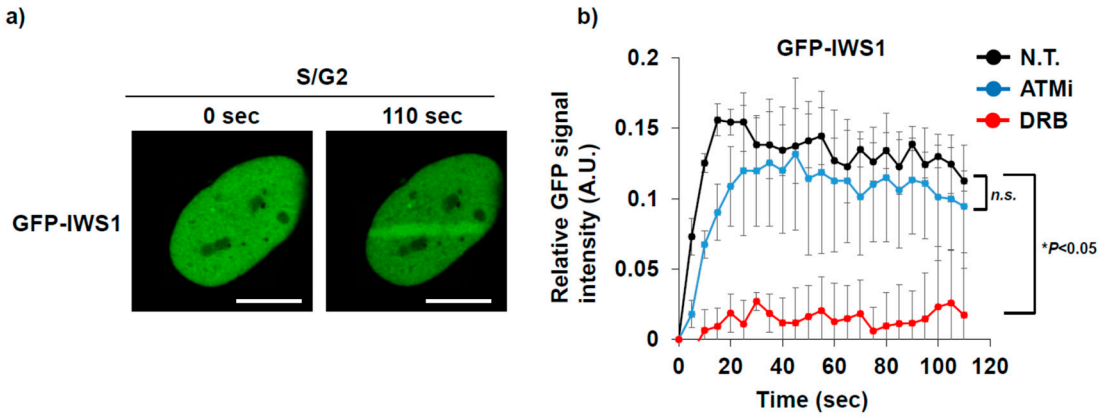
45　ゲノム安定化維持のためのDNA修復経路選択性の研究	柴田　淳史

【目的】放射線照射が誘発する DNA 二本鎖切断（DSB：DNA double strand break）は non-homologous end joining（NHEJ）又は homologous recombination（HR）のいずれかにより修復される。近年の我々の研究により、S/G2 期細胞であっても放射線誘発 DSB 修復の第一選択は NHEJ であり、DSB の約 70%は NHEJ により修復されることが明らかになってきた（Shibata, EMBO J, 2011）。一方で約 30%の DSB に対しては、NHEJ が停滞又は遅延した場合に CtIP/MRE11 依存的に修復経路が NHEJ から HR への移行することを報告している（Shibata, Mol Cell, 2014）。さらに我々は、放射線照射直後は全ての DSB 末端付近で Ku80 及び 53BP1 が結合し、DSB 修復を NHEJ に向かわせる NHEJ 環境（pro-NHEJ environment）を形成していることを見出している（Isono and Shibata*, Cell Rep, 2017 *責任著者; Barton and Shiabta*, Mol Cell, 2017 *共責任著者）。ゲノム上で変異を残すべきではない場所に DSB が生じた場合、細胞は HR を優先すると考えられ、実際に転写活性遺伝子領域に生じた DSB は HR により修復される（Aymard, NSMB, 2014; Pfister, Cell Rep, 2014）。本研究では転写活性領域で起こる HR に着目し、転写と共役する新規 HR 因子の同定を目指した。

【方法】ヒト正常細胞である RPE 細胞（網膜色素上皮細胞）または U2OS 細胞を用いて、DNA 損傷応答の解析を行った。DSB のマーカーである gH2AX foci を指標とすることで DSB 修復能を計測した。また HR 時に生じる DSB end resection については、RPA foci を指標として解析を行った。また、DSB 部位における DNA 修復タンパク質の集積をリアルタイムで計測するために、東京大学・安原崇哲助教との共同研究により、二光子顕微鏡でのリアルタイムライブイメージングを行った。HR 頻度の計測には、U2OS DR-GFP アッセイ系を用いた。

【結果】転写因子として知られる遺伝子群の中で、HR に関わる新規因子を同定するため、siRNA スクリーニングを行った結果、我々は IWS1 が HR の開始に必要であることを見出している（未発表）。そこで、これらの因子が DSB 部位に集積するかどうかを、東京大学・安原崇哲助教との共同研究により、二光子顕微鏡を用いたライブイメージング解析を行った。HR は S/G2 において引き起こされるため、本実験では mCherry-Geminin を発現する U2OS 細胞に、GFP-IWS1 を一過性に発現させ、Hoechst 33342 を増感剤として用いた上で、730 nm（365 nm 励起）の照射を行った。その結果、DSB 部位への IWS1 の集積が確認された。またこの集積は転写阻害剤の添加により低下したことから、転写依存的に IWS1 が DSB 部位へ集積することが示唆された。また HR 頻度を測定する DR-GFP アッセイを行った結果、IWS1 ノックダウン細胞では HR 効率の顕著な低下が認められた。以上の結果から、IWS1 は HR を導く新規因子であることが示唆された。

転写に関わる新規 HR 候補因子の DSB 部位への集積解析



45. ゲノム安定化維持のための DNA 修復経路選択性の研究

柴田　淳史

*群馬大学 大学院医学系研究科 大学院教育研究支援センター

Key words：DNA 修復，転写，相同組換え修復，ゲノム安定性

緒　言

放射線照射が誘発する DNA 二本鎖切断（DSB：DNA double strand break）は non-homologous end joining（NHEJ）又は homologous recombination（HR）のいずれかにより修復される。NHEJ は細胞周期の G1, S, G2 期で DSB を修復することが出来るが、HR は S/G2 期でのみ DSB を修復する。近年の我々の研究により、S/G2 期細胞であっても放射線誘発 DSB 修復の第一選択は NHEJ であり、DSB の約 70%は NHEJ により修復されることが明らかになってきた［1］。一方で約 30%の DSB に対しては、NHEJ が停滞又は遅延した場合に CtIP/MRE11 依存的に修復経路が NHEJ から HR への移行することを報告している［2］。さらに我々は、放射線照射直後は全ての DSB 末端付近で Ku80 及び 53BP1 が結合し、DSB 修復を NHEJ に向かわせる NHEJ 環境（pro-NHEJ environment）を形成していることを見出している［3, 4］。このような知見が得られつつある中で、未だ NHEJ から HR への移行が受動的又は能動的なものかは明らかになっていない。両修復経路の特性を考えた際、NHEJ はエラーを誘引する危険性があるが、HR は正確に修復を完了することが出来る。従ってゲノム上で変異を残すべきではない場所に DSB が生じた場合、細胞は HR を優先すると考えられる。実際、転写活性遺伝子領域に生じた DSB では HR 経路が優位に働くことが知られている。以上の知見から我々は、転写活性領域の DSB では NHEJ は行われず、何らかの機序により、より正確な DSB 修復経路である HR へと移行すると考察した。本研究では転写活性領域で起こる HR への移行を「転写共役型 DSB 修復経路変換」と定義し、その分子機構解明を目指した。

方　法

ヒト正常細胞である RPE 細胞（網膜色素上皮細胞）または U2OS 細胞を用いて、DNA 損傷応答の解析を行った。DSB のマーカーである gH2AX foci を指標とすることで DSB 修復能を計測した。また HR 時に生じる DSB end resection については、RPA foci を指標として解析を行った。また、DSB 部位における DNA 修復タンパク質の集積をリアルタイムで計測するために、東京大学・安原崇哲助教との共同研究により、二光子顕微鏡でのリアルタイムライブイメージングを行った。HR 頻度の計測には、U2OS DR-GFP アッセイ系を用いた。

結果および考察

1. 転写依存的な新規 HR 候補因子の DSB 部位への集積

転写促進因子として知られる遺伝子群の中で、HR に関わる新規因子を同定するため、siRNA スクリーニングを行った結果、我々は IWS1 が HR の開始に必要であることを見出している（未発表）。本研究では、これらの因子が DSB 部位に集積するかどうかを、東京大学・安原崇哲助教との共同研究により、二光子顕微鏡を用いたライブイメージング解析を行った。HR は S/G2 において引き起こされるため、本実験では mCherry-Geminin を発現する U2OS 細胞に GFP-IWS1 を一過性に発現させ、Hoechst 33342 を増感剤として用いた上で 730 nm（365 nm 励起）の照射を行った。その結果、DSB 部位への IWS1 の集積が確認された（図 1）。またこの集積は転写阻害剤の添加により低下したことから、転写依存的に IWS1 が DSB 部位へ集積することが示唆された（図 1）。DSB 発生後に活性化されるキナーゼであ

*現在の所属：群馬大学 未来先端研究機構 シグナル伝達研究プログラム・柴田研究室

る ATM は、様々な DSB 修復因子の集積に関わる。そのため、IWS1 の DSB 部位への集積が ATM 依存的であるかどうかを ATM 阻害剤により検討したが、IWS1 の集積は ATM 非依存であった。

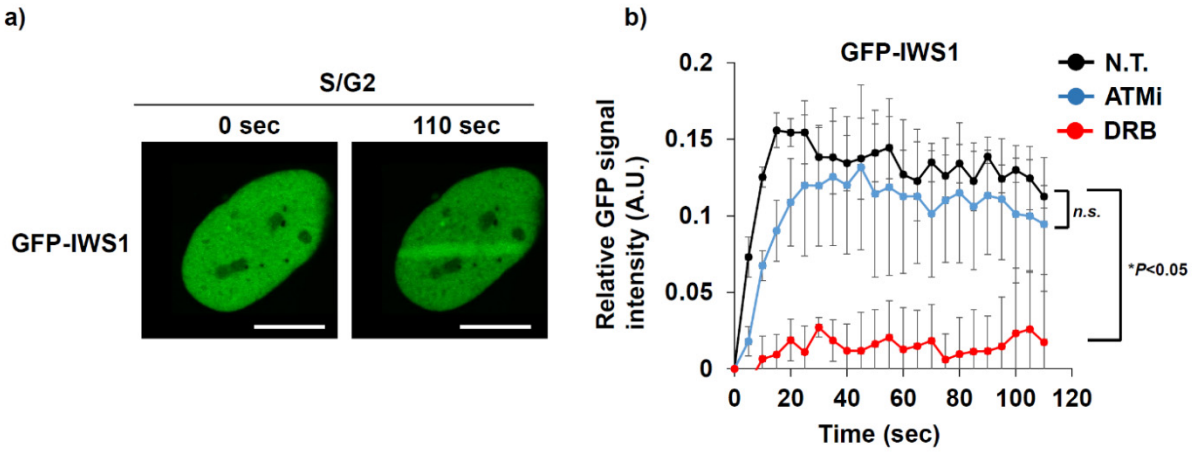


図 1. 転写に関わる新規 HR 候補因子の DSB 部位への集積解析

a) レーザー照射部位に対する GFP-IWS1 の集積。

b) DSB 部位に集積する GFP-IWS1 は、転写阻害剤である 5,6-dichloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB) 存在下において減弱する。ATM 阻害剤は GFP-IWS1 の集積には影響を及ぼさなかった。スケールバーは 5 μm を示す。統計検定は、SigmaPlot 12.0.により t-test を用いて行った。$*P < 0.05$

2. IWS1 ノックダウン細胞における HR 効率の測定

S/G2 期細胞において、IWS1 は DSB 部位に集積することが認められたことから、IWS1 が HR 頻度に直接影響を与えるかどうかを、U2OS DR-GFP アッセイを用いて検討した。IWS1 ノックダウン細胞では HR 効率の顕著な低下が認められた (図 2)。本実験では、HR に関わる CtIP または BRCA2 ノックダウンを行い、IWS1 と比較検討を行った。その結果、IWS1 ノックダウンでは、既存の HR 因子である BRCA2 ノックダウンと同等の HR 頻度の低下が認められた (図 2)。以上の結果から、転写因子として知られる IWS1 は、DSB 部位に集積し HR を促進する機能を有することが示唆された。我々は、転写共役型 HR として、Rad52/XPG を介した新しい HR 経路の存在を同定し、その分子メカニズムを明らかにしている [5]。IWS1 は転写活性部位に存在する分子であることから、転写共役型 HR に関わる可能性が考えられた。

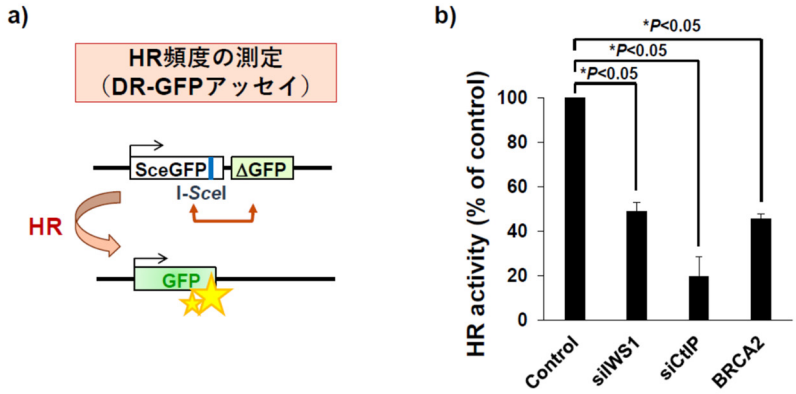


図 2. DR-GFP アッセイによる HR 効率の測定

a) HR 効率を測定するための DR-GFP アッセイの概略図。

b) IWS1 ノックダウン細胞では、HR 頻度が有意に低下していた。HR 促進因子として、CtIP および BRCA2 を選定し、それぞれのノックダウン細胞における HR 頻度の低下を確認した。統計検定は、SigmaPlot 12.0.により t-test を用いて行った。$*P < 0.05$

共同研究者・謝辞

本研究は、東京大学大学院医学系研究科放射線分子医学講座の安原崇哲助教および宮川清教授との共同研究によって行われた。

文　献

1) Atsushi Shibata, Sandro Conrad, Julie Birraux, Verena Geuting, Olivia Barton, Amani Ismail, Andreas Kakarougkas, Katheryn Meek, Gisela Taucher-Scholz, Markus Löbrich and Penny A Jeggo. Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. EMBO J, 30(6):1079-92, 2011. PMID: 21317870, DOI: 10.1038/emboj.2011.27

2) Atsushi Shibata, Davide Moiani, Andrew S. Arvai, Jefferson Perry, Shane M. Harding, Marie-Michelle Genois, Ranjan Maity, Sari van Rossum-Fikkert, Aryandi Kertokalio, Filippo Romoli, Amani Ismail, Ermal Ismalaj, Elena Petricci, Matthew J. Neale, Robert G. Bristow, Jean-Yves Masson, Claire Wyman, Penny A. Jeggo, John A. Tainer. DNA Double Strand Break Repair Pathway Choice Is Directed by Distinct MRE11 Nuclease Activities. Molecular Cell, 53 (1), 7-18, 2014. PMID: 24316220, DOI: 10.1016/j.molcel.2013.11.003

3) Ronja Biehs, Monika Steinlage, Olivia Barton, Szilvia Juhasz, Julia Kunzel, Julian Spies, Atsushi Shibata*, Penny Jeggo* and Markus Lobrich*. DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. Molecular Cell, S1097-2765(16)30854-1, 2017. PMID: 28132842, DOI: 10.1016/j.molcel.2016.12.016

4) Mayu Isono, Atsuko Niimi, Takahiro Oike, Yoshihiko Hagiwara, Hiro Sato, Ryota Sekine, Yukari Yoshida, Shin-Ya Isobe, Chikashi Obuse, Ryotaro Nishi, Elena Petricci, Shinichiro Nakada, Takashi Nakano and Atsushi Shibata*. BRCA1 directs the repair pathway to homologous recombination by promoting 53BP1 dephosphorylation. Cell Reports, 18(2):520-532, 2017. PMID: 28076794, DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.042

5) Takaaki Yasuhara*, Reona Kato, Yoshihiko Hagiwara, Bunsyo Shiotani, Motohiro Yamauchi, Shinichiro Nakada, Atsushi Shibata* and Kiyoshi Miyagawa*. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair. Cell, 175 (2):558-570, 2018. PMID: 30245011 DOI: 10.1016/j.cell.2018.08.056