

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 4 月 15 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06604

研究課題名(和文) 相同組換えの制御メカニズムの解明と人工的コントロール方法の開発

研究課題名(英文) Suppression of homologous recombination by anti-recombinase

研究代表者

松崎 健一郎 (Matsuzaki, Kenichiro)

近畿大学・農学部・助教

研究者番号：10772147

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、申請者の発見した新規相同組換え抑制因子FIGNL1の機能を明らかにすることを旨として研究を行った。また、相同組換えの抑制の必要性についても理解できると期待して研究を進めた。作製したヒトFIGNL1ノックアウト細胞では、染色体分配の異常と染色体上へのRAD51の過剰な蓄積が見られた。実際に、RAD51を阻害することで、これらの欠損を抑制されたことから、RAD51が染色体上に蓄積することで、染色体分配を阻害している可能性を示している。本研究では、さらにFIGNL1がRAD51の蓄積をどのように抑制しているかについても明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相同組換えは、DNA二重鎖切断の修復機構であり染色体の安定性を維持する上で重要な経路である。相同組換えが正常に機能しない場合、染色体の不安定化から発がんにつながる。一方で、過剰な相同組換えの活性化も染色体の不安定化を起こす。このことから、細胞のがん化を防ぐには、相同組換えの制御機構を理解することが重要になってくる。さらに相同組換えの過剰な活性化が、どのように染色体を不安定化しているのか具体的な機構は不明である。本研究では、相同組換えを抑制するAnti-recombinaseの機能解析をととして、過剰な相同組換えによる発がんのメカニズムの理解を目指す。

研究成果の概要(英文)：Homologous recombination (HR) is essential mechanism to maintain genome stability. Homology search and strand invasion steps in HR are catalyzed by RAD51 protein. Formation of RAD51 filament on ssDNA is necessary to execute proper HR and restart of DNA replication forks, while inappropriate RAD51 filament formation causes genome instability. Hence, RAD51 filament formation is tightly suppressed by anti-recombinases, which promote the dissociation of RAD51. However, the mechanisms underlying genome instability caused by inappropriate RAD51 assembly and the suppression by anti-recombinases remain largely unknown. Here, we report a role for the human AAA+ ATPase, FIGNL1 as a novel anti-recombinase. FIGNL1-deficient cells show the excessive RAD51 recruitment. RAD51 filaments persist and cause defects in chromosome segregation. Our data suggest that recombination intermediates caused by inappropriate RAD51 assembly prevent chromosome segregation and induce genome instability.

研究分野：相同組換え

キーワード：相同組換え

1. 研究開始当初の背景

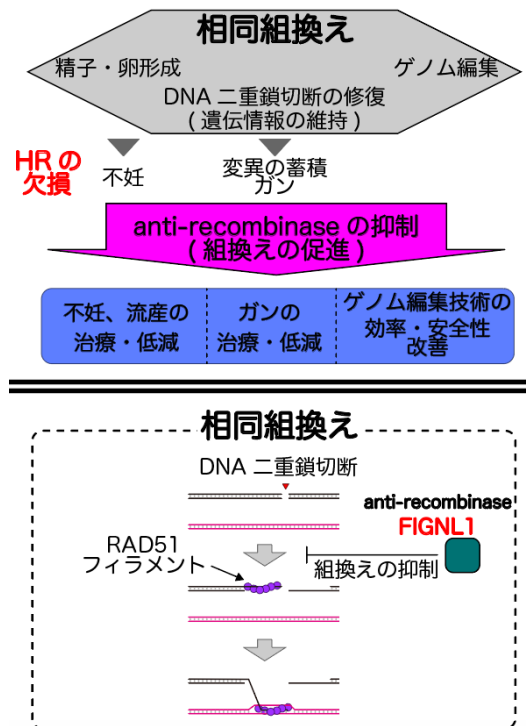
相同組換え(以下、組換え)は、染色体間での似た DNA 配列を組換える反応であり、生体内において二つの重要な役割を担っている。一つは、生体内において内的・外的要因によって起きてしまう DNA の切断を修復し、遺伝情報を正確に維持する役割である。このため相同組換えが機能しないと、遺伝情報の誤りが増加し、最終的にがん化につながる。もう一つの役割は、精子・卵を作る際に、父親由来の染色体と母親由来の染色体の繋ぎ換えである。この反応は精子・卵形成に必要不可欠であり、次世代において遺伝情報の多様性を増やす重要な役割を持つ。このため、相同組換えの機能不全は、不妊の原因の一つとされている。さらに、これらの役割とは別に、近年注目を浴びているゲノム編集において、相同組換えは、目的の DNA 配列を染色体上の相同な領域と入れ換えることに利用されている(右図上側)。

生体内において相同組換えの欠損は、発がん率の上昇、不妊の原因となっているため、相同組換えの制御メカニズムを明らかにすることは、がんや不妊の治療法開発の基盤的知識になると期待できる。また、現在研究が盛んに行われているゲノム編集では主に Cas9 等のヌクレアーゼによる DNA の切断に焦点が置かれているものが多く、その後の修復の段階を制御し効率や安全性を改善するような技術は未だほとんどない。この点において、申請者の研究計画は、相同組換えの制御という観点からのアプローチであり、既存の技術と組み合わせることにより効率面、安全面の根本的な改善が期待できる。

相同組換えは、RAD51 タンパク質が切断部の DNA 上にフィラメント状の多量体を形成し、他の染色体上から似た DNA 配列を探し出すことで行われる(右図下側)。通常、生体内において相同組換えの活性は低く抑えられており、必要な時に必要な場所でのみ機能するよう制限されている。相同組換えの抑制は、anti-recombinase(アンチリコンビナーゼ)と呼ばれタンパク質によって行われている。申請者は、既存の anti-recombinase と異なる活性を持つ新規ヒト anti-recombinase FIGNL1 を発見した (Matsuzaki *et al.*, Nature Communications 2019)。anti-recombinase FIGNL1 は、RAD51 を DNA 上から除去することによって相同組換えを抑制していることを申請者は発見した。

2. 研究の目的

FIGNL1 が、AAA+ ATPase であり直接 RAD51 に作用することまでは分かったが、FIGNL1 が具体的にどのように RAD51 フィラメントに作用し、相同組換えの抑制を行っているか、その構造、分子メカニズムは分かってはいない。そこで本研究では、以下の3つの方針に沿って研究を進めることで、anti-recombinase による相同組換えの抑制メカニズムの解明と人工的コントロール方法の確立を目指す。1) FIGNL1 の構造生物学的解析、2) FIGNL1 の遺伝学的解析、3) 相同組換えの人工的コントロール



3. 研究の方法

1) FIGNL1 の構造生物学的解析

FIGNL1 は、組換えを行う RAD51 タンパク質を DNA 上から除去することで相同組換えを抑制する。FIGNL1 を含め、anti-recombinase の構造に関する報告は極めて少なく、組換えを抑制する分子メカニズムの詳細は不明な点が多く残っている。そこで、FIGNL1、FIGNL1-RAD51 複合体の立体構造を X 線結晶構造解析により明らかにすることで、組換え抑制の分子メカニズムを理解する。

FIGNL1 は AAA+ ATPase であり、多量体を形成することが予想できる。また FIGNL1 は組換え因子 RAD51 と複合体を形成することも分かっている。そこで、FIGNL1 多量体、RAD51 との複合体の立体構造を決定することで、FIGNL1 の作用メカニズムを明らかにし、FIGNL1 が RAD51 をどのように DNA 上から除去し組換えを抑制しているか解明する。

2) FIGNL1 の遺伝学的解析

構造解析の裏付け及び構造解析がうまくいかなかった場合の予備案として、FIGNL1 変異体の活性測定、および細胞内・個体内での機能を明らかにする。特に触媒部位、多量体形成に必要な部位、RAD51 と相互作用に必要な部位に焦点を置いて変異体解析を行う。FIGNL1 の欠失変異体シリーズを作製し、多量体形成・RAD51 との複合体形成に必要な領域を絞りこむ。絞り込んだ領域のうち、高度に保存されているアミノ酸の点変異を作製、評価する。立体構造が明らかになっている場合は、タンパク質間相互作用のインターフェースにあたるアミノ酸領域に変異を導入する。同時に、変異体を培養細胞で発現させ、組換えの影響を評価する。組換えの効率は DR-GFP 実験と RAD51 の免疫染色によって評価する。

3) 相同組換えの人工的コントロール

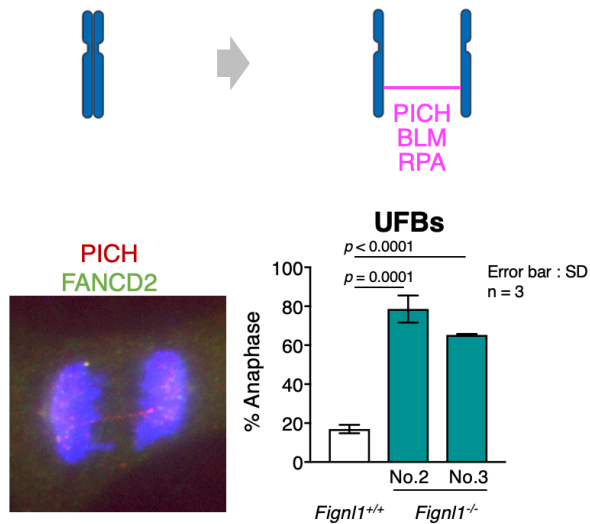
相同組換えの活性の低下は、細胞のがん化、不妊を引き起こす。つまり、組換え抑制因子 FIGNL1 を阻害することができれば、組換えを活性化し、細胞のがん化、不妊のリスクの低減が可能であると考えられる。また、FIGNL1 阻害により組換えをコントロールすることが可能になれば、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集の効率・安全性の改善することが期待できる。FIGNL1 の構造解析、遺伝学的解析の結果を踏まえ、FIGNL1 の活性を阻害するペプチドの作製と評価を行う。

4. 研究成果

FIGNL1 の精製と解析、FIGNL1 欠失細胞の作製と表現型の解析を中心に実験を進めた。FIGNL1 タンパク質の精製自体はできたものの、多量体の構造の結果までは得られなかった。一方で、FIGNL1 ノックアウト細胞の解析を行ったところ、予想していなかった染色体分配における異常を観察できた。この結果を踏まえ、FIGNL1 がどのように染色体分配に関与しているのかを明らかにしようと研究を進めた。FIGNL1 ノックアウト細胞のもう一つの表現型として、RAD51 タンパク質の染色体上への過剰な蓄積が観察できていたため、この過剰な RAD51 が染色体分配を妨害している可能性について検討した。RAD51 を阻害したところ、FIGNL1 ノックアウト細胞における、RAD51 の蓄積が抑えられ、さらに染色体分配の異常も抑制された。これらの結果は、RAD51 の持つ DNA 鎖交換活性が、姉妹染色体間の物理的な結合をつくってしまい、その結果、染色体分配の異常が起きている可能性を示している。DNA 複製時、染色体上の繰り返し配列上で複製フォークの進行が停止することがある、その際に RAD51 は複製フォークに呼び込まれ、複製フォークの保護と再開を行っている。解析の結果、FIGNL1 が存在

しない場合、複製フォークが再開した後も RAD51 が染色体上に残存することを発見した。以上の結果から、FIGNL1 は RAD51 を染色体上から取り除く活性をもつ anti-recombinase の一種であり、複製フォーク再開の際に RAD51 を染色体上から取り除くことで、染色体分配を保証する役割を持っていることがわかった。また、今回の結果は、複製フォークの進行、停止、再開に合わせて、タイミングよく RAD51 の局在を制御する何らかの分子メカニズムが存在することを示唆している。今後は、この制御がどのように行われているか明らかにしたい。

Ultra-fine bridges (UFBs)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Silva Nicola, Castellano-Pozo Maikel, Matsuzaki Kenichiro, Barroso Consuelo, Roman-Trufero Monica, Craig Hannah, Brooks Darren R., Isaac R. Elwyn, Boulton Simon J., Martinez-Perez Enrique	4. 巻 18
2. 論文標題 Proline-specific aminopeptidase P prevents replication-associated genome instability	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 1010025 ~ 1010025
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1010025	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuzaki Kenichiro, Kumatoriya Kenji, Tando Mizuki, Kometani Takashi, Shinohara Miki	4. 巻 12
2. 論文標題 Polyphenols from persimmon fruit attenuate acetaldehyde-induced DNA double-strand breaks by scavenging acetaldehyde	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 10300
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-14374-9	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松崎健一郎、篠原美紀
2. 発表標題 アセトアルデヒド誘導DNA損傷と修復メカニズムの解析
3. 学会等名 第26回 DNA複製・組換え・修復ワークショップ
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松崎健一郎、篠原美紀
2. 発表標題 アンチリコンビナーゼFIGL1によるRAD51フィラメント形成の抑制機構の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎健一郎、篠原美紀
2. 発表標題 アンチリコンビナーゼFIGNL1によるRAD51フィラメント抑制機構の解析
3. 学会等名 第45回 分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松崎健一郎、篠原美紀
2. 発表標題 Anti-recombinase FIGNL1によるRAD51フィラメント抑制の分子メカニズムと影響の解析
3. 学会等名 第 40 回染色体ワークショップ 第 21 回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------