

セントロメア・ペリセントロメア反復配列の DNA メチル化維持機構

Maintenance DNA methylation mechanism of centromeric & pericentromeric repeats

(分子生物学会推薦)

代表研究者 九州大学

鶴木 元香

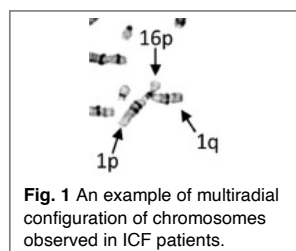
Kyushu University

Motoko UNOKI

Immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies (ICF) syndrome is a rare autosomal recessive disorder, the patients' chromosomes of which often show multiradial configurations fused via hypomethylated pericentromeric repeats. Previously, we reported *CDCA7* and *HELLS* as causative genes of the syndrome, and that their encoded proteins make a protein complex which facilitates non-homologous end-joining repair of DNA double-strand breaks. In this study, we discovered that the same complex is required for the accumulation of proteins on nascent DNA, including the DNMT1/UHRF1 maintenance DNA methylation complex as well as proteins involved in the resolution or prevention of R-loops comprising DNA:RNA hybrids and single-stranded DNA. Consistent with the hypomethylation state of pericentromeric repeats, the transcription and formation of aberrant DNA:RNA hybrids at the repeats were increased in *CDCA7* and *HELLS* knockout cells. Furthermore, the ectopic expression of RNASEH1, which resolves R-loops, reduced the accumulation of DNA damages at a broad range of genomic regions including pericentromeric repeats in these cells. Hence, we propose that hypomethylation due to inefficient DNMT1/UHRF1 recruitment at pericentromeric repeats by defects in the *CDCA7*/*HELLS* complex could induce centromeric/pericentromeric instability via ectopic expression and pathological R-loop formation, which may explain a part of the molecular pathogenesis of ICF syndrome including multiradial chromosomes.

研究目的

免疫不全、染色体の不安定化、顔貌異常を特徴とする immunodeficiency, centromeric instability, facial anomalies (ICF) 症候群は、セントロメア・ペリセントロメア反復配列の DNA 低メチル化とヘテロクロマチンの崩壊を伴う常染色体潜性（劣性）の遺伝病である。患者の活性化 B 細胞では、低メチル化したセントロメア・ペリセントロメア領域を介して異なる染色体同士が融合した分枝染色体（multiradial chromosome）が高頻度で認められるのも、本症候群の特徴である（Fig. 1）。代表研究者らは 2015 年に *CDCA7* と *HELLS* を本症候群の原因遺伝子として同定し¹、これらの遺伝子の変異が、二本鎖 DNA 切断（DSB）の非相同末端結合（non-homologous end joining: NHEJ）型修復



異常を引き起こすことを明らかにした²。しかしながら、ゲノム編集で作製した *CDCA7* 及び *HELLS* 欠損 HEK293 細胞では ICF 患者細胞同様にセントロメア・ペリセントロメア反復配列の DNA 低メチル化が認められたのに対し、NHEJ に必須の *Ku80* 変異細胞では低メチル化は惹起されなかった²。よって、*CDCA7* 及び *HELLS* の変異は、NHEJ の異常以外の機構で、低メチル化を引き起こすと考えられ、本研究ではその機構を明らかにすることで、当該領域の DNA メチル化維持機構を明らかにすることを目的とした。また、当該領域の低メチル化がどのように分枝染色体の形成に寄与するのかについても検討した。

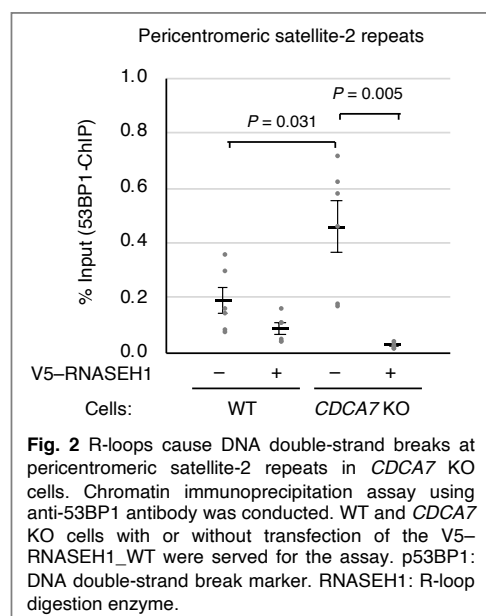
研究経過

これまでに代表研究者は、*CDCA7* 及び *HELLS* 欠損細胞に野生型タンパク質を再発現させても、一旦低下した DNA メチル化レベルは回復しないことから、これらのタンパク質は de novo DNA メチル化で

はなく、維持 DNA メチル化に関与することを明らかにしている²。CDCA7 と HELLS はクロマチンリモデリング複合体を形成することが報告されたことから、代表研究者は、同複合体がヌクレオソームをスライディングさせて、DNA メチル化維持機構に関与するタンパク質の新規合成 DNA 鎖上への集積を促進しているのではないかと仮説を立て、CDCA7 非存在下で新規合成 DNA 鎖上に集積できなくなるタンパク質を、野生型と CDCA7 欠損細胞を用いて、isolation of proteins on nascent DNA (iPOND)-MS/MS 法にて網羅的に同定した。その結果、CDCA7 欠損細胞では、DNA メチル化の維持に必須である DNMT1 と UHRF1 の新規合成 DNA 鎖上への集積が、野生型細胞と比較して 40~60%減少していることを見出した³。最近、ICF 症候群患者で DNA メチル化が低下している領域は後期 DNA 複製領域^{注1}であることが報告された（注 1：ペリセントロメアを含むヘテロクロマチン領域が多く含まれ、UHRF1 によるヒストン H3 のユビキチン化が DNA メチル化の維持に必須である領域であり、DNA 複製非共役的に DNA メチル化維持に関する一連のプロセスが起こる領域であることが昨年報告された）。UHRF1 がユビキチン化するヒストン H3 が含まれるヌクレオソームに巻き付いたヘミメチル化 DNA は DNMT1 の良い基質ではないことも報告されていることから、CDCA7/HELLS 複合体は、クロマチンリモデリングを介して、DNMT1/UHRF1 維持 DNA メチル化複合体が後期 DNA 複製領域にアクセスすることで、ヘミメチル化 DNA のメチル化を促進している可能性が強く示唆された。これは、クロマチンリモデリングと DNA メチル化維持機構を結びつける重要な知見である。一方昨年、申請者らの発表とほぼ同時期に、他グループから HELLS が DNA 複製非共役型の DNA メチル化維持機構に関与していることが報告され、申請者の仮説が実証された。

また代表研究者は、CDCA7 と複合体を形成し、CDCA7 非存在下で新規合成 DNA 鎖上に集積が減少するタンパク質として、厳しい選択条件を設けて、DNMT1 と UHRF1 以外に 6 つのタンパク質を同定した^{2,3}。これらのタンパク質は CDCA7 の直接的な相互作用タンパク質である可能性が高いと考えられた。代表研究者は、この中に R ループ^{注2}（注 2: DNA:RNA ハイブリッドと 1 本鎖 DNA からなる 3 重鎖構造）の解消に重要な RNA ヘリカーゼである DDX21 と R

ループ形成阻害に働く SUPT16H^{注3}（注 3: ヒストンシャペロンである FACT 複合体の構成因子）が含まれていることに気がつき、ICF 症候群の分子病態に R ループ形成が関与している可能性を考えた。線虫 (*Caenorhabditis elegans*) ではヒストン H3K9 のメチル化が反復配列のヘテロクロマチン維持に重要であり、線虫が持つ 2 つのヒストン H3K9 メチル化酵素の二重変異体では、反復配列のヘテロクロマチン構造が弛緩して異所性の転写が起こり、これが R ループを形成して、DSB の原因となることが報告されていた。そこで代表研究者は、ICF 症候群患者細胞でも同様のことが起きているのではないかと考え、モデル細胞である CDCA7 及び HELLS 欠損細胞において低メチル化が顕著なペリセントロメア領域に R ループが形成されていないか調べたところ、当該領域から通常は転写されない RNA が異常に転写され、R ループが当該領域に蓄積しており、さらに DSB も当該領域に蓄積していることがわかった³。R ループを解消する RNASEH1 を外来性に発現させると、ペリセントロメア領域の DSB が減少したことから、ペリセントロメアに生じた異所性の R ループが、DSB の原因であることがわかった (Fig. 2)。本研究成果は、2020 年 10 月に Scientific Reports 誌に掲載された³。



考察

ICF 症候群におけるセントロメア・ペリセントロメア領域の DNA 低メチル化が、染色体不安定性の原因であることは以前から示唆されてきたが、今回、DNA 低メチル化が異所性の転写を引き起こし、それ

が異常な R ループ形成を介して DSB の原因となることで、染色体の脆弱性につながるという詳細なメカニズムを明らかにすることができた。なお、DSB の主要な修復機構は、NHEJ と相同組換え (homologous recombination: HR) であることが知られており、NHEJ は DNA 断端を結合するだけなので塩基変異が生じやすいが^{注4} (注4: ペリセントロメア反復配列を含む遺伝子非コード領域の修復には通常は大きな問題はないと考えられる)、HR は姉妹染色分体を鋳型として修復に使用するため、塩基変異が生じにくい^{注5} (注5: 例外的に反復配列を修復する場合には、相同配列が並んでいるために間違いが生じ得る) という特徴がある。なお、ヒトにおいてペリセントロメアを構成するサテライト2反復配列は5塩基対を1単位とし、これが染色体によっては数100万塩基対にわたって繰り返しており、特筆すべきこととして、異なる染色体のペリセントロメア反復配列も高い相同性を有している。また、NHEJ は細胞周期に関係なく使用される修復経路であるのに対し、HR は姉妹染色分体上の相同配列が必要であることから、S 期から G2 期に使用される修復機構である。R ループを伴う DSB は HR で主に修復されることが報告されており、また *CDCA7* 及び *HELLS* の変異は NHEJ の効率を低下させて HR 優位な状況を作り出すことが予測される²。よって、*CDCA7* 及び *HELLS* 欠損細胞では、姉妹染色分体が存在しない G1 期においてペリセントロメア反復配列に DSB が起こった場合に、異なる染色体のペリセントロメア反復配列を鋳型として修復が試みられ、中間体 (ホリデイジャンクション) が上手く解離できないために、ペリセントロメア領域を介した染色体融合が生じる可能性が考えられる (Fig. 3)。分枝染色体の生成機序は長いこと不明であったが、本研究により、DNA 損傷修復異常が絡んだ現象であることが見えてきたことは、ICF 症候群の分子病態機序の全貌解明に向けた大きな前進であると考えられる。申請者はここまでの研究成果と考察を総説としてまとめ、*Genes to Cells* 誌に発表した⁴。

参考文献

1. P. E. Thijssen, Y., ..., **M. Unoki**, et al. : Mutations in *CDCA7* and *HELLS* cause immunodeficiency-centromeric instability-facial anomalies syndrome, *Nat. Commun.*, **6**, 7870, 2015.

2. **M. Unoki**, H. Funabiki, G. Velasco, C. Francastel, H. Sasaki : *CDCA7* and *HELLS* mutations undermine non-homologous end joining in centromeric instability syndrome, *J. Clin. Invest.*, **129**, 78-92, 2019.
3. **M. Unoki**, J. Sharif, Y. Saito, G. Velasco, C. Francastel, H. Koseki, H. Sasaki : *CDCA7* and *HELLS* suppress DNA:RNA hybrid-associated DNA damage at pericentromeric repeats, *Sci. Rep.*, **10**, 17865, 2020.
4. **M. Unoki**: Chromatin remodeling in replication-uncoupled maintenance DNA methylation and chromosome stability: Insights from ICF studies. *Genes Cells*, 2021, in press.

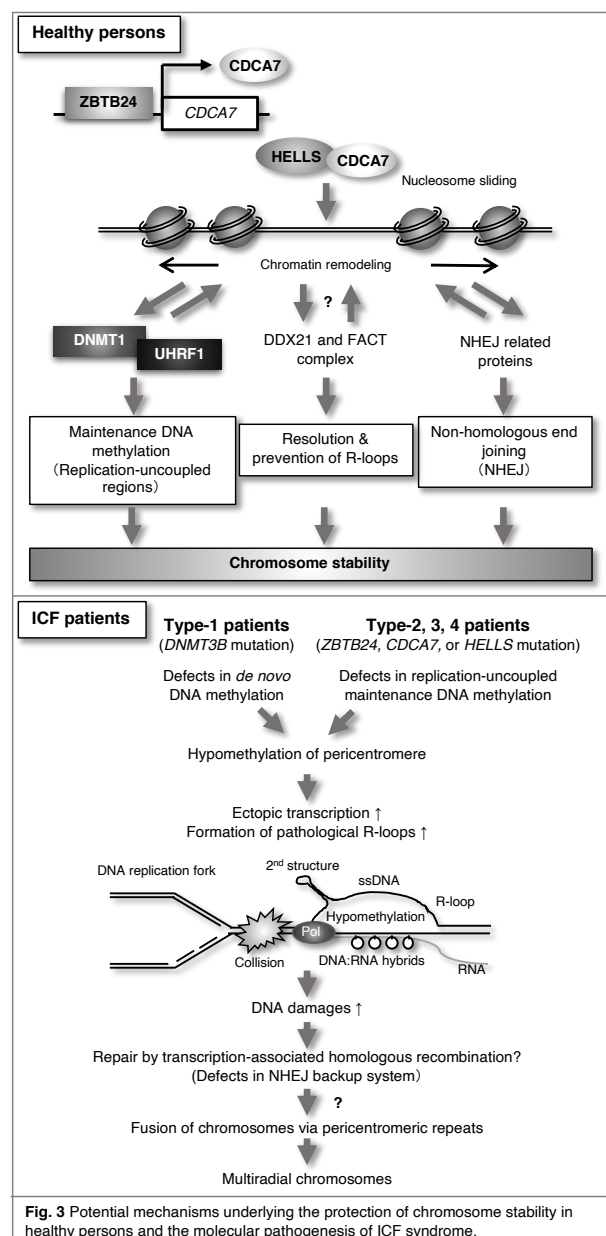


Fig. 3 Potential mechanisms underlying the protection of chromosome stability in healthy persons and the molecular pathogenesis of ICF syndrome.

研究の発表

誌上発表

1. **M. Unoki**, J. Sharif, Y. Saito, G. Velasco, C. Francastel, H. Koseki, H. Sasaki: CDCA7 and HELLS suppress DNA:RNA hybrid-associated DNA damage at pericentromeric repeats, *Sci. Rep.*, **10**, 17865, 2020.
2. G. Velasco, D. Ulveling, S. Rondeau, P. Marzin, **M. Unoki**, V. Cormier-Daire, C. Francastel: Interplay between histone and DNA methylation seen through comparative methylomes in rare mendelian disorders. *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 3735, 2021.
3. **M. Unoki**: Molecular pathogenesis of ICF syndrome. *IMPACT* (Science Impact Ltd), 2021, in press.
4. **M. Unoki**: Chromatin remodeling in replication-uncoupled maintenance DNA methylation and chromosome stability: Insights from ICF studies. *Genes Cells*, 2021, in press.

口頭発表

1. **鵜木元香**: セントロメア・ペリセントロメア特異的維持メチル化機構の解明を目指して、新学術領域研究「多様かつ堅牢な細胞形質を支える非ゲノム情報複製機構」第1回領域会議、札幌、2019年9月。
2. **M. Unoki**, H. Funabiki, H. Sasaki: Relationship between the CDCA7/HELLS chromatin remodeling complex and NHEJ in molecular pathogenesis of ICF syndrome、第14回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム、大阪、2019年10月。
3. **鵜木元香**、船引宏則、佐々木裕之: CDCA7/HELLS クロマチンリモデリング因子とNHEJ~ICF症候群の分子病態の解明に向けて~、第25回DNA複製・組換え・修復ワークショップ、奈良、2019年11月。
4. **M. Unoki**, H. Funabiki, H. Sasaki: Role of the CDCA7/HELLS chromatin remodeling complex in genome stability、第42回日本分子生物学会、福岡、2019年12月。
5. **鵜木元香**、船引宏則、佐々木裕之: ICF症候群の分子病態におけるCDCA7/HELLS複合体と非相同末端修復の関係性、第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会、新潟、2019年12月。

6. **鵜木元香**: 染色体の安定性はどのように維持されているのか?~ICF症候群の原因遺伝子の機能解析から見えてきたこと~、ダイバーシティCHIBA 研究環境促進コンソーシアム「スキルアップセミナー」、千葉、2020年2月。
7. **鵜木元香**: 染色体の安定性はどのように維持されているのか?~ICF症候群の原因遺伝子の機能解析から見えてきたこと~、浜松医科大学セミナー、浜松、2020年2月。
8. **鵜木元香**: 染色体の安定性はどのように維持されているのか?~ICF症候群の原因遺伝子の機能解析から見えてきたこと~、加齢研研究会セミナー、仙台、2020年2月。
9. **M. Unoki**, H. Sasaki: CDCA7 and HELLS suppress DNA:RNA hybrid-associated DNA damage at pericentromeric repeats、日本人類遺伝学会第65回大会、オンライン、2020年11月。
10. **鵜木元香**: CDCA7とHELLSはペリセントロメア反復配列のDNA:RNAハイブリッドに起因するDNA損傷を抑制する、日本環境変異学会第49回大会、沼津、2020年11月。
11. **鵜木元香**: クロマチンリモデリングと染色体安定性、蛋白研セミナー「多角的な視点によるタンパク質修飾の機能解明」、オンライン、2021年2月。
12. **鵜木元香**: クロマチンリモデリングと維持DNAメチル化そして染色体安定性、新学術領域研究「全能性&非ゲノム複製」領域合同若手研究会2021、オンライン、2021年4月。

ポスター発表

1. **M. Unoki**, J. Sharif, Y. Saito, H. Sasaki: CDCA7 and HELLS suppress DNA:RNA hybrid-associated DNA damage at pericentromeric repeats、第43回日本分子生物学会年会、オンライン、2020年12月。
2. **鵜木元香**: CDCA7とHELLSはペリセントロメア反復配列のDNA:RNAハイブリッドに起因するDNA損傷を抑制する、第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会、オンライン、2021年1月。
3. **鵜木元香**: クロマチンリモデリングと染色体の安定性~ICF症候群の原因遺伝子の機能解析から見えてきたこと~、第14回エピジェネティクス研究会、オンライン、2021年3月。