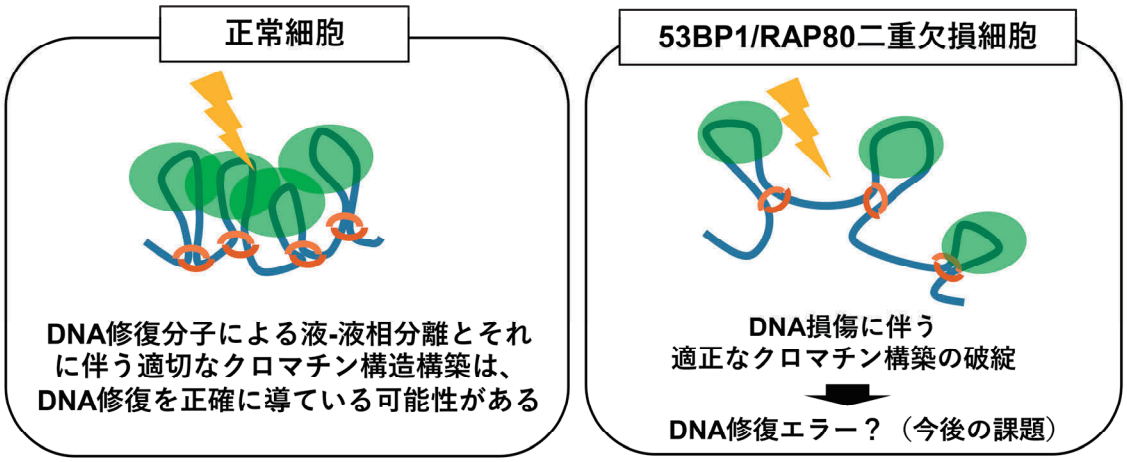
32　正確な修復を導くナノ修復複合体の構築原理と機能解析	柴田　淳史

【目的】DNA 損傷の中でも、DNA 二本鎖切断（DSB : DNA double strand break）は欠失・挿入変異や染色体転座を誘発することから最も重篤な損傷の一つと考えられている。これまでの我々の研究から、非相同末端連結（NHEJ : non-homologous end joining）および相同組換え（HR : homologous recombination）が、「DSB 末端の削り込み」によって制御されていることが明らかになってきた。さらに我々は、NHEJ と HR の両方の修復経路が利用可能な G2 期において、NHEJ が第一経路として働き、NHEJ が停滞した場合に、DSB 末端を削りこむ DNA ヌクレアーゼ MRE11/CtIP が HR を開始させ、修復経路を HR へと向かわせることを発見した。また、DSB 近傍のクロマチン構造を蛍光イメージングにより解析すると、乳がん原因遺伝子である BRCA1 が 53BP1 の空間的再配置を促進させ、DSB 末端の削り込みを促進することを見出し報告している。すなわち、DSB 発生直後、53BP は DSB 近傍に集積し DSB 末端の削り込みを一時的に抑制し、その後 HR の進行時に伴い、53BP1 は DSB 遠位へと移動していた。一連の研究により得られた知見を統合することで、我々は「DSB 発生後、53BP1 が一過性に DNA 損傷部位に集積し不必要な削り込みを抑制することで、正確な DSB 修復経路へと導いている」という仮説を現在導き出している。一方、その他の研究グループから 53BP1 は液-液相分離により DNA 損傷部位に集積することが示された。また、次世代シーケンスを用いた ChIP-seq 解析から、1 か所の DSB に対して 53BP1 は 1〜2 Mbp と非常に広範囲にわたり分布することが明らかになってきた。このように最新の知見を統合すると、53BP1 は DSB 部位に 1〜2 Mbp と広範囲にわたり集積し、それらが液-液相分離を使い、DNA 修復に最適なクロマチン構造を再構築している可能性が考えられた。そこで本研究では、53BP1 およびその関連 DNA 修復分子について、超解像顕微鏡を使いその複合体の解析を行った。

【方法】ヒト正常網膜色素上皮（RPE : Retinal Pigment Epithelium）に対して X 線照射により DSB を誘発し、53BP1 および RAP80 を蛍光免疫染色によりラベルした後、超解像画像は 3D-SIM 顕微鏡（DeltaVision OMX バージョン 4、GE Healthcare UK Ltd）により取得した。得られた画像は Imaris 8.1.2（Bitplane）により解析を行った。

【結果】ヒト正常細胞である RPE 細胞に対し、1 Gy の X 線を照射し、30 分後の 53BP1 シグナルを 3D-SIM OMX を用いて超高解像イメージングを行った結果、53BP1 は DSB 周囲に微小な集積体（ナノドメイン）を形成することを見出した。すなわち DNA 損傷近傍において 53BP1 は、ヌクレオソームが構成するドメイン単位で修復を促進している可能性が考えられた。また我々は、53BP1 が欠損した状態だと別の修復因子である RAP80 が 53BP1 に代わり損傷部位に集積することを見出した。興味深いことに、53BP と RAP80 の同時欠損細胞を用いて、DSB 近傍のクロマチン構造を gH2AX シグナルによりモニターすると、異常な DNA 修復クロマチン構造体を示すことを見出した。以上の結果から、53BP と RAP80 は DSB 近傍にそれぞれ排他的に集積することで損傷近傍のクロマチン構造を制御し、DNA 修復を促進している可能性が考えられた。

DNA 修復タンパク質による適正なクロマチン構造構築



32. 正確な修復を導くナノ修復複合体の構築原理と機能解析

柴田　淳史

*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

Key words：DNA 二本鎖切断，Non-homologous end joining，Homologous recombination，53BP1，RAP80

緒　言

様々な外的要因によって引き起こされる DNA 損傷は、細胞が有する「DNA 修復」の機能により復元される。しかしながら、その DNA 修復は完全ではなく、不完全な DNA 修復が起こることにより、がんを含めた様々な疾患が生じる。ここ数十年の分子生物学的研究から、DNA 修復に関わる分子群は同定されつつあるが、生命がどのようにして正確な「DNA 修復」を保障しているかは未だ明らかになっていない。我々のこれまでの研究から、DNA 損傷近傍に集積する修復分子である 53BP1 が、正確な DNA 修復を導くための最も重要な役割を果たしていると考えている。そこで本研究では、53BP1 がどのようにして正確な DNA 修復経路を制御しているのか、その分子機構解明を目的とし研究を行った。

DNA 損傷の中でも、DNA 二本鎖切断（DSB：DNA double strand break）は欠失・挿入変異や染色体転座を誘発することから最も重篤な損傷の一つと考えられている。これまでの我々の研究から、非相同末端連結（NHEJ：non-homologous end joining）および相同組換え（HR：homologous recombination）が、「DSB 末端の削り込み」によって制御されていることが明らかになってきた。さらに我々は、NHEJ と HR の両方の修復経路が利用可能な G2 期において、NHEJ が第一経路として働き、NHEJ が停滞した場合に、DSB 末端を削りこむ DNA ヌクレアーゼ MRE11/CtIP が HR を開始させ、修復経路を HR へと向かわせることを発見した［1］。また、DSB 近傍のクロマチン構造を蛍光イメージングにより解析すると、乳がん原因遺伝子である BRCA1 が 53BP1 の空間的再配置を促進させ、DSB 末端の削り込みを促進することを見出し報告している［2〜4］。すなわち、DSB 発生直後、53BP は DSB 近傍に集積し DSB 末端の削り込みを一時的に抑制し、その後 HR の進行時に伴い、53BP1 は DSB 遠位へと移動していた。一連の研究により得られた知見を統合することで、我々は「DSB 発生後、53BP1 が一過性に DNA 損傷部位に集積し不必要な削り込みを抑制することで、正確な DSB 修復経路へと導いている」という仮説が現在導き出されている［5］。一方、その他の研究グループから 53BP1 は液-液相分離により DNA 損傷部位に集積することが示された［6，7］。また、次世代シーケンスを用いた ChIP-seq 解析から、1 か所の DSB に対して 53BP1 は 1〜2 Mbp と非常に広範囲にわたり分布することが明らかになってきた［8，9］。このように最新の知見を統合すると、53BP1 は DSB 部位に 1〜2 Mbp と広範囲にわたり集積し、それらが液-液相分離を使い、DNA 修復に最適なクロマチン構造を再構築している可能性が考えられた。そこで本研究では、53BP1 およびその関連 DNA 修復分子について、超解像顕微鏡を使いその複合体の解析を行った。

方法

1. 細胞培養

ヒト正常網膜色素上皮（RPE：Retinal Pigment Epithelium）をダルベッコ改変イーグル培地：栄養混合物 F-12（DMEM/F-12、FUJIFILM）で培養した。培地には、10%ウシ胎児血清（FCS、Sigma-Aldrich）、1×ペニシリン-ストレプトマイシン-L-グルタミン溶液（FUJIFILM）、および重炭酸ナトリウム（FUJIFILM）を添加し使用した。細胞は 37℃、5%CO_2の条件下で培養を行った。X 線照射は MX-160Labo（160 kVp、1.07 Gy/min、3.00 mA、mediXtec）

*現在の所属：慶應義塾大学 薬学部 分子腫瘍薬学講座

を使用して実験を行った。

2. 蛍光免疫染色および 3D-SIM 解析

細胞を 3%パラホルムアルデヒド-2%スクロースで 10 分間固定した後、固定した細胞を 0.2% Triton で 3 分間透過処理を行った。次に、細胞を PBS で洗浄し、2%ウシ血清アルブミン（BSA）-PBS 中の一次抗体とともに 37℃で 30 分間インキュベートした。PBS で洗浄した後、細胞を Alexa-Fluor-488 および Alexa-Fluor-594 にコンジュゲートした二次抗体（2% BSA-PBS で 1：500 に希釈）とともに 37℃で 30 分間インキュベートした。細胞を再び PBS で 2 回洗浄し、Vectashield（Vector Laboratories）を使用してスライドにマウントした。超解像イメージング解析は 3D-SIM 顕微鏡（DeltaVision OMX バージョン 4、GE Healthcare UK Ltd）を使い Plan Apo N×60、1.42 を使用して画像取得した。オプティカル Z セクションは 0.125μm にて取得した。得られた画像は Imaris 8.1.2（Bitplane）により解析を行った。

結果および考察

1. 超解像イメージング解析による 53BP1 ナノドメインの可視化と定量

RPE 細胞に対し、1 Gy の X 線を照射し、30 分後の 53BP1 シグナルを 3D-SIM OMX を用いて超高解像イメージングを行った。その結果、53BP1 は DSB 周囲に微小な集積体（ナノドメイン）を形成していた（図 1A）。53BP1 ナノフォーサイの空間的分布を独自の検出系である DPS 解析（Distance of Proximal Spot）を用いて検討した結果、平均 0.3μm の距離でそれぞれのナノドメインが分布していることが明らかになった（図 1B）。53BP1 ナノフォーサイの経時的変化を検討した結果、時間経過に伴う 53BP1 ナノフォーサイの数の増大を認めた。しかし空間分布は、DNA 発生後の時間経過では変化は認められなかった。これらの結果は、DSB 近傍のヌクレオソーム間の距離は大きく変動せず、DSB 修復分子の集積が広範囲に拡大することが示唆された。

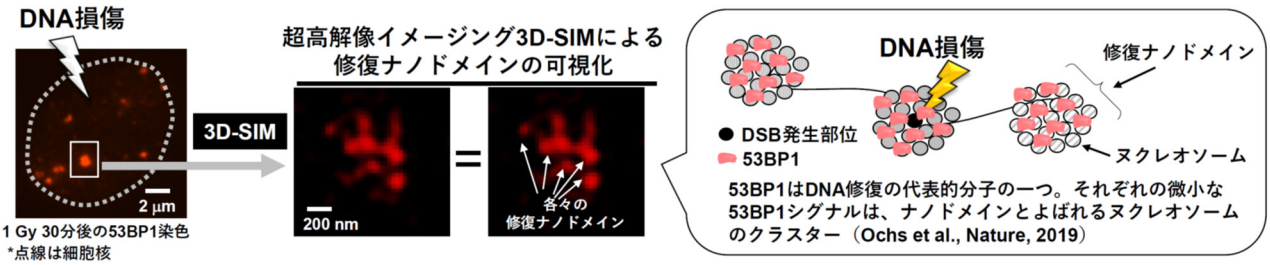


図 1. 超高解像イメージング 3D-SIM による 53BP1 ナノドメインの可視化
RPE 細胞に対し、1 Gy の X 線を照射し、30 分後の 53BP1 シグナルを 3D-SIM OMX を用いて超高解像画像を取得した。

2. 53BP1 欠損時の DNA 修復応答を補填する RAP80

次に 53BP1 が欠損している細胞での DNA 修復分子の応答性を解析したところ、53BP1 欠損細胞では RAP80（UIMC1：ubiquitin interaction motif containing 1）が異常に集積していることが見出された（図 2A）。RAP80 も DNA 修復分子として知られていることから、この結果は、正常細胞では 53BP1 が意図的に RAP80 の集積を抑制し、53BP1 が欠損した際にのみ、別の修復分子である RAP80 が集積され 53BP1 の機能を補填している可能性が考えられた。正常細胞において 53BP1 がどのように RAP80 を抑制しているか明らかにするため、53BP1 変異体を発現させた細胞で RAP80 集積を解析した結果、53BP1 における Tudor/UDR 領域が RAP80 の集積抑制に必要であることが明らかになった（図 2A、B）。

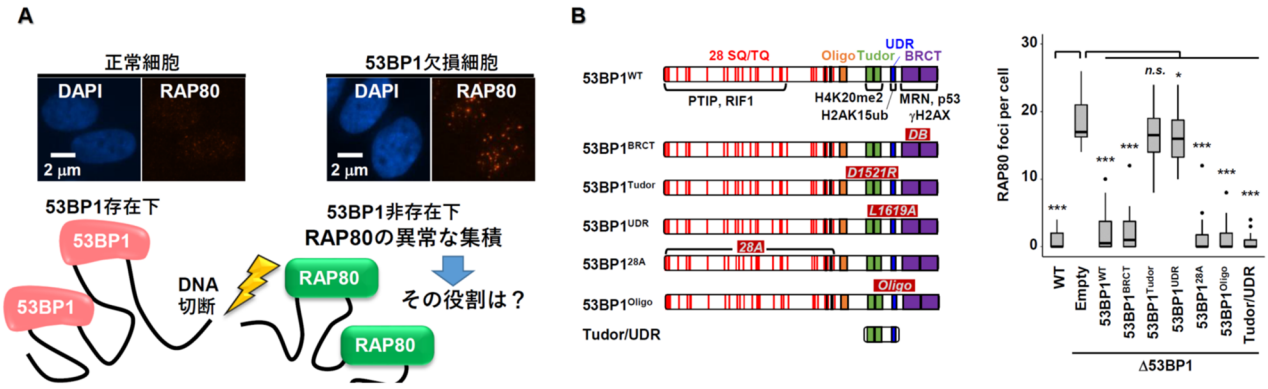


図 2. DNA 修復分子 53BP1 欠損下における RAP80 集積メカニズム

A) 野生型または 53BP1 欠損の RPE 細胞に対して 1 Gy の X 線を照射し、30 分後の RAP80 foci を検討した。

B) 53BP1 欠損の RPE 細胞に対して各種 53BP1 変異体を発現し、1 Gy の X 線を照射 30 分後の RAP80 foci を検討した。統計は two-tailed Student’s t-tests によって行い、P 値は、*P<0.05、***P<0.001 を示す。F 検定が棄却された場合は、Mann-Whitney U 検定を用いた。 また、ボンフェローニ補正に従って P 値の補正を行った。

3. 53BP と RAP80 の同時欠損により生じる異常な DNA 修復クロマチン構造体

53BP1 と RAP80 が DNA 修復部位に相補的関係で集積していたことから、我々は 53BP1/RAP80 が適切に DNA 損傷部位に集積することでクロマチン構造を維持している可能性を考えた。53BP1 単独欠損および 53BP1/RAP80 二重欠損時における DSB 近傍のクロマチン状態を解析するため、53BP1 同様、DSB 周囲でリン酸化され、ナノドメインを構築する H2AX リン酸化体（γH2AX）を指標として超高解像イメージング解析を行った。その結果、53BP1 または RAP80 単独欠損では有意な変化は認められなかったものの、53BP1/RAP80 二重欠損細胞ではナノドメインの形成範囲が異常に拡大し、それぞれのナノドメインが疎な状態になっていることを見出した（図 3）。以上の解析から、正常細胞では DNA 損傷に伴い適切なクロマチン構造が構築されるが、53BP1/RAP80 二重欠損細胞ではそれらのクロマチン構造形成が破綻することが明らかになった。つまり、正常細胞では適正なクロマチン構造を構築することで、DNA 修復の正確性を担保している可能性が示唆された。今後は 53BP1/RAP80 二重欠損時における異常なクロマチン構造が、DNA 修復の正確性に影響を及ぼすかどうかを、欠失変異および染色体転座の解析を行うことで明らかにする。

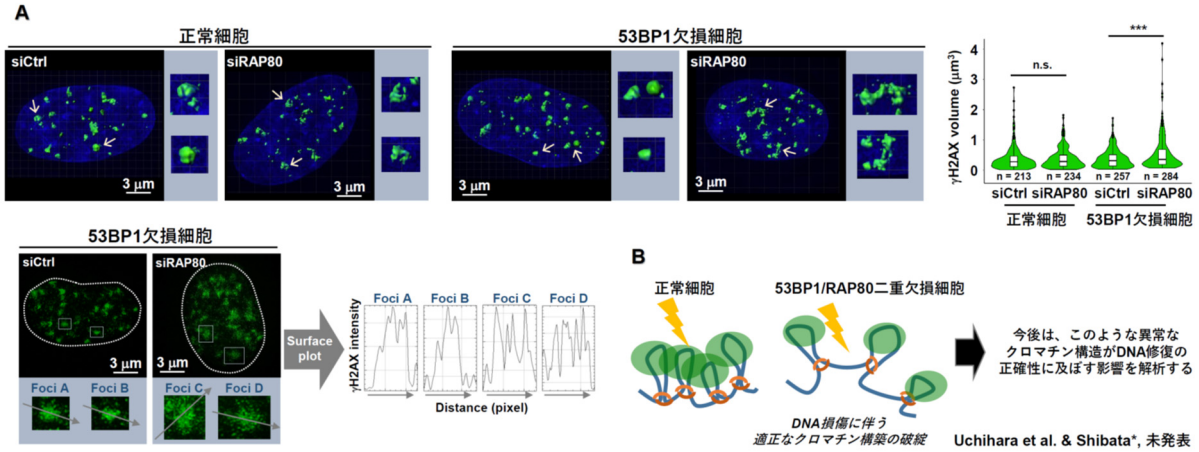


図 3. 53BP1 および RAP80 同時欠損下におけるγH2AX foci 構造

A) 3D-SIM OMX 顕微鏡によるγH2AX foci 構造の可視化。RPE 細胞に対して 1 Gy の X 線を照射し、30 分後のγH2AX foci を検討した。統計は two-tailed Student’s t-tests によって行い、P 値は、***P<0.001 を示す。

B) モデル図。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、群馬大学未来先端研究機構の内原脩貴および東京大学大学院医学系研究科附属疾患生命工学センターの安原崇哲である。

文　献

1) Shibata A, Moiani D, Arvai AS, Perry J, Harding SM, Genois MM, Maity R, van Rossum-Fikkert S, Kertokalio A, Romoli F, Ismail A, Ismalaj E, Petricci E, Neale MJ, Bristow RG, Masson JY, Wyman C, Jeggo PA, Tainer JA. DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities, Mol Cell. 2014 Jan 9;53(1):7-18. doi: 10.1016/j.molcel.2013.11.003. Epub 2013 Dec 5. PMID: 24316220

2) Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe SY, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, Shibata A. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation, Cell Rep. 2017 Jan 10;18(2):520-532. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.042. PMID: 28076794

3) Biehs R, Steinlage M, Barton O, Juhász S, Künzel J, Spies J, Shibata A, Jeggo PA, Löbrich M. DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination, Mol Cell. 2017 Feb 16;65(4):671-684.e5. doi: 10.1016/j.molcel.2016.12.016. Epub 2017 Jan 26. PMID: 28132842

4) Yasuhara T, Kato R, Hagiwara Y, Shiotani B, Yamauchi M, Nakada S, Shibata A, Miyagawa K. Human Rad52 Promotes XPG-Mediated R-loop Processing to Initiate Transcription-Associated Homologous Recombination Repair, Cell. 2018 Oct 4;175(2):558-570.e11. doi: 10.1016/j.cell.2018.08.056. Epub 2018 Sep 20. PMID: 30245011

5) Shibata A, Jeggo PA. Roles for 53BP1 in the repair of radiation-induced DNA double strand breaks, DNA Repair (Amst). 2020 Sep;93:102915. doi: 10.1016/j.dnarep.2020.102915. PMID: 33087281

6) Kilic S, Lezaja A, Gatti M, Bianco E, Michelena J, Imhof R, Altmeyer M. Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments, EMBO J. 2019 Aug 15;38(16):e101379. doi: 10.15252/embj.2018101379. Epub 2019 Jul 1. PMID: 31267591

7) Pessina F, Giavazzi F, Yin Y, Gioia U, Vitelli V, Galbiati A, Barozzi S, Garre M, Oldani A, Flaus A, Cerbino R, Parazzoli D, Rothenberg E, d'Adda di Fagagna F. Functional transcription promoters at DNA double-strand breaks mediate RNA-driven phase separation of damage-response factors, Nat Cell Biol. 2019 Oct;21(10):1286-1299. doi: 10.1038/s41556-019-0392-4. Epub 2019 Sep 30. PMID: 31570834

8) Clouaire T, Rocher V, Lashgari A, Arnould C, Aguirrebengoa M, Biernacka A, Skrzypczak M, Aymard F, Fongang B, Dojer N, Iacovoni JS, Rowicka M, Ginalski K, Côté J, Legube G. Comprehensive Mapping of Histone Modifications at DNA Double-Strand Breaks Deciphers Repair Pathway Chromatin Signatures, Mol Cell. 2018 Oct 18;72(2):250-262.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2018.08.020. Epub 2018 Sep 27. PMID: 30270107

9) Arnould C, Rocher V, Finoux AL, Clouaire T, Li K, Zhou F, Caron P, Mangeot PE, Ricci EP, Mourad R, Haber JE, Noordermeer D, Legube G. Loop extrusion as a mechanism for formation of DNA damage repair foci, Nature. 2021 Feb;590(7847):660-665. doi: 10.1038/s41586-021-03193-z. Epub 2021 Feb 17. PMID: 33597753