

A study of DNA damage response activated during the processing of DNA double-strand breaks in *Xenopus* egg extracts

達川, 絢介

<https://hdl.handle.net/2324/7182315>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (理学) , 課程博士
バージョン :
権利関係 :



氏 名 : 達川 絢介

論 文 名 : A study of DNA damage response activated during the processing of DNA
double-strand breaks in *Xenopus* egg extracts
(DNA 二重鎖切断後のプロセッシングによって活性化される DNA 損傷応答のツメガ
エル卵抽出液を用いた解析)

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

遺伝情報物質である DNA を維持し、継承することは生物にとって必須の営みである。DNA は紫外線や放射線、酸化ストレスなどによって様々な損傷を受け、情報を失うリスクに曝されている。細胞はこれらの様々な種類の損傷に対して適切に応答する仕組みを持つ。DNA 二重鎖切断 (DSB) は DNA 二重鎖が切り離されて染色体の連続性を失う重篤な損傷であり、染色体の転座・逆位・欠失など、大規模な染色体再編にもつながる。DSB の修復方法は複数あるが、中でも相同な DNA 配列を鋳型として利用する相同組換えは正確性が高く、重要な修復機構である。相同な DNA 配列の探索のためには DSB 末端の DNA 鎖が削り込まれ、3'末端を持つ一本鎖 DNA が露出する必要がある。重要なことにこの過程は、削り込みを促進する酵素群と、削り込みを検知・監視するチェックポイント機構の複雑な相互作用によって制御される。DSB 末端の削り込みは、Mre11-Rad50-Nbs1 (MRN) 複合体による短い削り込みと、それに引き続いて起こる Exo1、Dna2 による継続的な削り込みの二段階の反応によって達成される。この間、削り込みによって生じた DNA 構造は、DSB 末端を検知する ATM キナーゼ経路と、露出した一本鎖 DNA を検知する ATR キナーゼ経路の二つの DNA 損傷チェックポイントによって監視される。興味深いことに、MRN は DSB 末端を検知して削り込みを開始するだけでなく、ATM キナーゼの活性化にも関わる。一方、削り込まれて露出した一本鎖 DNA 領域では、そこに集積する Topbp1 と、一本鎖・二重鎖境界を認識してロードされる Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) 複合体が結合して ATR キナーゼを活性化する。また、9-1-1 と MRN は Exo1 と Dna2 による DSB 末端の継続的な削り込みを促進する働きを持つことも報告されている。このように、DNA の削り込みとその検知は、DNA 構造センサーである MRN、9-1-1、削り込み装置である Exo1、Dna2、チェックポイントシグナリング装置である ATM、ATR の機能的相互作用により達成される。ところが、DSB の削り込み過程では、DNA 末端の構造がダイナミックに変化する。この構造変化は、DNA 構造の検出機構、および削り込み機構の両方に影響するが、特定の DNA 構造がどのような経路によって監視され、どのような反応を引き起こすかの切り分けは難しく、これまで十分に理解されていない。

私は DSB 末端の削り込みが進んだ後の DNA 損傷応答機構を明らかにするため、核タンパク質を高濃度に関与核内の反応を効率よく再現する無細胞系であるツメガエル卵核質抽出液 (NPE) を用いた。あらかじめ一本鎖・二重鎖境界を持たせたユニークな DNA 基質を NPE に加えて、チェックポイント活性化と DNA 削り込みの両方を解析した (図 1)。この基質を用いることで、DSB 末端

の削り込み開始への MRN の必要性を排除した。DSB 末端を持たない環状 DNA での ATR 活性化は 9-1-1 の免疫除去で大きく減少したのに対し、DSB 末端を持つ DNA 基質では 9-1-1 と MRN それぞれ単独の免疫除去ではあまり減少しなかった。一方、両者を同時に免疫除去すると ATR 活性化が大幅に減弱したことから、削り込みが進行した DSB に対し 9-1-1 と MRN が独立して ATR 活性化に働くことが示唆された。この基質での MRN 依存的な ATR の活性化には、ATM と Topbp1 が必須であった。また、9-1-1 と MRN を同時に免疫除去した NPE では DSB 末端の削り込みが顕著に遅延した。ATM と ATR の働きを阻害しても削り込みはわずかにしか遅延しなかったことから、9-1-1 と MRN はどちらもチェックポイントキナーゼ非依存的に Dna2 による削り込みを促進することが示唆された。さらに、一本鎖・二重鎖境界を持つ DNA 基質を担体に結合し、NPE 中で反応させ、結合タンパク質を解析した。MRN と 9-1-1 は共に Topbp1 のリクルートを促進したが、Dna2 のローディングは MRN のみに依存していた。MRN 経路では、Topbp1 と Dna2 のローディングの促進は ATM に依存していた。ATM は削り込みに影響しなかったことから、この Dna2 ローディングの促進は削り込みの促進には必要ないと推測される。ATM は MRN 依存的に一過的に DNA に結合するが、Topbp1 や ATR が存在しない時には DNA 上に安定して結合していたことから、活性化した ATR が ATM の働きを阻害する可能性が示唆された。これらの結果から、一本鎖 DNA の露出した DSB に対し、MRN と 9-1-1 はそれぞれ独立した経路で ATR の活性化と DSB 末端削り込みの促進を行うことが明らかとなった（図 2）。

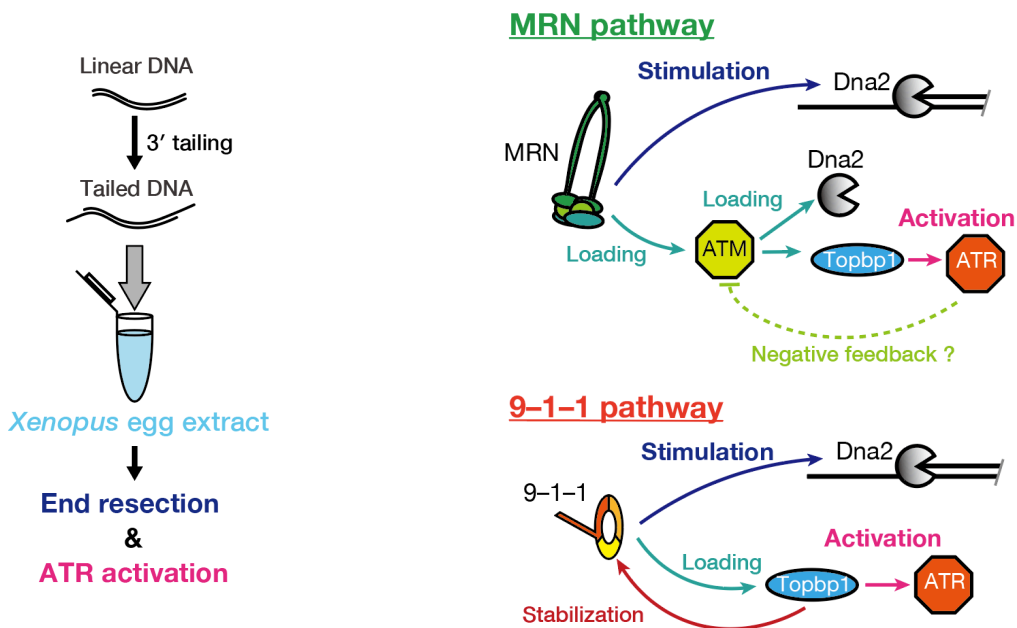


図 1

Linearize した DNA の末端に一本鎖 DNA を付加した DNA 基質を作成した。この基質をツメガエル卵抽出液中で反応させて DSB 末端の削り込みと、ATR 活性化を解析した。

図 2

DSB 後の削り込みによって露出した DNA 上では MRN 経路と 9-1-1 経路の二種類の経路が活性化する。どちらの経路も Dna2 を介した削り込みの促進と、Topbp1 を経由した ATR の activation を行う。MRN 経路による ATR の活性化は ATM を介して行われるが、9-1-1 経路では ATM は必要ない。さらに、活性化された ATR は ATM を DNA 上から解離させる。