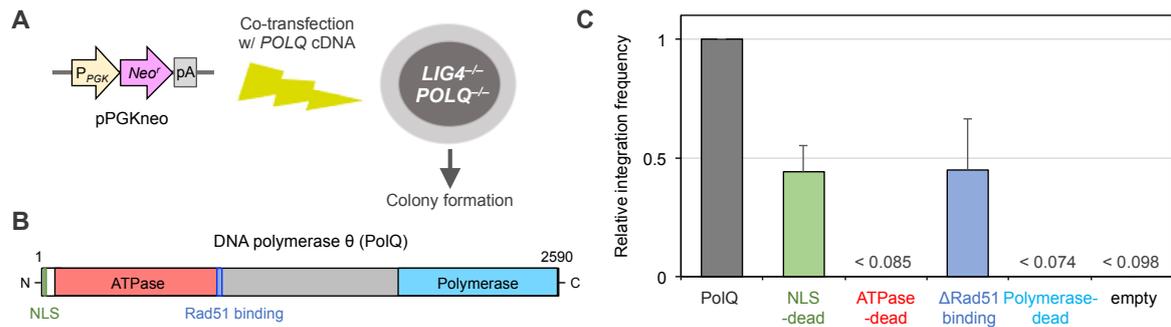


図1. PolQ の機能ドメインの解析

(A) ランダム挿入アッセイの概略。(B) ヒト PolQ のドメイン構造。(C) 発現ベクターを導入した際のランダム挿入頻度の相対値 (野生型 *POLQ* 導入時の値を 1 とした)。

2. Alu-Alu 組換え反応の特徴

上で述べた通り、PolQ と Lig4 を同時に欠損させると染色体 DSB の修復効率が著しく低下すること、またこの際、極めて低い頻度で起こる Alu-Alu 組換えでしか修復 (すなわち DSB 同士の再連結) が行われないことがわかっている [2]。そこで、*LIG4/POLQ* 二重破壊株のゲノム中に DSB を導入した際に起こる Alu-Alu 組換えの特徴についてさらに解析を進めたところ、DSB の近傍に存在する Alu 配列が組換えの基質として利用されやすいこと、また比較的相同性の高い (相同性 80% 以上の) Alu 配列の間で組み換わる頻度が高いことが判明した (図 2)。組換えに利用されなかった Alu 配列の相同性は一つの例外を除きすべて 79% 以下であった。現在、他の遺伝子座における Alu-Alu 組換えにおいても同様の傾向がみられるかどうかについて詳細な検討を行っている。

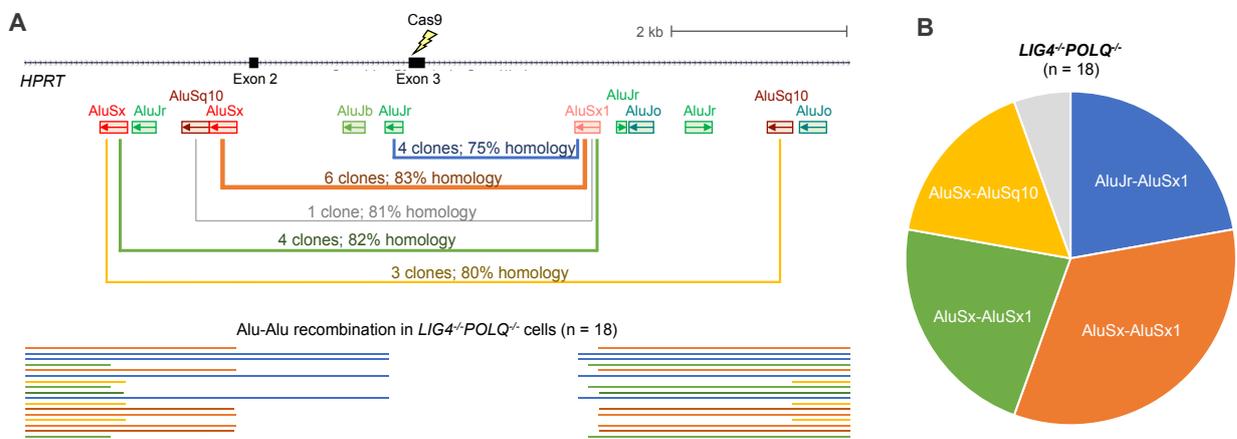


図2. *LIG4/POLQ* 二重破壊株における Alu-Alu 組換えの解析

- A) *LIG4/POLQ* 二重破壊株の *HPRT* 遺伝子における Alu-Alu 組換え。観察された 5 パターンの Alu-Alu 組換えについて、クローン数、および、基質となった Alu 配列間の相同性 (%) を示した。図の下部は各組換え (計 18 クローン) に伴うゲノム欠失の様子を表す。
- B) 組換え体の分布。

3. Alu-Alu 組換えの制御機構

LIG4/POLQ 二重破壊株に *PolQ* または *Lig4* のいずれかを安定に発現させると Alu-Alu 組換えの頻度が著しく低下する [2]。この結果は、通常 Alu-Alu 組換えが alt-EJ と NHEJ によって抑制されていることを示唆する。そこで次に、相同組換えの必須因子である *Rad51* や SSA に必須と考えられてきた *Rad52* の機能阻害が Alu-Alu 組換えに及ぼす影響を調べたところ、*Rad51* 阻害剤処理により組換え頻度が上昇すること、一方、*Rad52* 阻害剤存在下では組換え頻度が有意に低下することが判明した (図 3)。このことから、Alu-Alu 組換えが *Rad52* 依存性の SSA によって引き起こされること、また、この反応が *Rad51* により負に制御されている可能性が示唆される。Alu-Alu 組換えに SSA が関与している可能性を受け、次にミスマッチ修復の主要因子である *Msh2* の関与を調べた。酵母においては古くから *Msh2* によって SSA が抑制されることが知られている [6]。Nalm-6 細胞は *MSH2* 遺伝子を欠損しているため [7, 8]、正常 cDNA のノックインにより *Msh2* の発現を回復させた *LIG4/POLQ* 二重破壊株を構築して実験を行ったところ、Alu-Alu 組換えを起こした細胞が観察されなくなった。また、別の遺伝子座を利用した同様の実験では、Alu-Alu 組換え頻度が 30 倍以上低下することがわかった (データ非掲載)。この発見と酵母での知見を考え合わせると、異なる Alu 配列の間で起こるアニーリング (すなわち SSA 反応の中間体の生成) が *Msh2* タンパク質によって阻害されていることが推測される。以上の結果から、ヒトゲノム上で起こる Alu-Alu 組換えは通常 alt-EJ と *Lig4* のみならず *Msh2* によって強く抑制されていることが明らかとなった。Alu-Alu 組換えはがんや遺伝病の直接的原因となる危険な組換えであることから、こうした組換えがどのような制御を受けているかを解明していくことは反復配列に富んだゲノムが安定に維持される仕組みを理解するうえで重要な課題であり、今後のさらなる解析が待たれる。

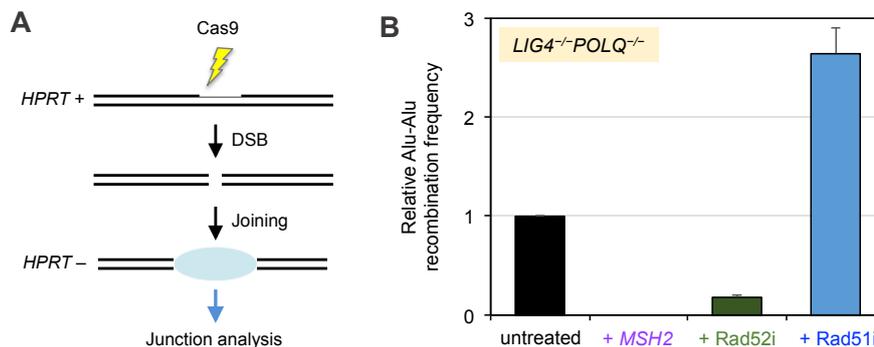


図 3. Alu-Alu 組換えの制御機構の解析

- (A) *LIG4/POLQ* 二重破壊株の *HPRT* 遺伝子座における Alu-Alu 組換え解析の方法。
(B) *Msh2* 発現回復、*Rad51* 阻害剤、*Rad52* 阻害剤による組換え頻度への影響を調べ、*Msh2* 欠損細胞の阻害剤非存在下における組換え頻度を 1 としたときの相対値を求めた。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院生命ナノシステム科学研究科分子生物学研究室の斎藤慎太博士である。

文 献

- 1) Chang HHY, Pannunzio NR, Adachi N, Lieber MR. Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2017 Aug;18(8):495-506. Epub 2017 May 17. PMID: 28512351 DOI: 10.1038/nrm.2017.48
- 2) Saito S, Maeda R, Adachi N. Dual loss of human *POLQ* and *LIG4* abolishes random integration. *Nat Commun.* 2017 Jul 11;8:16112. PMID: 28695890 PMCID: PMC5508229 DOI: 10.1038/ncomms16112.
- 3) Belancio VP, Roy-Engel AM, Deininger PL. All y'all need to know 'bout retroelements in cancer. *Semin Cancer Biol.* 2010 Aug;20(4):200-10. Epub 2010 Jun 25. PMID: 20600922 PMCID: PMC2943028 DOI: 10.1016/j.semcancer.2010.06.001
- 4) Adachi N, Kurosawa A, Koyama H. Highly proficient gene targeting by homologous recombination in the human pre-B cell line Nalm-6. *Methods Mol Biol.* 2008;435:17-29. PMID:18370065 DOI:10.1007/978-1-59745-232-8_2
- 5) Hengel SR, Spies MA, Spies M. Small-molecule inhibitors targeting DNA repair and DNA repair deficiency in research and cancer therapy. *Cell Chem Biol.* 2017 Sep 21;24(9):1101-1119. PMID: 28938088 PMCID: PMC5679738 DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.08.027
- 6) Sugawara N, Goldfarb T, Studamire B, Alani E, Haber JE. Heteroduplex rejection during single-strand annealing requires Sgs1 helicase and mismatch repair proteins Msh2 and Msh6 but not Pms1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 Jun 22;101(25):9315-20. Epub 2004 Jun 15. PMID: 15199178 PMCID: PMC438974 DOI: 10.1073/pnas.0305749101
- 7) Adachi N, So S, Iizumi S, Nomura Y, Murai K, Yamakawa C, Miyagawa K, Koyama H. The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DNA Cell Biol.* 2006 Jan;25(1):19-24. PMID: 16405397 DOI: 10.1089/dna.2006.25.19
- 8) Suzuki T, Ukai A, Honma M, Adachi N, Nohmi T. Restoration of mismatch repair functions in human cell line Nalm-6, which has high efficiency for gene targeting. *PLoS One.* 2013 Apr 15;8(4):e61189. PMID: 23596518 PMCID: PMC3626652 DOI: 10.1371/journal.pone.0061189