

DNA複製時のDNA切断からゲノム安定性を守る機構

東京大学定量生命科学研究所ゲノム再生研究分野

佐々木 真理子

DNAを正確に複製することは、たった一つの受精卵から全く同じ遺伝情報を持つ数十兆個もの細胞を作り出すために必要である。しかしDNA複製装置は、鋳型鎖上に存在する障害、細胞内の環境変化(ヌクレオチドの欠乏など)、がん遺伝子の発現異常など様々な要因によってストレスを受け止まってしまう(図1A)。この際、この複製ストレスを速やかに解消できなければ、DNA二重鎖切断(DNA double-strand break, DSB)が生じる。DSBが修復されないまま細胞周期が進行すると、遺伝情報が失われる結果、細胞死が誘導される。またDSBは誤って修復されると、DNA配列の重複や欠失、染色体転座などを含むゲノム再編成を誘導しゲノムを不安定化し、ガンや多くの病気を引き起こす(Sasaki et al., Nature Reviews Molecular Cell Biology 2010)(図1B)。複製時は細胞周期の中で最もDSBができやすいことから、このDSB修復機構を明らかにすることはがんや多くの疾患の発症機構を明らかにするためにも重要である。

先行研究から、G1期において生じたDSBはDSB末端を直接繋ぎ合わせる非相同末端結合によって、G2/M期において生じたDSBはNHEJあるいは姉妹染色分体上の相同配列を用いた相同組換えによって修復されることが分かっている(図2)。しかし複製時には複製阻害によってDSBができやすくゲノム安定性が最も脆弱になるにもかかわらず、その修復機構は不明である。申請者は、出芽酵母のリボソームRNA遺伝子(rDNA)領域を用い

て、複製阻害時のDSB修復機構を明らかにする研究に従事している。

出芽酵母のrDNA領域は、約150個のrDNA配列が縦列に並んだりリピート領域である(図3)。rDNA配列内には複製阻害点が存在し、複製阻害が高頻度で起こる(図3)。さらに複製阻害の結果、高頻度のDSBが生じることが知られていたにもかかわらずその修復機構に関する研究は手付かずの状態であった。そこで申請者は先行研究においてrDNA領域で生じるDSBの修復過程を明らかにするため、DSB及びその修復中間体をDNAレベルで解析する実験系を立ち上げた。次に、相同組換えや非相同末端結合などの既知のDSB修復経路が複製阻害時のDSB修復に関与するかどうかを調べた。その結果、以下のことを明らかにした。

- 複製阻害時のDSB修復には既知のDSB修復因子は必要ではなく、DSBは新規の経路によって修復される(図2)。
- 複製装置の構成因子であるCtf4タンパク質は、新規DSB修復経路においてDSBを正確に修復するために重要である。
- Ctf4タンパク質が欠損すると、DSBはG2/M期で作用する相同組換え経路によって直されるようになるが、DSB修復に伴ってゲノム再編成が起きる。Ctf4タンパク質は危険な相同組換え経路を抑制することによって、複製阻害時のDNA切断からゲノム安定性を守るために必要である。

これらの成果によって、複製阻害時のDSB修復機構の解明において重要な第一歩を踏み出すことができた(2016年第88回日本遺伝学会においてBest Papers賞を受賞; Sasaki and Kobayashi,

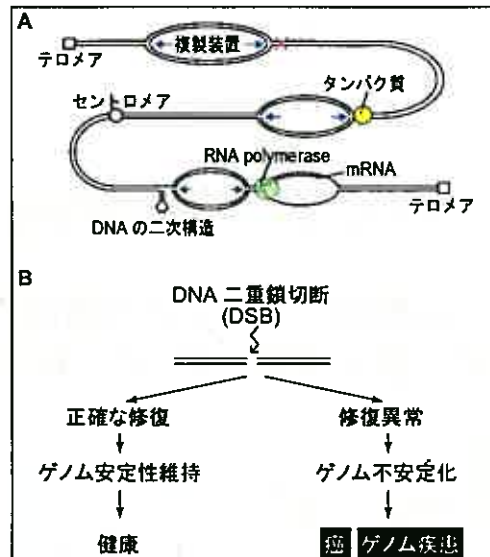


図1. DNA複製阻害によって生じるDSBに起因する病気。(A)DNA複製フォークの進行は鋳型鎖上に存在する様々な障害、ヌクレオチドの欠乏、がん遺伝子の発現異常などさまざまな要因によって阻害され、DSBができやすくなる。(B)DSBは誤って直されると、ゲノム不安定化を引き起こし、がんや多くのゲノム疾患を引き起こす。よって、複製阻害時のDSB修復機構を解明することは重要である。

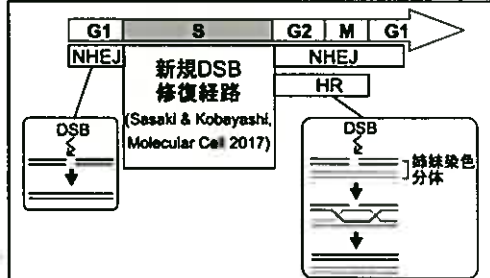


図2. DSB修復経路 G1期に生じたDSBは非相同末端結合(non-homologous end-joining)によって、G2/M期に生じたDSBは相同組換え(homologous recombination)によって直されることが分かっている。S期において複製阻害によって生じるDSBの修復機構は不明であったが、申請者は先行研究において既知のDSB修復因子に依存しない新規の経路によってDSBが修復されることを明らかにした。

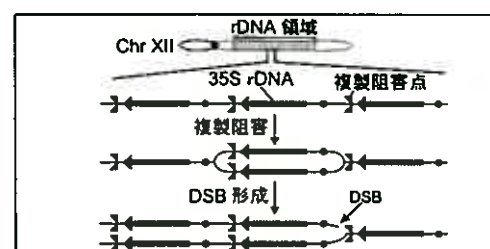
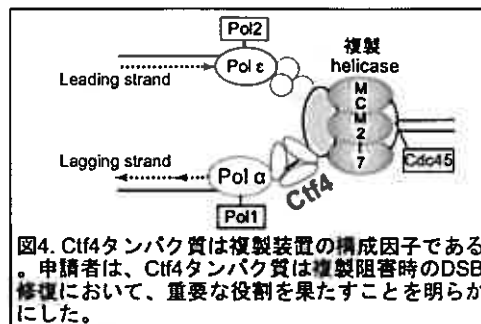


図3. 出芽酵母のrDNA領域 出芽酵母のrDNA領域では、複製阻害の結果高頻度でDSBが生じることから、複製阻害時のDSB修復機構を解明するためのモデル領域である。

Ctf4 タンパク質は複製装置の構成因子であり、鋳型 DNA を解く複製ヘリカーゼと DNA 合成を担う DNA ポリメラーゼに結合することにより効率的な DNA 合成を促進する役割が知られている (図 4)。よって Ctf4 タンパク質は複製阻害が起きたとき複製因子を DNA 上に維持することによって、危険な相同組換え因子が DSB にアクセスすることを抑制しているのではないかとモデルを立てた。このモデルに基づく、繋ぎ止められた複製因子によって複製阻害時特異的な DSB 修復が促進されると予想される。本研究課題においては、Ctf4 タンパク質によって維持された複製因子が DSB 修復に関与するかどうかを調べることを目指した。



そこで、複製装置の構成因子の中から以下の因子を DSB 修復候補遺伝子とし、その DSB 修復における必要性を調べることを試みた。

POL1: ラギング鎖合成の開始を担う DNA ポリメラーゼαをコードする

POL32: ラギング鎖合成を担う DNA ポリメラーゼδをコードする

POL2: リーディング鎖合成を担う DNA ポリメラーゼεをコードする

CDC45: 鋳型 DNA を解くヘリカーゼをコードする

MRC1: DNA ポリメラーゼεとヘリカーゼを繋ぎ止める因子をコード

TOF1: DNA ポリメラーゼεとヘリカーゼを繋ぎ止める因子をコード

POL30: DNA ポリメラーゼδの DNA 鎖伸長能を促進する

これらの因子のうち *POL32* は増殖に必須ではないことから、遺伝子破壊株を構築し DSB 解析実験を行った。しかし、*pol32* 欠損株において DSB 修復欠損は見られなかった。

当初の計画では他の因子の DSB 修復への関与を解析する予定であった。しかし、他の因子は増殖に必須であることから、遺伝子欠損株を構築することができない。そのためこれらの因子の温度感受性変異株を用いて、DSB 修復への解析実験を行う必要があった。しかし温度感受性変異株を用いるためには、DSB 解析実験を行う直前までは変異株の許容温度で細胞を培養し、実験直前で温度を制限温度にシフトする必要があった。この温度変化によって、DSB 解析実験で行う細胞周期の同調効率が非常に低くなることが判明したため、実験を遂行することができなかった。今後は、植物ホルモンであるオーキシンを添加することによって急速なタンパク質分解を可能にするデグロンを用いて、温度シフトを介さずに候補因子の DSB 修復への関与を解析する予定である。

上記で述べたように必須遺伝子によってコードされる複製因子の DSB 修復への関与を調べるためには実験系の改善が必要であったことから、計画を変更する必要があった。新しい計画では、複製因子の rDNA 領域への結合を野生型と *ctf4* 遺伝子欠損株において比較することを目指した。Ctf4 が DSB 修復に必要な複製因子を DNA 上につなぎとめておくとしたら、その因子の rDNA 領域への結合は *ctf4* 遺伝子欠損株において減少すると予想される。そこで、Pol1, Pol2, Cdc45 の rDNA 領域への結合量をクロマチン免疫沈降法および定量 PCR 法を用いて野生型と *ctf4* 遺伝子欠損株において調べた。すると、Pol2 と Cdc45 の結合量には差は見られなかったが、Pol1 の結合は *ctf4* 遺伝子欠損株において低下していた。このことから、Pol1 を含む DNA ポリメラーゼαが DSB 修復において重要な役割を果たす可能性が示唆された。今後、Pol1 の関与をデグロンシステムを用いて解析する予定である。上記の成果の一部は、以下の学会で発表しており高い評価を得ることができた。

佐々木真理子

DNA 複製阻害時の DNA 二重鎖切断修復機構の解明

第 41 回日本分子生物学会 (2018.11)

Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi.

A replisome component Ctf4 suppresses end resection of DNA double-strand breaks at arrested replication forks.

11th 3R+3C International Symposium. (2018.11)

佐々木真理子、小林武彦

DNA 複製阻害時の DNA 二重鎖切断修復機構の解明

第 90 回日本遺伝学会 (2018.9)

Mariko Sasaki and Takehiko Kobayashi.

A replisome component Ctf4 suppresses end resection of DNA double-strand breaks at arrested replication forks.

Gordon Research Conference Genomic Instability, Hong Kong, China. (2018.07)

(ポスター発表にて Best poster 賞受賞)