

DNA 二重鎖切断の修復過程において R-loop 構造を保護する 機構の解明

The mechanism protecting R-loops during DNA double-strand break repair

(日本分子生物学会推薦)

代表研究者	東京大学	安原 崇哲	The University of Tokyo	Takaaki YASUHARA
協同研究者	マサチューセッツ総合病院 群馬大学	Lee ZOU	Massachusetts General Hospital Gunma University	Lee ZOU Atsushi SHIBATA

R-loops, consisting of ssDNA and DNA-RNA hybrids, are potentially vulnerable unless they are appropriately processed. Recent evidence suggests that R-loops can form in the proximity of DNA double-strand breaks (DSBs) within transcriptionally active regions. Yet, how the vulnerability of R-loops is overcome during DSB repair remains unclear. Here, we identify RAP80 as a factor suppressing the vulnerability of ssDNA in R-loops and chromosome translocations and deletions during DSB repair. Mechanistically, RAP80 prevents unscheduled nucleolytic processing of ssDNA in R-loops by CtIP. This mechanism promotes efficient DSB repair via transcription-associated end-joining dependent on BRCA1, Polθ, and LIG1/3. Thus, RAP80 suppresses the vulnerability of R-loops during DSB repair, thereby precluding genomic abnormalities in a critical component of the genome caused by deleterious R-loop processing.

研究目的

DNA 損傷は日々我々のゲノムを脅かしており、損傷の中でも特に DNA 二重鎖切断は重篤なゲノム異常を誘導するため、正確に修復する必要がある。ヒト細胞において DNA 二重鎖切断は、主に非同相末端結合と非同相組換え修復機構の2つで修復されるが、それらの間の経路選択は長年の議論の的となっている。経路選択は周辺クロマチンの状況に依存すると考えられてきたが、近年では、RNA が非同相組換え修復を推進することなどが明らかとなり¹、二重鎖切断周辺の RNA 転写の活性化度合いが経路選択に影響する可能性が議論されてきた²。最近では、二重鎖切断周辺に RNA と DNA のハイブリッド二重鎖構造ができること、さらにはそれらが DNA 修復機構に影響を与えることが明らかになりつつある³⁻⁵。申請者らは最近、RNA 転写活性化領域において DNA 二重鎖切断 (DSB) が発生した際に、R-loop 構造、すなわち、DNA/RNA ハイブリッド二重鎖と、一重鎖 DNA からなる構造の蓄積と、その解消が起こることを発

見した⁶。さらにこの R-loop 構造の処理を起点として転写共役型非同相組換え修復という未だ知られていなかった修復経路が誘導されることを明らかにした。これらの修復経路が機能しない場合には重篤なゲノム異常が発生することも判明した。

一般に、R-loop 構造の一重鎖 DNA 領域はヌクレアーゼによる切断の標的となることから、R-loop 構造はゲノム不安定性の原因となると考えられている⁷。しかしながら、この度我々の発見した転写共役型非同相組換え修復においては、R-loop 構造の一重鎖 DNA 領域は何らかの機構によってヌクレアーゼによる切断から保護されていることが示唆された。

当申請研究においては、それらがどのような分子メカニズムによって保護されているのかを解明し、DSB 修復中に R-loop 構造がさらなるゲノム不安定性の原因となることを防ぐメカニズムを解明することを目的とした。RNA 転写活性化領域は我々の広大なゲノム内で最も重要な部位であるため、そのような領域におけるゲノム異常の発生を抑制する機構の

解明は非常に重要であると考えられる。これらの機構を解明することで、がんなどに頻繁に見られるようなゲノム異常がどのように発生するかについての、根源的なメカニズムの解明につながると考えられた。

研究経過

R-loop 構造の一重鎖 DNA 領域はヌクレアーゼによる切断の標的となりうることから、ゲノム不安定性の原因となると考えられていたが、我々の発見した DSB 修復メカニズムにおいては、R-loop 構造の一重鎖 DNA 領域は相同組換え修復の過程で機能的に利用されており、切断されずに残存していることが示唆された。このことは、DSB 後に生じた R-loop 構造中の一重鎖 DNA 領域は何らかの機構によってヌクレアーゼによる切断から保護されていることを示唆する。そこで、当申請研究においては、DSB 後に発生した R-loop 構造がどのような機構によって保護されているのかを、1) レーザーを使用した R-loop 構造の可視化システム、2) DSB 修復効率、ゲノム不安定性の解析アッセイ、を通じて解明し、DSB 修復中に R-loop 構造がさらなるゲノム不安定性の原因となることを防ぐメカニズムを解明することを目的として研究を進めた。

申請者は、細胞生物学的な手法とは別のアプローチとしてがんゲノムデータベース (The Cancer Genome Atlas; TCGA) を解析するための独自のプラットフォームを継続的に開発してきた⁸⁻¹¹。転写共役型 DSB 修復に関連する新たな因子を探索するため、申請者が独自に開発したがんゲノムデータベース解析系で、ゲノム上の遺伝子領域、つまり転写活性化領域に発生する欠失や遺伝子融合などのゲノム異常を抑制する因子をスクリーニングしたところ、RAP80 とよばれるユビキチン鎖を認識して結合する分子を同定した。

上述のデータベースで、RAP80 の発現低下は、a) 遺伝子領域の欠失サイズの増加、b) 遺伝子融合頻度の増加を誘導することが判明したことから、まず転写活性化部位における DSB 誘導後の欠失サイズの測定系を用いてそれらの結果を検証した。この実験には I-Sce-I と呼ばれる制限酵素を用いてゲノム上の特定の部位に DSB を誘導できる細胞株¹²を使用した。この DSB 部位は CMV プロモーターによる転写が活発な領域に位置し、転写共役型 DSB 修復を検出することができる。この DSB 部位で生じる欠失の増

加を、PCR とその後のシーケンスで検出し、RAP80 の欠損によって欠失サイズが増加するかを検証したところ、RAP80 の発現を低下させた細胞では有意に欠失サイズが増加することが判明した。

次に、遺伝子融合頻度測定するため、G1 期の細胞に放射線を照射して DSB を誘導し、その後の遺伝子融合頻度を M 期細胞の dicentric を指標に検出する系¹³を用いて RAP80 の影響を解析した。その結果、RAP80 欠損細胞株では遺伝子融合の頻度が有意に増加していることが判明した。

過去の研究で、RAP80 を欠損させると、ヌクレアーゼ活性化因子 CtIP が DSB 部位に過剰に蓄積することが報告されており¹⁴、さらに、R-loop 構造の一重鎖 DNA は不安定で、ヌクレアーゼによって切断を受けやすいことから、RAP80 欠損細胞では R-loop 構造内の一重鎖 DNA 部位が不安定化している、つまり、RAP80 を介した R-loop 構造内の一重鎖 DNA 部位を保護するメカニズムが DSB 修復中に発生しうるゲノム異常を抑制しているという仮説を立てた。

この仮説を検証するため、独自のレーザー照射系¹⁵を用いた R-loop 構造の解析を行った。まず、DNA-RNA ハイブリッドを検出するインジケータを用いて、DSB 誘導後の DNA-RNA ハイブリッドの挙動を解析したところ、RAP80 の発現を低下させた細胞では、DNA-RNA ハイブリッドが蓄積していることが判明した。

次に、R-loop 構造内の一重鎖 DNA 部位を可視化するために、1) 一重鎖 DNA を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色、2) BrdU 抗体を用いた免疫染色、3) DNA ミスマッチを認識する GFP-MSH2/3 をインジケータとしたリアルタイムでの挙動追跡の 3 通りの方法を用いて検証した。面白いことに、これら 3 つの系によって DSB 誘導後に観察された R-loop 構造内の一重鎖 DNA の挙動はすべて、RAP80 が一重鎖 DNA の安定化に寄与することを示した。これらの結果から、RAP80 は R-loop 構造の一重鎖 DNA 部位を保護し、DNA-RNA ハイブリッド鎖の解消を促進していると考えられた。

さらに、DSB 誘導後に DSB 末端の削り込みに関与するヌクレアーゼ活性化因子 CtIP の DSB へのリクルートをレーザー照射系で観察したところ、過去の研究と同様に、RAP80 の欠損により CtIP が DSB 部位に過剰に蓄積することが判明した。また、先に述べた R-loop 構造内の一重鎖 DNA は、過剰に蓄積

した CtIP を原因として不安定化していることが明らかとなった。つまり、RAP80 は CtIP の蓄積を抑制することで R-loop 構造の一重鎖 DNA 部位を保護していると考えられた。実際、RAP80 欠損細胞で見られた遺伝子融合の増加は、CtIP の発現を低下させることにより観察されなくなった。すなわち、RAP80 欠損細胞におけるゲノム異常の発生は、CtIP の過剰な蓄積による R-loop 構造の不安定化が原因であることが示唆された。

最後に、この機構が最終的にどのような DSB 修復メカニズムを誘導するかについて調べた。G1 期細胞の DSB 修復は一般的に非同末端結合 (NHEJ) によるとされているが、実際にその NHEJ の中にどの程度の経路の多様性があるかは詳しく分かっていない。最近、G1 期細胞に放射線を照射した後に、非常に長い時間 (16 時間から 24 時間) かかって修復される経路は、BRCA1/CtIP などの修復因子によって DSB 末端が削られることで修復が完了することが示唆された¹⁶。この論文で用いられた系を参考に、G1 期 RPE 細胞に放射線を照射し、その後の γ H2AX foci の数を指標にして、未修復の DSB 量を定量した。その結果、RAP80 は G1 期細胞において、未だ知られていない新たな修復経路である、転写共役型末端結合 (TA-EJ) を開始していることが判明した。この経路は DSB 誘導後 30 分以内に迅速に完了し、RAP80 および R-loop 構造を起点として開始されていることが示唆された。また、この修復経路に関与する因子として、BRCA1、CtIP、POLQ、LIG1/3 を同定し、転写活性化部位においては、この非定型的な末端結合を介して DSB が迅速に修復されていることが明らかとなった。転写共役型末端結合が阻害されると、DNA-PK、Artemis による、欠失・変異を伴った DSB 修復が行われることも示唆されたことから、G1 期細胞においては、RAP80 と R-loop を起点とする転写共役型末端結合によってゲノムの安定性が維持されていることが明らかとなった。

考察

ゲノムは広大であるが、どの部位に DNA 損傷が生じたかによってその修復方法を変化させる機構が存在すると考えられてきた。その一つの因子として、DNA 損傷が生じた部位の転写の活性化度が関与していることが示唆されてきた。転写が活性化していれば、その部位には豊富に RNA が存在すると考え

られ、DNA 損傷のような DNA の二重鎖構造を不安定化する刺激があると、これらの RNA が DNA と再重合することにより DNA-RNA ハイブリッドを形成する可能性が高まると考えられる。実際、我々を含む複数のグループが、DNA 二重鎖切断誘導後に R-loop 構造が形成されることを観察している。

我々は、これらの R-loop 構造の形成が、正確な修復を誘導する部位を知らせるための、いわばマークとして機能するのではないかと考えて研究を進めてきた。実際、G1 期細胞、S/G2 期細胞どちらの場合においても、R-loop 構造は正確な修復機構、すなわち転写共役型相同組換え修復または転写共役型末端結合のいずれかを誘導することを見出した。

今回の研究で、RAP80 が R-loop 構造の保護、および転写共役型末端結合の誘導において重要な役割を果たしていることが明らかとなった。RAP80 を欠損すると、R-loop 構造のうち一重鎖 DNA 部位が過剰に蓄積した CtIP によって不安定化し、逆に一重鎖 DNA を失った R-loop 構造の DNA-RNA ハイブリッドは、正常な解消のメカニズムが機能せず、DNA-RNA ハイブリッドは蓄積してしまうと考えられた。これらの R-loop 構造の制御異常は、転写共役型末端結合によって守られるべき領域において DSB 誘導後の欠失サイズや、遺伝子融合頻度を増加させると考えられることから、RAP80 を介した R-loop 構造の制御は、先に解明した転写共役型相同組換え修復と並んで、我々のゲノムの転写活性化部位、すなわち最も重要な部位の遺伝子情報を守っているメカニズムであると考えられた (Figure 1)。

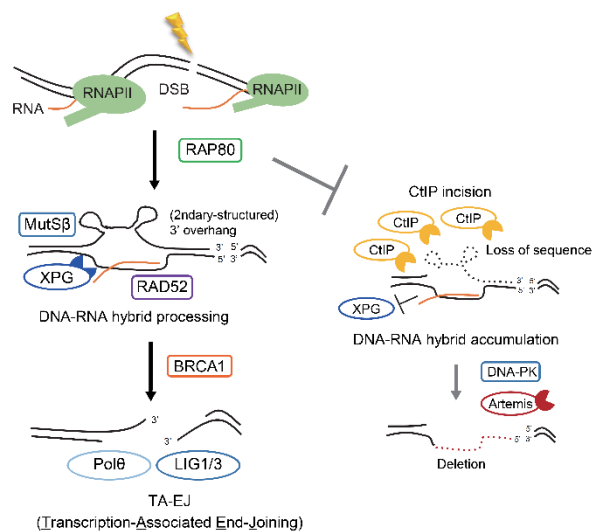


Figure 1. The Model for TA-EJ

今回の研究で R-loop 構造の保護機構、さらにその下流の修復経路が明らかとなったが、そもそも R-loop 構造がどのように形成されるのか、また RAP80 が何を目印として DNA 二重鎖切断部位に誘導されるのかは未だ分かっていない。今後の研究ではそれらの分子メカニズムをさらに深く追求することで、転写と DNA 修復機構がいかに共役し、我々のゲノムを守っているかを明らかにしていきたい。

参考文献

- 1 Keskin, H. *et al. Nature* **515**, 436-439 (2014).
- 2 Marnef, A. *et al. J. Mol. Biol.* **429**, 1277-1288 (2017).
- 3 Ohle, C. *et al. Cell* **167**, 1001-1013 e1007 (2016).
- 4 Cohen, S. *et al. Nat. Commun.* **9**, 533 (2018).
- 5 Lu, W.-T. *et al. Nat. Commun.* **9**, 532 (2018).
- 6 Yasuhara, T. *et al. Cell* **175**, 558-570 (2018).
- 7 Aguilera, A. *et al. Mol. Cell* **46**, 115-124 (2012).
- 8 Yasuhara, T. *et al. Nat. Commun.* **5**, 5426 (2014).
- 9 Sato, H. *et al. Nat. Commun.* **8**, 1751 (2017).
- 10 Permata, T. B. M. *et al. Oncogene* **38**, 4452-4466 (2019).
- 11 Kakoti, S. *et al. Front Mol Biosci* **7**, 205-205 (2020).

- 12 Ogiwara, H. *et al. Oncogene* **30**, 2135-2146 (2011).
- 13 Yamauchi, M. *et al. Biochem. Biophys. Res. Commun.* **416**, 111-118 (2011).
- 14 Coleman, K. A. *et al. J. Biol. Chem.* **286**, 13669-13680 (2011).
- 15 Kato, R. *et al. Mol Cell Oncol* **6**, 1542244 (2019).
- 16 Biehs, R. *et al. Mol. Cell* **65**, 671-684 e675 (2017).

研究の発表

口頭発表

1. 安原崇哲 「RNA 転写と DNA 二重鎖切断修復のクロストーク」第 42 回日本分子生物学会年会 福岡県 2019 年 12 月

誌上発表

1. Yasuhara, T.^{*,#}, Kato, R.[#], Yamauchi, M., Uchihara, Y., Zou, L., Miyagawa, K., and Shibata, A. RAP80 recognizes RNAPII to protect vulnerable R-loops during DNA double-strand break repair. *bioRxiv* 2021.04.23.440542; doi:10.1101/2021.04.23.440542 (*co-corresponding, #co-first)