

課題番号 31

## 相同組換え修復開始を導く新規 DNA 修復分子の機能解析

[1] 組織

代表者：柴田 淳史

(群馬大学先端科学研究指導者育成ユニット)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

新美 敦子 (群馬大学未来先端研究機構)

磯野 真由 (群馬大学重粒子線医学推進機構)

研究費：物件費 45 万円

[2] 研究経過

放射線照射は様々な細胞傷害を誘発するが、その中でも DNA 二本鎖の切断 (DNA double strand break: DSB) は細胞の運命を決定する最も重篤な損傷である。DSB は異なる二つの経路、非相同末端連結 (non-homologous end joining: NHEJ) と HR (homologous recombination: 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。これまでの申請者らの研究から、放射線照射により直接的に 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/MRE11 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 (Shibata et al, 2011; Shibata et al, 2014)。すなわち、G2 期細胞においては MRE11 の endonuclease 活性が resection を開始し、その下流において MRE11 の exonuclease 活性と EXO1 の exonuclease 活性が相互作用して resection を完了することが分かってきた。近年の研究から、転写活性部位周辺に DSB が生じた場合、resection を介した HR 経路への移行が起こりやすいことが報告されている。転写活性部位において CtIP と相互作用し resection を促進する因子として LEDGF が報告された (Daugaard et al, 2012)。平成 26 年度に加齢医学研究所共同研究において、受け入れ研究者である安井明教授に依頼し、LEDGF のホモログである HDGF2 をベイトとし、

GST-HDGF を用いて IP-MS スクリーニングを行った。その結果、RNA polymerase II (RNAPII) Elongation Complex 1 (REC1) が新規相互作用因子として同定された。申請者側では REC1 を siRNA によりノックダウンした細胞において HR 頻度の検討を行った。その結果、コントロール細胞と比較し約 50% 程度の HR 頻度の低下が認められた。また、siRNA を用いて REC1 をノックダウンした結果、放射線照射によって誘発される DNA-end resection のマーカーである RPA foci の顕著な低下が認められた。以上のことから REC1 は HR 経路における resection を促進する因子であることが示唆された。今後は、1) resection の中心分子である MRE11/CtIP との相互作用、2) 転写因子である REC1 がなぜ resection に関わるのか、という疑問に焦点を当て、研究の継続を予定している (図 1)。

さらに申請者らは、NHEJ から HR への移行の際に、NHEJ 側から何らかのシグナルが伝達され HR へと修復過程が移行するという仮説を立て、NHEJ と HR 因子間の相互作用の可能性について検討を進めている (図 2)。本テーマでは、NHEJ 側の中心因子の一つである XRCC4 に着目し、安井教授へ依頼し GST-XRCC4 をベイトとして IP-MS スクリーニングの実験を進行中である。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

GST-LEDGF をベイトとして IP-MS スクリーニングを行った結果、特に候補となるような分子の同定は出来なかった。そこで我々は LEDGF のホモログである HDGF2 をベイトとし、GST-HDGF を用いて IP-MS スクリーニングを行った。その結果、RNA polymerase II (RNAPII) Elongation Complex 1 (REC1) が新規相互作用因子として同定された。REC1 は LEDGF と相互作用することが 2015 年 1 月に報告されたことから、我々が同定した REC1 が細胞内において HDGF2 に相互作用している可能性が非常に高いと考えられる (Gerard et al, 2015; Tesina et al, 2015)。siRNA を用いて REC1 をノックダウンした結果、放射線照射によって誘発される DNA-end resection のマーカーである RPA foci の顕著な低下及び HR 頻度の低下が認められた。XRCC4 をベイトとした IP-MS スクリーニングの実

験は現在進行中であるが、本研究が達成することにより、今まで明らかにされてこなかった NHEJ から HR への相互連携の反応機構を明らかに出来ると考えている。

### (3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究により、相同組換え修復に関わる可能性がある因子を発見することが出来た。今後は分子生物学的手法を用い、REC1 の分子メカニズムの解明を目指す。相同組換え修復はがん治療の標的分子となり得る。今後はデータベース解析などと併せ、各種がん細胞内での REC1 遺伝子における変異率を解析する予定である。また、XRCC4 をベイトとしたスクリーニングで新たな相互作用因子を発見することが出来れば、NHEJ から HR への情報伝達という当該研究分野における新しい概念の提唱が出来ると考えている。

### [4] 成果資料

研究成果は現時点で未発表ある。

### 参考文献

Daugaard M, Baude A, Fugger K, Povlsen LK, Beck H, Sorensen CS, Petersen NH, Sorensen PH, Lukas C, Bartek J, Lukas J, Rohde M, Jaattela M (2012) LEDGF (p75) promotes DNA-end resection and homologous recombination. *Nature structural & molecular biology* **19**: 803-810

Gerard A, Segeral E, Naughtin M, Abdouni A, Charmeteau B, Cheynier R, Rain JC, Emiliani S (2015) The integrase cofactor LEDGF/p75 associates with Iws1 and Spt6 for postintegration silencing of HIV-1 gene expression in latently infected cells. *Cell host & microbe* **17**: 107-117

Shibata A, Conrad S, Birraux J, Geuting V, Barton O, Ismail A, Kakaroukas A, Meek K, Taucher-Scholz G, Loblrich M, Jeggo PA (2011) Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *The EMBO journal* **30**: 1079-1092

Shibata A, Moiani D, Arvai AS, Perry J, Harding SM, Genois MM, Maity R, van Rossum-Fikkert S, Kertokallio A, Romoli F, Ismail A, Ismalaj E, Petricci E, Neale MJ, Bristow RG, Masson JY, Wyman C, Jeggo PA, Tainer JA (2014) DNA double-strand

break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Molecular cell* **53**: 7-18

Tesina P, Cermakova K, Horejsi M, Prochazkova K, Fabry M, Sharma S, Christ F, Demeulemeester J, Debyser Z, De Rijck J, Veverka V, Rezacova P (2015) Multiple cellular proteins interact with LEDGF/p75 through a conserved unstructured consensus motif. *Nature communications* **6**: 7968

図1 相同組換え修復に対するREC1の関与

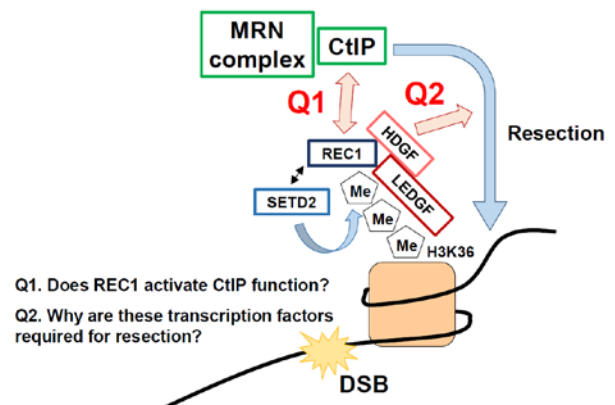


図2 NHEJからHRへの移行メカニズムの解明

