

博士学位論文

DNA 二重鎖切断の相同組換え修復における

細胞周期依存性に関する研究

令和3年3月

茨城大学大学院理工学研究科

坂本裕貴

## 学位論文要旨

生物のゲノム DNA は、放射線、紫外線、化学物質等の外的要因あるいは細胞内代謝で生じる活性酸素などの内的要因によって塩基損傷、鎖切断、架橋といった様々な損傷を絶えず受けている。これらの中でも、DNA 二重鎖切断 (double-strand breaks: DSBs) は最も重篤な DNA 損傷であり、その修復不全は染色体突然変異、細胞のがん化、さらには細胞死を引き起こす可能性を秘めている。DSB 修復機構には、非相同末端結合 (canonical non-homologous end joining: C-NHEJ) と相同組換え (homologous recombination: HR) の 2 つの主要な経路が機能しており、これら修復経路の選択は細胞周期に依存することが示唆されている。実際、修復経路の細胞周期依存性の反映として細胞の放射線感受性の変化が挙げられ、細胞周期の S 期後半にある細胞は放射線感受性が最も低く、G1 期細胞はわずかな放射線感受性、M 期 (有糸分裂期) の細胞は放射線に対して極めて高い感受性を示すことが知られている。

C-NHEJ は損傷を受けた DNA 末端を直接再結合する修復経路であり、M 期を除く全細胞周期で機能するとされる。その一方で、HR は修復の鋳型として姉妹染色分体に存在する相同配列を必要とするため、DNA 複製が完了する細胞周期の S 期後半から G2 期にかけてのみ機能すると考えられている。しかし、実際の HR 効率の細胞周期依存性を直接的に調べた例は限られており、HR が S/G2 期にのみ限定されて起こる修復機構であるかどうかは未だに不明なままである。また、M 期における DNA 損傷修復機構については、ゲノム安定性を維持するために不活性化されるという報告はあるが、分裂間期と比較してデータが少なく、その詳細は分かっていない。そこで本研究では、HR の細胞周期依存性について M 期も含めて解析し、修復制御の仕組みを明らかにすることを目的とした。

DSB 導入には放射線がよく用いられるが、放射線は DSB 以外の損傷を多数誘導するため、

それらの影響も考慮する必要が生じる。そこで本研究では、まず特定の DSB に限定して HR 効率の細胞周期依存性を直接的に調べるために、HR 効率を見る SCneo レポーターがゲノム DNA に導入され、このレポーターに部位・時期特異的に DSB を導入できる Mer-I-Sce I 融合タンパク質を安定的に発現しているヒト胎児肺線維芽細胞株を樹立した。

SCneo レポーターは HR で利用される主要な機構である homology-directed repair (HDR) の頻度を解析するシステムである。内部に 18 ヌクレオチドを認識配列とする I-Sce I ヌクレアーゼの認識配列が存在し、I-Sce I ヌクレアーゼはこの部位特異的に DSB を生じさせる。DSB が HDR によって修復された場合にのみ細胞が薬剤耐性となることを利用して HDR 頻度を知ることができる。また、細胞内に発現している Mer-I-Sce I は、mutated mouse estrogen receptor (Mer) と I-Sce I ヌクレアーゼを融合させた核局在制御型の I-Sce I である。4-hydroxytamoxifen (OH-TAM) を添加すると核内に移行し、SCneo レポーター上の I-Sce I 認識部位を切断する。これにより、OH-TAM の添加によって DSB 導入のタイミングを制御することが可能である。OH-TAM を添加した後の DSB 導入と再結合をリアルタイム PCR でモニタリングし、効率よく DSB を導入できる処理時間を 1 時間に決定した。

この細胞株の細胞周期を同調し、各細胞周期に OH-TAM 処理して DSB を導入し、HDR 頻度を解析した。その結果、HDR 頻度は G1/S 期の境界付近で最も低くなり、S 期後半で最も高くなることが確認され、HR が S 期後半から G2 期にかけてのみ機能するという従来の報告と一致した。興味深いことに、M 期の細胞においても顕著に高い HDR 頻度が検出されたことから、M 期においても HDR が機能できることが強く示唆された。

次に、M 期で HDR が機能する機構について解析を行った。DNA 結合タンパク質のゲノム DNA 上の結合部位を同定する方法であるクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて M 期で生

じた DSB 部位に集積する修復関連タンパク質を調べた。その結果、DSB 導入直後の早い段階から DSB の近傍部位に DSB マーカーとしてよく知られるリン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX) および HR 修復に必要不可欠なタンパク質である RAD51 リコンビナーゼが集積することが観察され、M 期でも HR の反応が実際に起きていることが確認された。なお、C-NHEJ に重要な因子であるリン酸化 DNA-PKcs に対する ChIP 解析と  $\gamma$ -H2AX に対する ChIP 解析から DSB を伴った M 期細胞の一部は DSB を保持したまま G1 期に進む可能性が示された。以上の結果によって、M 期においても DSB の一部が HDR 経路によって修復されることを世界で初めて示すことができた。

SCneo レポーターでは、組換えに近傍の領域を利用した STGC (short-tract gene conversion) と、長い領域を利用した LTGC (long-tract gene conversion) または姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange: SCE) の 2 型の区別が可能である。そこで各細胞周期の HDR によって生じた組換え型の解析を行った結果、細胞周期全体を通してほとんどの HDR は STGC タイプであることが確認されたが、S 期から G2 期では LTGC/SCE による組換えがわずかながら増加することが分かった。

M 期細胞における DNA 損傷応答および DSB 修復に関する知見は、分裂間期の細胞と比較して非常に少ない。本研究の成果は、細胞周期と DNA 損傷応答経路の選択に関する理解を進める一助となることが期待される。

## **Abstract**

A DNA double-strand break (DSB) is one of the most serious types of damage that can be experienced by cells and can often be induced by physiological mechanisms involved in DNA metabolism, or by DNA damaging agents such as ionizing radiation. Unrepaired DSBs may lead detrimental effects such as somatic mutation, tumorigenesis, and cell lethality. To protect themselves from DSBs, higher eukaryote cells possess several DSB repair pathways, and among these pathways canonical non-homologous end joining (C-NHEJ) and homologous recombination repair (HRR) are considered to be the two major repair pathways. The DSB repair pathway choice is dependent on cell cycle phases, for example, radiation sensitivity of mammalian cells depends on the cell cycle position. S-phase cells are the most resistant to damage, G1-cells are marginally resistant, cells at the G1/S boundary are slightly sensitive, and M-phase cells are the most sensitive to radiation. This difference in sensitivity to damage is thought to be due to the cell cycle position when damage occurs. C-NHEJ may function throughout the whole cell cycle except M phase, whereas HRR is thought to occur during late S-G2 phase because it requires sister chromatid as a repair template. However, it is still unclear whether HRR occurs only during S-G2 phase or not, and also, little is known about detail of DNA damage repair at M phase.

In the present study, to study cell cycle dependence of the efficiency of HRR, we established a

cell line that can be used for assessment of homology-directed repair (HDR), a major pathway used for HRR, at a site specific DSB. The cells contain a reporter gene for HDR detection and express an ER-fused endonuclease protein that can induce a time and site specific DSB on the reporter gene. We synchronized the cell cycle and analyzed the frequency of HDR at each cell cycle stage. As expected, the maximal HDR activity was observed in the late S phase, along with minimal activity in the G1 phase and at the G1/S boundary. Surprisingly, significant HDR activity was observed in M phase, and the repair efficiency was similar to that observed in late S phase. We also found that gene conversion was dominant throughout cell cycle. ChIP assays revealed the recruitment of RAD51 to the vicinity of DSBs in M phase. The ChIP assay for gamma-H2AX and phosphorylated DNA-PKcs indicated that a part of M-phase cells with DSBs could proceed into the next G1 phase. These results provide evidence showing that a portion of mitotic cell DSBs are undoubtedly repaired through action of the HDR repair pathway.

## 目次

1. 序論	1
2. 材料・方法	16
3. 結果	
3-1 リアルタイムPCRを用いたOH-TAM処理によるDSB導入の確認	25
3-2 細胞周期同調の確認	29
3-3 同調細胞におけるDSB導入およびDSB再結合の確認	35
3-4 HDR頻度の細胞周期依存性	42
3-5 HDR組換え型の解析	46
3-6 M期において生じたDSBに集積する修復因子の解析	48
4. 考察	51
5. 参考文献	57
6. 謝辞	65



# 第 1 章 序論

生物のゲノム DNA は遺伝情報を担っているため、DNA 塩基配列の維持は遺伝情報が安定して子孫へ受け継がれるために重要である。しかし、DNA は電離放射線、紫外線、化学物質等の外的要因あるいは細胞内代謝によって生じる活性酸素種、複製ストレスなどの内的要因によって様々な種類の損傷を受けており、内的要因による DNA 損傷の頻度は、1 日 1 細胞当たり  $10^5$  個以上にも及ぶことが予測されている [Saul & Ames 1986]。DNA 損傷には、塩基損傷、鎖内/鎖間架橋、DNA 一本鎖切断、DNA 二重鎖切断 (double strand break: DSB) などが存在するが、細胞はこれらの損傷を修復するシステムを保持している [Ciccia & Elledge 2010]。さらに、DNA を修復する時間を得るための細胞周期チェックポイントおよび修復が不可能な場合はアポトーシスを誘導することによって個体の恒常性を維持している。種々の損傷の中でも、DSB は最も重篤な DNA 損傷であり、その修復不全は塩基の欠失、染色体突然変異、細胞のがん化、さらには細胞死を引き起こす可能性を秘めている [Shrivastav *et al.* 2008]。このことから、DSB 修復機構の解明がこれまで多くの研究者によって進められてきた [Ciccia & Elledge 2010, Chang *et al.* 2017, Scully *et al.* 2019]。

哺乳類細胞における DSB 修復経路は、主に非相同末端結合 (canonical non-homologous end joining: C-NHEJ) と相同組換え (homologous recombination: HR) の他に C-NHEJ と HR の両経路が正常に機能できない場合にバックアップとして働く alternative 経路の少なくとも 3

つが働いていると考えられている [Chang *et al.* 2017, Scully *et al.* 2019] (図 1)。C-NHEJ は損傷 DNA 末端を直接再結合する修復経路である。C-NHEJ 経路では、まず損傷部位に Ku70/Ku80 からなるヘテロダイマーが結合し末端の繋ぎ止めを行い、その後 DNA-PKcs (DNA-dependent protein kinase catalytic subunit) がリクルートされ Ku70/80 ヘテロダイマーとともに DNA-PK (DNA-dependent protein kinase) 複合体を形成し活性化する。その後、必要に応じて Artemisヌクレアーゼなどによって切断末端のプロセッシングを行った後で、DNA Ligase IV/XRCC4/XLF 複合体によって DSB 末端を再結合させることで修復が完了する。この経路では末端のプロセッシングが行われた場合に塩基が欠失することがあるため、誤りの起こる可能性がある経路とされている [Shrivastav *et al.* 2008, Mahaney *et al.* 2009] (図 1 左)。一方で、HR は修復の鋳型として姉妹染色分体に存在する相同配列を利用して DNA 合成を行う修復経路である。HR 経路では、まず損傷部位に MRE11/RAD50/NBS1 からなる MRN 複合体が結合して末端の繋ぎ止めを行った後で、MRN 複合体の一員である MRE11 や EXO1、CtIP などのエキソヌクレアーゼの働きで 5'-末端から 3'-末端へのリセクションを行い、3'-突出の一本鎖 DNA を形成させる。形成された 3'-突出一本鎖 DNA は RPA によって保護され、RPA はその後 BRCA2 によりリクルートされた RAD51 に置換される。RAD51 によって安定化された RAD51 は姉妹染色分体に存在する相同配列の検索および姉妹染色分体への鎖侵入を触媒し、最終的に相同配列を鋳型として DNA 合成を行って修復が完了する。相同な鋳型配列を用いて修復合成が行われることから、精度の高い修復が行われる経路である [Delacôte & Lopez 2008] (図 1 中央)。C-NHEJ と HR の両経路が破綻した際にバックアップとして働く alternative 経路は、C-NHEJ と同様に末端の再結合によって修復を行う経路であり、microhomology-mediated end joining (MMEJ)、single strand annealing (SSA) などの存在が知られている

[Chang *et al.* 2017, Sallmyr & Tomkinson 2018]。MMEJ 経路では DSB 部位近傍に存在する 2~20 bp の短い相同配列 (microhomology) を利用して修復が進行し、SSA 経路では microhomology よりも長い 20 bp 以上の相同配列を利用して修復が行われる。MRN 複合体が DSB 部位へリクルートされて末端のリセクションが行われることで 3'-突出の一本鎖 DNA が形成される段階までは HR と同様であるが、ここで HR に進行できない場合に両鎖の一本鎖 DNA 上に存在する相同配列同士がアニールされ、MMEJ に関しては gap が必要に応じて pol  $\theta$  などのポリメラーゼによって埋められた後で、Ligase I または Ligase III によって DNA 末端の再結合が行われる [Chang *et al.* 2017, Sallmyr & Tomkinson 2018] (図 1 右)。

DNA 修復経路の選択の影響を与える要因は、損傷や細胞の種類など様々挙げられるが、その中でも細胞周期が大きく寄与すると考えられている [Frankenberg-Schwager *et al.* 2009, Shibata *et al.* 2011, Shibata *et al.* 2014, Ceccaldi *et al.* 2016, Biehs *et al.* 2017]。細胞周期とは、真核生物が増殖するときの DNA 複製と細胞分裂のサイクルのことであり、有糸分裂と細胞質分裂が併せて起こる分裂期 (M 期) と、M 期から次の M 期までの間の期間である間期に分けられている。間期はさらに、M 期の完了から S 期開始までの間の G1 期 (DNA 合成準備期)、DNA が複製される S 期 (DNA 合成期)、S 期から M 期開始までの間の G2 期 (分裂準備期) の 3 つの時期から構成されている。また、増殖の必要のない細胞は G<sub>0</sub> 期に移行し、G<sub>0</sub> 期の細胞は再び細胞周期を繰り返す増殖期に戻るか、特定の機能に特化した細胞へと分化する。細胞周期は厳密に制御されており、各細胞周期によって、タンパク質の発現および局在、クロマチン構造などが大きく変化することが知られている [Yamamoto *et al.* 1996, Vaughn *et al.* 1996, Giunta *et al.* 2010, Verdaasdonk & Bloom 2011, Orthwein *et al.* 2015]。

C-NHEJ は、修復に相同な鋳型を必要としないため、M 期を除く細胞周期全体で機能でき

ると考えられている [Orthwein *et al.* 2014, Terasawa *et al.* 2014, Benada *et al.* 2015]。また、C-NHEJ 関連タンパク質を欠損した細胞では G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期における放射線感受性が高いことが報告されており、C-NHEJ が特に G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期での DSB 修復に中心的な役割を果たしていることが示唆されている [Fukushima *et al.* 2001, Rothkamm *et al.* 2003]。一方の HR は、修復の鋳型として主に利用される姉妹染色分体が S 期で形成されることから、S 期後半から G<sub>2</sub> 期にかけて限定して機能すると考えられている [Karanam *et al.* 2012, Mladenov *et al.* 2013, Ceccaldi *et al.* 2016]。また、HR において末端のリセクションに関わる CtIP の活性化には、細胞周期進行の制御において重要な役割を果たす CDK が関与していることから HR が細胞周期によって調節されていることが示唆される [Yu *et al.* 2012]。実際、修復経路の細胞周期依存性の反映として細胞の放射線感受性の変化が挙げられ、細胞周期の S 期後半にある細胞は放射線感受性が最も低く、G<sub>1</sub> 期細胞はわずかな放射線感受性、M 期の細胞は放射線に対して極めて高い感受性を示すことが知られている [Terasima & Tolmach 1963a, Sinclair 1968]。そのため、M 期と間期では DNA 損傷応答が異なると考えられてきた。

M 期の DNA 損傷修復については興味深い知見がいくつか得られている。M 期に同調した細胞に DNA 損傷を導入すると、DSB に対する初期応答であるヒストン H2AX のリン酸化 ( $\gamma$ H2AX) や DNA 損傷応答因子である MDC1 および MRE11/RAD50/NBS1 (MRN) 複合体の損傷部位へのリクルートは観察されるが、その下流の応答である 53BP1 および BRCA1 などの修復因子の DSB 部位へのリクルートは、分裂後期または細胞質分裂まで観察できない [Giunta *et al.* 2010, Lee *et al.* 2014, Terasawa *et al.* 2014, Benada *et al.* 2015]。分裂中期に最も活性が高まることが知られている CDK1 の活性化と M 期における DNA 損傷応答との関連も示唆されている。CDK1 の活性化を促進することで HR が抑制され、逆に CDK1 の活性化を

抑制すると M 期においても DNA 損傷応答が完全に回復する [Wei *et al.* 2011、Krajewska *et al.* 2012、Yu *et al.* 2012]。また、M 期では C-NHEJ が抑制されており、M 期で C-NHEJ を活性化させると **anaphase bridge** の形成および染色体不安定性が高まることが示唆されている [Orthwein *et al.* 2014]。さらに、CDK による RNF8、53BP1、MDC1 のリン酸化が M 期における C-NHEJ の抑制に関与する [Zhang *et al.* 2011、Orthwein *et al.* 2014]。以上の報告は、M 期細胞における放射線高感受性と一致しており、ゲノム安定性を維持するために M 期における DNA 損傷修復機構が不活性化されていると考えられるが、分裂間期と比較してデータが少なく、その詳細は明らかではない。

精子や卵などの生殖細胞に含まれる染色体数は、体細胞 (2n) の半数 (n) のみである。これは生殖細胞が形成される過程で、染色体数の半減が起こるためである。この生殖細胞形成に至る一連の細胞分裂過程のことを減数分裂という。減数分裂の過程において、数百のプログラムされた DSBs がゲノムの至る所に形成される [Keeney *et al.* 1997]。HR によるこれらの DSBs の修復は、相同染色体の対合およびクロスオーバー形成を促進する。クロスオーバーは適切な染色体分配のために必要不可欠であり、子孫に遺伝的多様性を生み出すことができる [Kim *et al.* 2010、Keeney *et al.* 2014、Lam & Keeney 2014、Hunter 2015、Gray & Cohen 2016、Zickler & Kleckner 2016]。減数分裂期の凝縮したクロマチンにおいて HR 修復が行われているという事実は、同様にクロマチンが凝縮している M 期細胞においても HR 修復が機能できるという可能性を考えさせ、実際 M 期における DSB 修復の存在を示す報告もなされている [Minocherhomji *et al.* 2015、Thompson *et al.* 2019、Godinez *et al.* 2020、Ovejero *et al.* 2020]。その 1 つとして、軽度の複製ストレス後の M 期後期において、解離しつつある姉妹染色分体の間には **ultrafine bridges (UFBs)** と呼ばれる構造体が糸を張ったように形成されてしまうが、

この姉妹染色分体間の bridge は M 期で修復されなければ姉妹染色分体の非分離に繋がることから、解消される必要がある [Minocherhomji *et al.* 2015]。

細胞周期と DSB 修復経路選択の関係について、いくつかの実験系を用いて調べた報告がある。DSB 修復遺伝子を欠損したニワトリ B リンパ球細胞 (DT40 細胞) [Takata *et al.* 1998、Fukushima *et al.* 2001] あるいはチャイニーズハムスター卵巣細胞 (CHO 細胞) [Rothkamm *et al.* 2003、Hinz *et al.* 2005] を用いた研究では、生存率をもとに放射線照射後の感受性を解析し、HR 欠損細胞は G1 早期が最も放射線耐性で S 期または G2/M 期に進行するにつれて徐々に感受性となり、反対に NHEJ 欠損細胞は G1 期に最も感受性で S 期が最も耐性となる (図 2)。しかしながら、これらの研究では修復欠損細胞の生存率であるため、直接的に各細胞周期での修復経路の動きを見ているわけではない。また、DSB 形成に放射線を用いているため、DSB 以外の損傷も考慮しなければならない。HR および C-NHEJ 解析レポーターを用いて細胞周期ごとの修復頻度を解析した Mao *et al.* (2008) および Saleh-Gohali & Helleday (2004) の研究では、細胞周期をそれぞれのステージに同調させた状態を維持しながらレポーター遺伝子に DSB を導入し、その後の修復解析を行っている。これらの研究の結果によると、DSB 修復に HR が利用される頻度は G1 期が最も低く、S 期に最も高くなり、G2/M 期にやや低くなるという結果が示されている (図 3)。しかしながら、Mao *et al.* (2008) が S 期の同調に用いた aphidicolin は当研究室において HR 頻度を有意に上昇させることが明らかとなっているため、他の細胞周期の頻度とそのまま比較していることには疑問が残る。Saleh-Gohali & Helleday (2004) の実験についても、細胞に DSB を導入できる時間を特定することが難しく、目的とした細胞周期特異的に DSB を導入できているかどうかの確認が困難である。さらに、細胞周期の同調に用いた薬剤の影響により、DSB 導入以前から DNA 損傷チェックポイントが活

性化している可能性があり [Sabations *et al.* 2012]、HR の細胞周期依存性については直接的な証拠が未だ得られていないのが現状である。以上の事実は、HR が主に S 期後半から G2 期にかけて機能することは確かであると推測させるが、果たして HR が S 期から G2 期に限定された現象なのかどうかは未解明とせざるを得ない。

そこで本研究では、HR による DNA 修復について M 期も含めた細胞周期依存性を直接的に解析するために、新たな実験系を確立し各細胞周期における DSB 誘導後の HR 頻度を調べることを目的とした。なお、本研究では HR で利用される主要な機構である homology-directed repair (HDR) の頻度を解析することで HR 頻度を調べる目的を果たすこととした。

細胞周期依存的な HDR を解析する際、DSB を導入するために電離放射線を用いると、1 Gy あたりの DNA 損傷の生成数が塩基損傷 1,000~2,000 であるのに対して DSB は約 40 である [Asainthanbly & Chen 2009] ことから、DSB 以外の影響も考慮する必要が生じる。さらに、一般的に DSB 導入に使用される制限酵素のリポフェクション法およびエレクトロポレーション法は、細胞へのダメージが大きく、特に M 期細胞における HR の解析には有用とは言えない。本研究では M 期を含めた HR 頻度を解析するために特化した細胞系として、HDR 解析レポーターである改変型 SCneo レポーター [Johnson & Jasin 2000, Tauchi *et al.* 2002] (図 4) がゲノム DNA に 1 コピー組み込まれたヒト胎児肺線維芽細胞 (MRC5 + SCneo) に、I-Sce I エンドヌクレアーゼと変異型マウスエストロゲンレセプター (mutated mouse estrogen receptor: Mer) の融合タンパク質 (図 5) を導入し、それらが安定発現している細胞系を樹立した。改変型 SCneo レポーターは、様々な研究で広く用いられている HDR 効率を解析することが可能なレポーター遺伝子であり、ネオマイシン耐性遺伝子 (*neo* 遺伝子) を基盤とした構造となっている。プロモーターを持たない 3'*neo* 配列と *neo* 遺伝子中の *Nco I* 認識配列が I-Sce I 認識



配列に置換された *S2neo* 配列が、Mycophenolic acid 耐性遺伝子 (*Ecogpt*) を挟んでタンデムに並んだ構造をしている。レポーター遺伝子内に含まれるホーミングエンドヌクレアーゼ *I-Sce I* の認識配列は 18 塩基にわたるもので、哺乳類には存在しない出芽酵母特異的な配列であると言われている。3'*neo* はプロモーターを持たないため、一方の *S2neo* もまた *Nco I* 認識配列が *I-Sce I* 認識配列に置換されているためネオマイシン耐性遺伝子はどちらも発現しない。*I-Sce I* エンドヌクレアーゼにより、*I-Sce I* 認識配列に DSB を生じさせると C-NHEJ あるいは HDR によって修復が行われると考えられる。C-NHEJ で修復された場合、切断末端はそのまま、またはプロセッシングを経て再結合することから、DSB 修復後も *neo* 遺伝子は機能することなく細胞はネオマイシン耐性とはならない。一方、HDR によって修復された場合には、姉妹染色分体に存在する 3'*neo* 領域が DSB 修復の鋳型として用いられ、*I-Sce I* 認識配列が本来の *Nco I* 認識配列へと戻るため、*neo* 遺伝子が機能することになる。このように DSB が HDR によって修復された場合にのみ細胞がネオマイシン耐性となることから、SCneo レポーターを用いることで HDR 頻度を解析することが可能である。本研究では、ネオマイシン類似体である G418 を用いて細胞の HDR 頻度を解析した (図 4)。また、Mer-*I-Sce I* 融合タンパク質は、部位・時期特異的に改変型 SCneo レポーターへ DSB を導入することのできるシステムである。Mer はリガンド結合領域を保持しており、普段は heat shock protein 90 (HSP90) と結合して細胞質内に局在している。通常のマウスエストロゲンレセプター (ER) は、エストロゲンと結合したときに核内へと移行するが、本研究で使用した変異型マウス ER (Mer) は、ホルモン結合ドメインのうち 525 番目のグリシン残基をアルギニン残基に置換することによりエストロゲン類似体である 4-hydroxytamoxifen (OH-TAM) のみとの結合能を持つ [Zhang *et al.* 1996]。OH-TAM を添加によって、Mer と OH-TAM が結合することで Mer-*I-Sce I* から HSP90 が解放され

る。その結果、Mer-I-Sce I は核内へ移行して SCneo レポーター上の I-Sce I 認識配列に DSB を導入する。このことを利用して、OH-TAM の添加で部位および時間特異的な DSB 導入が制御できる (図 5)。

本研究では、細胞周期の各時期における HDR 頻度を算出するために細胞周期の同調を行った。低血清処理による G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> 期への部分的な同調に引き続いて、colcemid 処理と Mitotic shake off を行い、細胞周期を M 期に同調した。細胞に低血清処理を行うと G<sub>1</sub> 期チェックポイントが働き、細胞周期が停止し G<sub>0</sub> 期に入る [Cooper 2003]。その後に細胞周期をしばらく進行させながら、微小管の脱重合によって紡錘体の形成を阻害する薬剤である colcemid [Eigsti & Dustin 1955] を細胞に処理し、染色分体の分離を抑制することにより細胞を M 期に同調できる。最後に、M 期の細胞はシャーレへの接着能力が低下することを利用して、細胞を培養しているシャーレに振動を与え、浮遊してきた細胞を回収する Mitotic shake off [Terasima & Tolmach 1963b] によって M 期の細胞を回収した。

本研究では、初めに OH-TAM 添加によって Mer-I-SceI が核に移行し、SCneo レポーター上に DSB を導入するのに効率的な OH-TAM の処理時間と濃度の決定、およびリアルタイム PCR による DSB の導入時間の検証を行い、続いて細胞周期の同調と同調解放後の細胞周期遷移を観察すると同時に、同調した細胞に I-Sce I によって S2neo へ DSB を導入して、細胞周期ごとの HDR 頻度の変化を解析し、HDR したクローンからゲノム DNA を回収して HDR 修復産物を解析して細胞周期のステージによる組換え型の割合も調べた。最後に、M 期の細胞において HR の鍵となるタンパク質が機能しているかどうかをクロマチン免疫沈降法 (chromatin immunoprecipitation: ChIP) を用いて検証し、M 期の細胞が DSB を HDR によって修復できることを明らかにした。

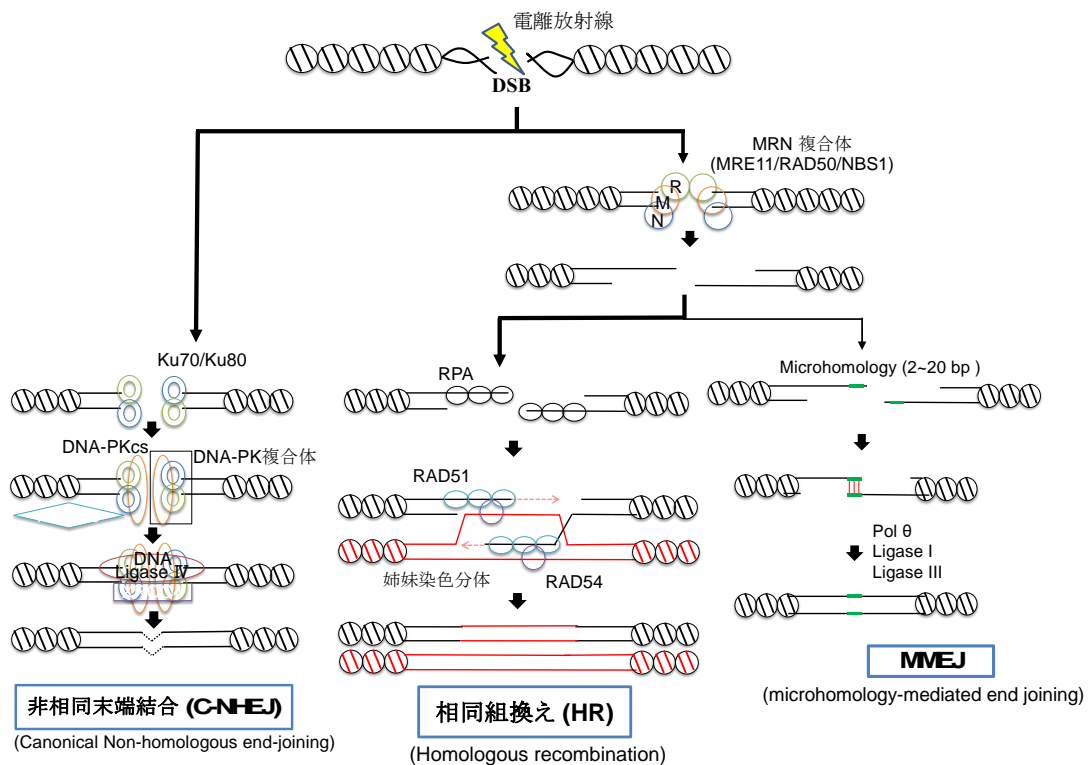


図 1: DNA 二重鎖切断 (DSB) の修復経路 [Mladenov *et al.* 2013、Chang *et al.* 2017]

(左) 非相同末端結合 (canonical non homologous end joining: C-NHEJ)

C-NHEJ は損傷 DNA 末端を直接再結合するだけの修復経路であることから、M 期を除く細胞周期全体を通して機能すると考えられる。

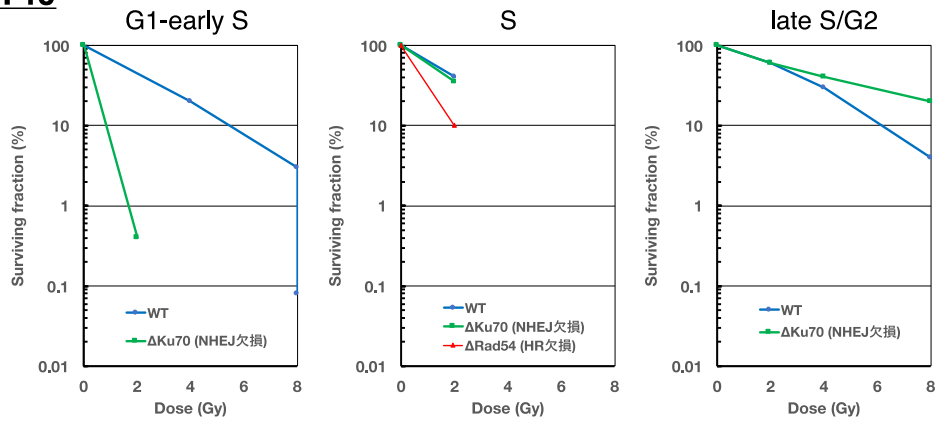
(中央) 相同組換え (homologous recombination: HR)

HR は修復の鋳型として姉妹染色分体に存在する相同配列を必要とするため、DNA 複製が完了する細胞周期の S 期後半から G2 期にかけてのみ機能すると考えられている。

(右) microhomology-mediated end joining (MMEJ)

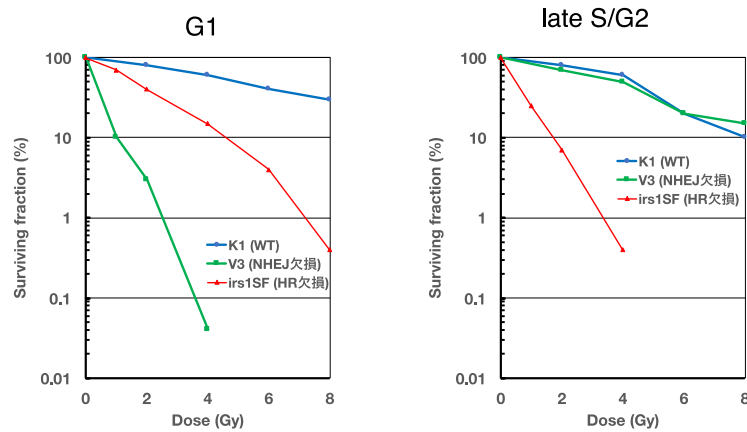
C-NHEJ と HR の両経路が破綻した際にバックアップとして働く alternative 経路の 1 つである。

## A DT40



(Modified from Takata *et al.* 1998 and Fukushima *et al.* 2001)

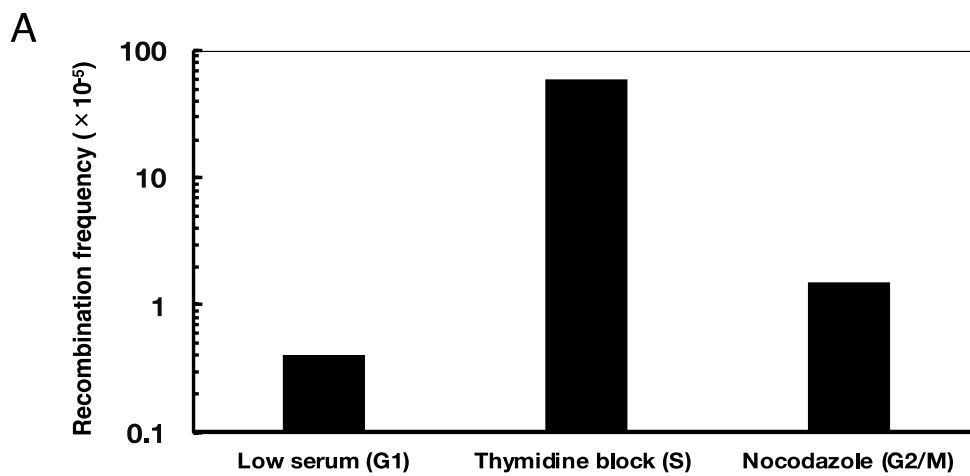
## B CHO



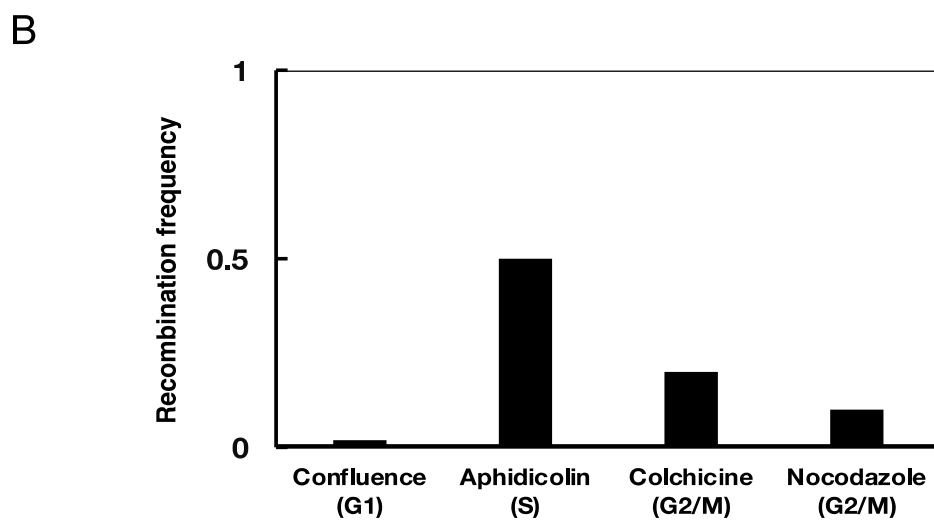
(Modified from Rothkamm *et al.* 2003)

図 2: 放射線照射後の生存率解析に基づき細胞周期と DSB 修復経路選択の関係を調べた過去の研究例

- (A) 修復欠損のニワトリ B リンパ球由来 DT40 細胞を用いた研究結果 [Takata *et al.* 1998、Fukushima *et al.* 2001] を元にして作成。
- (B) 修復欠損のチャイニーズハムスター由来 CHO 細胞を用いた研究結果 [Rothkamm *et al.* 2003] を元にして作成。



(Modified from Saleh-Gohali & Helleday 2004)



(Modified from Mao *et al.* 2008)

図 3: レポーター遺伝子による修復頻度解析に基づき細胞周期と DSB 修復経路選択の関係を調べた過去の研究例

(A) Saleh-Gohali & Helleday (2004) による研究結果を元に作成。

(B) Mao *et al.* (2008) による研究結果を元に作成。

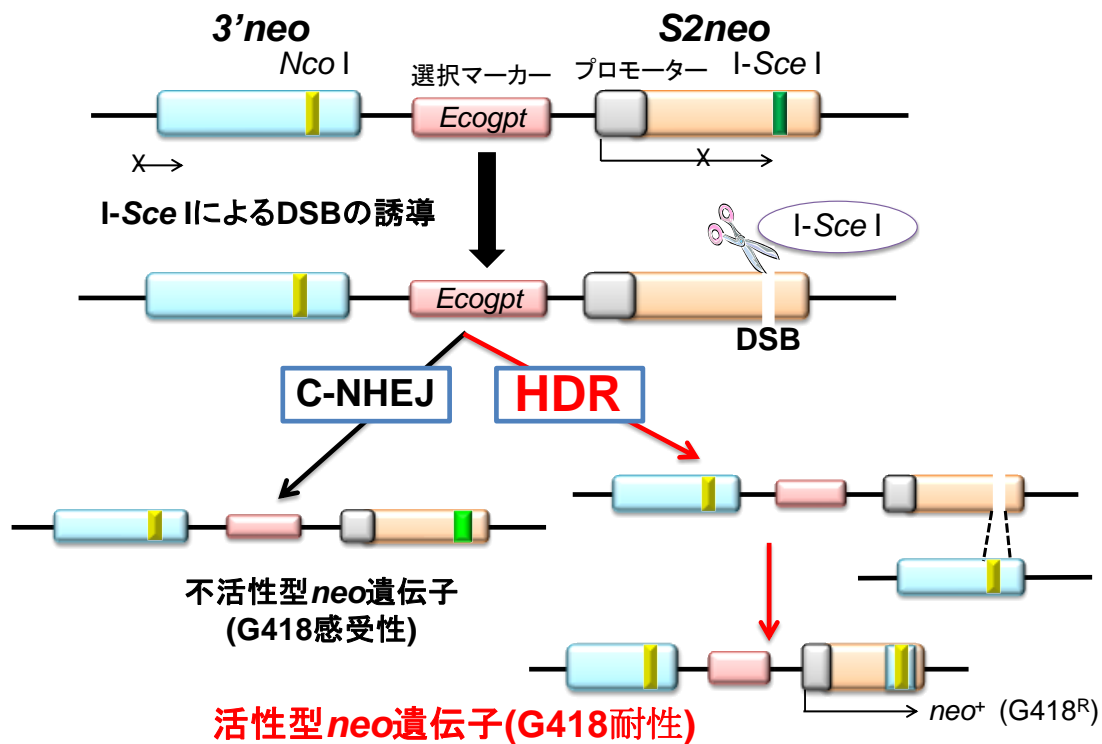


図 4: 改変型 SCneo レポーターの構造と HDR の解析原理 [Johnson & Jasin 2000, Tauchi *et al.* 2002]

改変型 SCneo レポーターは、薬剤耐性遺伝子を利用して HDR 効率を検出するレポーター遺伝子であり、様々な研究で広く用いられている。このレポーター遺伝子には出芽酵母のホーミングエンドヌクレアーゼ I-Sce I の認識配列が含まれ、I-Sce I は 18 塩基の配列を認識し、哺乳類細胞ゲノム中にはその認識配列は存在しないとされている。エンドヌクレアーゼ I-Sce I によって改変型 SCneo 内の I-Sce I 認識配列に DSB を生じさせ、DSB が HDR によって修復された場合のみ細胞がネオマイシン耐性となることを利用して HDR 頻度の解析が可能である。

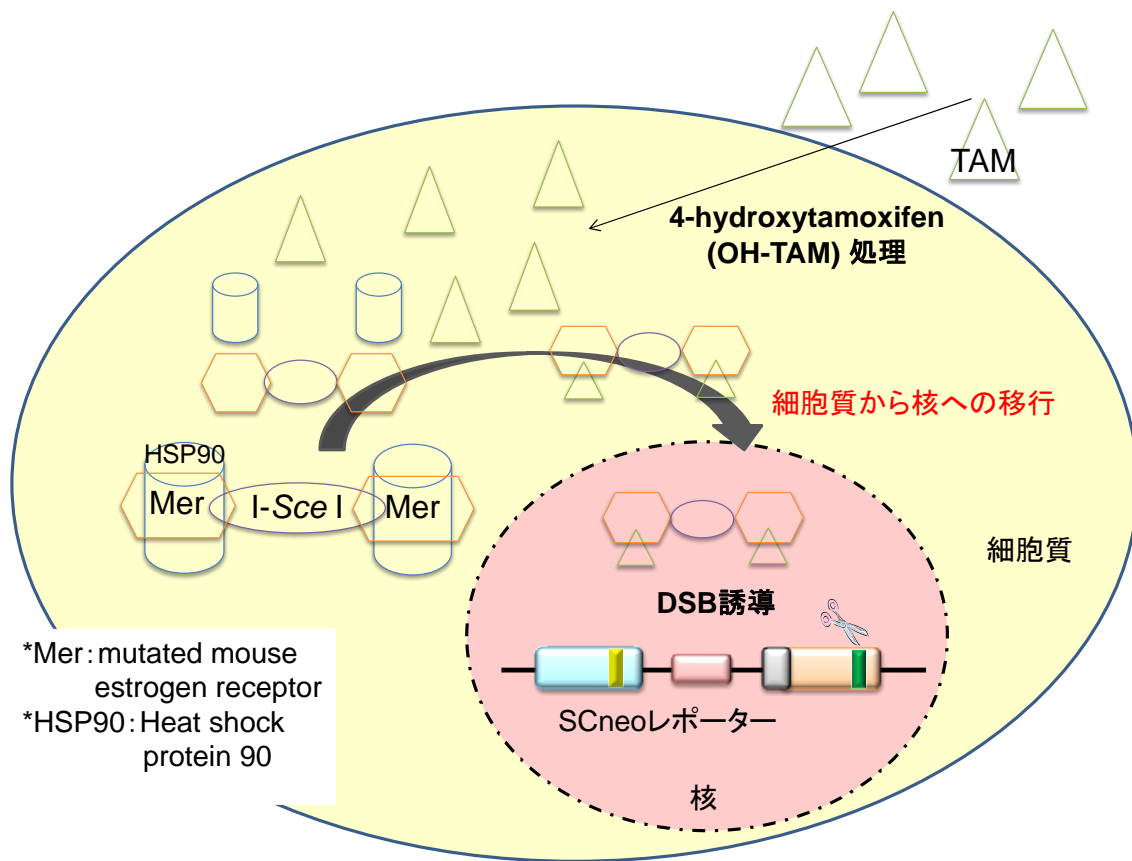


図 5: 4-hydroxytamoxifen (OH-TAM) による DSB の導入制御の概略図

本研究で用いた細胞には、I-Sce I エンドヌクレアーゼと変異型マウスエストロゲンレセプター (Mer) の融合タンパク質である Mer-I-Sce I が導入されている。Mer-I-Sce I 融合タンパク質は、部位・時期特異的に改変型 SCneo レポーターへ DSB を導入することのできるシステムである。Mer-I-Sce I は通常 heat shock protein 90 (HSP90) と結合して細胞質内に局在しているが、培地への 4-hydroxytamoxifen (OH-TAM) の添加によって Mer-I-Sce I が HSP90 と解離し核内に移行することで、SCneo レポーター上の I-Sce I 認識配列に DSB を導入することができる。このシステムにより OH-TAM の添加で DSB 導入のタイミングを制御できる。

## 第2章 材料と方法



#### 主な試薬および薬剤

- Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (11965-092, Gibco)
- Fetal Bovine Serum (FBS) (SH30071.03, HyClone®)
- mycophenolic acid (Wako)
- puromycin (161-19391, SIGMA)
- 4-hydroxytamoxifen [OH-TAM] (SIGMA)
- TaqMan MGB Master Mix (Thermo-Fischer)
- Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH] (Thermo-Fischer)
- KaryoMAX™ Colcemid™ (1465390, Gibco)
- Propidium Iodide [PI] (SIGMA)
- G418 (345810, Calbiochem)
- ExTaq DNA polymerase (#R007A, TaKaRa)
- 16% Formaldehyde (#28908, Thermo-Fischer)
- Protein G Sepharose (17-0618-01, GE Healthcare)

#### 使用した抗体

- Anti-Estrogen Receptor  $\alpha$  antibody (#06-935, Merck-Millipore)
- Anti-gamma H2A.X (phospho S139) antibody (ab81299, Abcam)
- Anti-NBS1 antibody (GTX70224, GeneTex)
- Anti-Rad51 antibody (Bio Academia)
- Anti-53BP1 antibody (A300-272A, Bethyl)
- Anti-DNA-PKcs (phospho S2056) antibody (ab18192, Abcam)

#### 使用した機器

- Step-One™ Real Time PCR System (Thermo-Fischer)
- Tali® image-based cytometer (Thermo-Fischer)
- Bioruptor UCD-300 (Cosmo-Bio)

#### プラスミドとレポーターコンストラクト

変異型マウスエストロゲンレセプター (Mer) ペプチド [Zhang *et al.* 1996] を pCMV-I-Sce I ベクター [Johnson *et al.* 1999] 内の I-Sce I エンドヌクレアーゼ配列の N 末端と C 末端の両側に融合させて Mer-I-Sce I-Mer 融合タンパク質発現ベクターを作成した。Mer-I-Sce I-Mer 発現ベクターは、京都大学の高田穰博士、九州大学の北尾洋之博士との共同研究によるものであり、

Memorial Sloan Kettering Cancer Center の M. Jasin 博士によって提供された I-Sce I 発現ベクター [Johnson *et al.* 1999] の I-Sce I コード配列と Mer を 3xnl5 で連結して pcDNA™ 3.1 にクローニングしたものである。改変型 SCneo レポーターコンストラクトは、M. Jasin 博士より提供され、Tsuchi *et al.* (2002) により改変されたものを使用した。

#### SCneo-Mer-I-Sce I 細胞株の樹立と培養

改変型 SCneo レポーターを含むベクター [Tsuchi *et al.* 2002] はヒト胎児肺線維芽細胞 MRC5/SV (理研細胞バンク) にトランスフェクションされた。1 コピーの SCneo レポーターコンストラクトを持つ細胞株はサザンブロット解析を使用して選択し [Tsuchi *et al.* 2002]、得られた細胞株に Mer-I-Sce I-Mer 融合タンパク質発現ベクターおよびピューロマイシン耐性ベクター pApuro [Takata *et al.* 1994] を共にトランスフェクションし、ピューロマイシン (0.1 µg/ml) を含む培地で培養することにより安定したクローンを選択した。ピューロマイシンで選択したクローンにおける Mer-I-Sce I-Mer 融合タンパク質の発現は、抗エストロゲン受容体抗体 (#06-935、Merck-Millipore) を使用したウエスタンブロット解析で確認した。Mer-I-Sce I-Mer 発現細胞の homology-directed repair (HDR) 頻度をテストし、バックグラウンド頻度が低く、安定した HDR 頻度が最も高い細胞株を獲得した。この研究で行われた全ての実験は、1 つの特定のクローン (MRC5/SV + SCneo + Mer-I-Sce I #1-4) を使用した。

樹立された MRC5/SV + SCneo + Mer-I-Sce I #1-4 細胞は、Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) (11965-092, Gibco) に 7% Fetal Bovine Serum (FBS) (SH30071.03, HyClone®)、0.05% ゲンタマイシン硫酸塩溶液、1.5 µg/ml mycophenolic acid (Wako) と 0.1 µg/ml puromycin (161-19391, SIGMA) を添加した培地を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub> に設定した CO<sub>2</sub> イ

ンキュベーター (ESPEC) で十分な湿度を保って行った。

#### リアルタイム PCR による DSB 導入時間および DSB 再結合の解析

細胞周期を同調または非同調の MRC5/SV + SCneo + Mer-I-Sce I #1-4 細胞を 4-hydroxytamoxifen (OH-TAM) (400 nM) で 1 時間処理した。OH-TAM の添加後 30、45、60、75 および 90 分で細胞を回収し、2%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) および 0.1 mg/ml プロテインアーゼ K (Wako) を添加した Tris-HCl バッファー (pH 7.5) に溶解し、その後ゲノム DNA を抽出した。I-Sce I 認識部位での DSB 誘導によって完全長の S2neo 配列のコピー数が減少することを利用し、リアルタイム PCR によって、完全な S2neo 断片の比率を決定した。解析には、TaqMan MGB マスターミックス (Thermo-Fischer) および Step-One Real Time PCR System (Thermo-Fischer) を使用して実施した。TaqMan プローブと S2neo 用のプライマーセットの配列は次の通りであり、TaqMan プローブは 5'-AATATCATGGTGGAAAATG-3'、プライマーセットはフォワードプライマー: 5'-GCGAGGATCTCGTCGTGACT-3'、リバースプライマー: 5'-ACGGGTAGCCAACGCTATGT-3'とした。PCR のサイクル条件は、95°C で 10 分間の初期変性処理後、熱変性を 95°C で 15 秒、アニーリング/伸長反応を 60°C で 1 分間という条件で 45 サイクル行った。ゲノム量の内部コントロールとして Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Thermo-Fischer) を使用し、S2neo の delta-Ct 値と GAPDH の delta-Ct 値の相対値 (ゲノムに占める完全な S2neo の相対値) を計算した。誘導された DSB 量は、エタノール処理 (コントロール処理) における S2neo の値を 1 とした時の相対量の減少として示した。I-Sce I による DSB のポジティブコントロールは、未処理の細胞から抽出されたゲノム DNA を I-Sce I で消化した試料を用いた。

### 細胞周期の同調

細胞を低血清処理に引き続く colcemid 処理と Mitotic shake off によって、細胞周期の M 期に同調した。まず、exponential に増殖する細胞を血清飢餓条件下で 31 時間培養した。なお、この条件下において細胞は G1 期に部分的に同調され、アポトーシス細胞の数が増加することもなかった。次に、無血清培地を除去し、新鮮培地 (7%FBS 添加 D-MEM) と交換して 6 時間培養し、細胞周期を進行させた。その後、colcemid (25 ng/ml) を含む培地に交換してさらに 8 時間インキュベートした。最後に、M 期細胞を穏やかな振動 (Mitotic shake off) とピペッティングによって培地中に浮遊させ、遠心管に集めて遠心により培地を交換した。回収した M 期細胞は新鮮培地 (7%FBS 添加 D-MEM) に懸濁して 100 mm シャーレにまいて必要時間インキュベートした。同調した細胞集団の細胞周期段階については、時間ごとにトリプシン処理をして集め、エタノール固定、ヨウ化プロピジウム染色後に、Tali® image-based cytometer (Thermo-Fischer) を使用したイメージサイトメトリー解析によりモニターした。

### 染色体観察による細胞周期の確認

細胞周期を M 期に同調した細胞を目的の時間まで CO<sub>2</sub> インキュベータに静置して培養した後、細胞をトリプシン処理して回収し氷上に静置した。氷上で冷やしておいたカルノア液 [メタノール (Wako) および酢酸 (Wako) を 3:1 で混合] を添加して混合し細胞を固定した。固定した細胞懸濁液をスライドガラス上に数滴たらして風乾し、3%ギムザ染色液 (MERCK) にスライドガラスを浸して 30 分間染色し、水道水ですすいで風乾した。染色した細胞の上にオイキット (O. Kindler) を適量滴下し、カバーガラスをかけて封入し、オイキットが完全に固まってから顕微鏡で観察した。

### HDR 頻度および組換え産物の解析

細胞を OH-TAM (400 nM) を含む無血清培地で 1 時間培養することにより SCneo レポーターに DSB を導入した。新鮮培地で 2 回洗浄後、新鮮培地 (7%FBS 添加 D-MEM) 中で 24 時間培養した。細胞をトリプシン処理して G418 (Calbiochem、400 µg/ ml) を含む培地にまき直し、G418 耐性コロニーを形成させ、G418 耐性コロニーの数から Homology-directed repair (HDR) 頻度を計算した。本研究で使用した SCneo レポーターは、HDR 頻度だけでなく、HDR 産物の解析も可能である [Tauchi *et al.* 2002] (図 6) ので、HDR 産物の解析を以前に実施された方法 [Tauchi *et al.* 2002、Sakamoto *et al.* 2007] に従って行った。まず、G418 耐性コロニーからゲノム DNA を抽出し、プライマーセット (5'-CGTCGAGCAGTGTGGTTTTCA-3' と 5'-AAAGCACGAGGAAGCGGTCAG-3') および ExTaq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa) を使用した PCR によって S2neo 配列を増幅した。PCR のサイクル条件は、95°C で 2 分間の初期変性処理後、熱変性を 95°C で 40 秒、アニーリング反応を 68°C で 30 秒、伸長反応を 72°C で 90 秒という条件で 32 サイクル行った。得られた PCR 産物を制限酵素 *Nco* I または *I-Sce* I スクレアーゼで処理して、アガロースゲル電気泳動し、そのバンドパターンから short-tract gene conversion (STGC) あるいは long-tract gene conversion/sister chromatid exchange (姉妹染色分体交換) (LTGC/SCE) といった 2 種類の HDR 産物を同定した。バンドパターンと産物の判定は図 6 に示した。

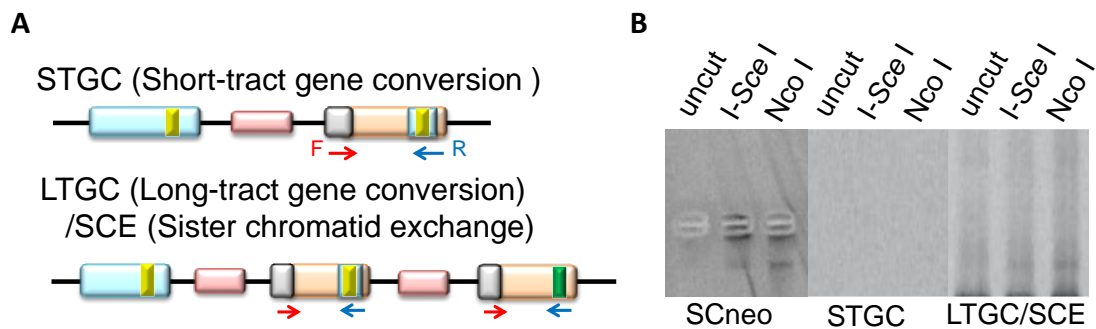


図 6: HDR 修復産物の概要と PCR、ヌクレアーゼ処理後のバンドパターン

- (A) HDR の修復産物は、*Nco* I を含む狭い領域を利用して行われる short-tract gene conversion (STGC) または *Nco* I から *I-Sce* I までの広い領域を利用して行われる long-tract gene conversion (LTGC) およびクロスオーバーイベントである姉妹染色分体交換 (sister chromatid exchange: SCE) の 2 種類に分類することができる。
- (B) S2neo 遺伝子両端にプライマーを設定し、PCR で増幅した後、制限酵素 *Nco* I または *I-Sce* I ヌクレアーゼで増幅産物を処理する。制限酵素で切断されたかどうかを電気泳動で確認することで HDR 修復産物の判別が可能となる。図は実際のバンドパターンを示している。

### クロマチン免疫沈降

*I-Sce* I によって誘発された DSB 部位への DSB 修復因子のリクルートをクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法で解析した。まず、細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の 1% (vol/vol) ホルムアルデヒド (Thermo-Fischer) で 10 分間処理しタンパク質-クロマチン架橋反応をさせ、1.5M グリシン (最終濃度 77.5 mM) を添加してさらに 5 分間インキュベーションすることで架橋反応を停止させた。IP バッファー (50 mM Tris-HCl pH 7.5、150 mM NaCl、0.5 mM EDTA pH 8.0、1.0% Nonidet P-40) を 15 分間氷上でインキュベートすることにより細胞核を単離し、Bioruptor UCD-300 (Cosmo-Bio) を使用して超音波処理することにより 600~800bp の長さにクロマチンを断片化した。得られたクロマチン断片を ChIP 希釈バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0、167 mM NaCl、1.1% Triton X-100、0.11% デオキシコール酸ナトリウム、1/200 プロテアーゼ阻害剤カクテル、1/200 ホスファターゼ阻害剤) に懸濁してインキュベートした後、目的の抗体を加え

て 4°C で 2 時間インキュベートした。プロテイン G セファロース (GE Healthcare) を加え一晩インキュベートし、抗体に結合したクロマチン断片を回収した。使用した抗体の添加量は、抗ヒストン H2A.X-pS139 (ab81299、Abcam、[1:200])、抗 NBS1 (GTX70224、GeneTex、[1:200])、抗 Rad51 (Bio Academia、[1:200])、抗 53BP1 (A300-272A、Bethyl、[1:200]) および抗リン酸化 DNA-PKcs pS2056 (ab18192、Abcam、[1:200]) である。一晩のインキュベーション後に回収したプロテイン G セファロースを、1×RIPA バッファー (50 mM Tris-HCl pH 8.0、150 mM NaCl、1 mM EDTA pH 8.0、1%Triton X-100、0.1%SDS、0.1%デオキシコール酸ナトリウム) で 1 回、1×RIPA バッファー/500 mM NaCl (50 mM Tris-HCl pH 8.0、500 mM NaCl、1 mM EDTA pH 8.0、1%Triton X-100、0.1%SDS、0.1%デオキシコール酸ナトリウム) で1回、LiCl wash バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0、0.25M LiCl、1 mM EDTA pH 8.0、0.5%NP-40、0.5%デオキシコール酸ナトリウム) で 1 回洗浄した後に、1×TE バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA) で洗浄した。洗浄したプロテイン G セファロースからクロマチン断片を溶出するために 200 µL の ChIP direct elution バッファー (10 mM Tris-HCl pH 8.0、300 mM NaCl、5 mM EDTA pH 8.0、0.5%SDS) と共に 65°C で一晩インキュベートした。溶出したクロマチン断片は 0.1 mg/ml プロテインナーゼ K と共に 55°C で 1 時間インキュベートし、ゲノム DNA 断片をエタノール沈殿により回収した。回収した DNA 断片について以下のプライマーを用いてリアルタイム PCR 解析を行い、DSB 部位へリクルートされた修復因子量を調べた。リアルタイム PCR に使用したプライマーと TaqMan プローブは次の通りである。S2neo #341 (DSB 部位から 594 nt の位置に対応): プライマーは 5'-CGACCCTGCAGCCAATATG および 5'-AGAACCTGCGTGCAATCCA、プローブは 5'-ATCGGCCATTGAAC。S2neo #729 (DSB 部位からから 206 nt の位置に対応): プライマーは 5'-CGGCTGCATACGCTTGATC および 5'-

GATGCGATGTTTCGCTTGGT、プローブは 5'-ACCTGCCCCATTCGA。PCR のサイクル条件は、95°Cで 10 分間の初期変性処理後、熱変性を 95°Cで 15 秒、アニーリング/伸長反応を 60°Cで 1 分間という条件で 45 サイクル行った。

#### 統計解析

全てのデータは、少なくとも 3 回の独立した実験から得られたものである。データについては学生 t 検定を使用して統計検定した。HDR 頻度の細胞周期依存性解析に関しては、少なくとも 4 回の独立した実験から得られたデータを用いて統計解析を行った。



## 第 3 章

# 結果

### 3-1 リアルタイム PCR を用いた OH-TAM 処理による DSB 導入の確認

本研究では、HR の細胞周期依存性を解析するために特化した細胞系を樹立し使用している。この細胞系は、ヒト胎児肺線維芽細胞である MRC5 に、HR をはじめとする Homology を利用した修復 (HDR) を検出するためのレポーターである SCneo レポーターと、SCneo レポーターに部位・時期特異的に DSB を導入するためのシステムである Mer-I-Sce-I 融合タンパク質を安定的に発現させている。SCneo レポーターはネオマイシン耐性遺伝子を基盤とした構造で、I-Sce I の導入によって S2neo 部分に生じた DSB が HDR によって修復された場合にのみ neo 遺伝子が活性型となって発現し、細胞はネオマイシンの類似体である G418 耐性となってコロニーを形成する。Mer-I-Sce I 融合タンパク質は、4-hydroxytamoxifen (OH-TAM) を添加することによって時期特異的に核移行し SCneo レポーター内に DSB を導入できる。

OH-TAM 添加によって実際に DSB が導入できるかどうかを、非同調細胞において定量リアルタイム PCR を用いて解析した (表 1, 2, 図 7)。SCneo レポーターを構成する S2neo 内の I-Sce I 認識部位を挟む形でプライマーを設定し、I-Sce I によって DSB が誘導された場合は PCR によって S2neo 基質が増幅されないことを利用して DSB の導入を解析している。ゲノム DNA を *in vitro* で I-Sce I 消化した試料を解析した結果、確かに増幅が見られなかった (図 7 右から 2 番目)。Mer-I-Sce I 発現ベクターを導入した細胞では、OH-TAM 添加 45 分から 60 分の時点で増幅率が低くなっており、確実に DSB が導入されていることがわかった。OH-TAM を除去すると徐々に再結合が進むことも確認された (表 2)。一方で、Mer-I-Sce I を導入していない細胞 (表 1) では、OH-TAM を処理してもほとんど S2neo 量に変化がないこと、および Mer-I-Sce I を導入した細胞に OH-TAM の溶媒である EtOH 処理を 1 時間行っても S2neo への DSB 導入が誘導されないこと (図 7 右端) から、本研究で用いる細胞はおよそ 1 時間のタモ

キシフェン処理によって DSB が導入され、OH-TAM 除去後は速やかに再結合されることが確認された。

表 1: MRC5/SV + SCneo 細胞における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入タイミングの解析

OH-TAM 処理 時間 (min)	相対 S2neo/GAPDH				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	平均	標準誤差
30	1.22	0.88	0.79	1.05	0.17
45	0.86	0.80	0.76	0.83	0.03
60	0.96	0.69	1.00	0.83	0.13
75	0.88	0.72	0.81	0.80	0.08
90	1.06	0.82	0.86	0.94	0.12

相対 S2neo/GAPDH: DSB 非導入コントロールである EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値

表 2: MRC5/SV + SCneo + Mer-I-Sce I 細胞における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入タイミングの解析

OH-TAM 処理時間 (min)	相対 S2neo/GAPDH				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	平均	標準誤差
30	1.04	1.00	0.75	1.02	0.02
45	0.69	0.51	0.44	0.60	0.09
60	0.31	0.75	0.37	0.53	0.22
75	0.49	0.64	0.22	0.57	0.08
90	0.77	0.85	0.80	0.81	0.04

相対 S2neo/GAPDH: DSB 非導入コントロールである EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値

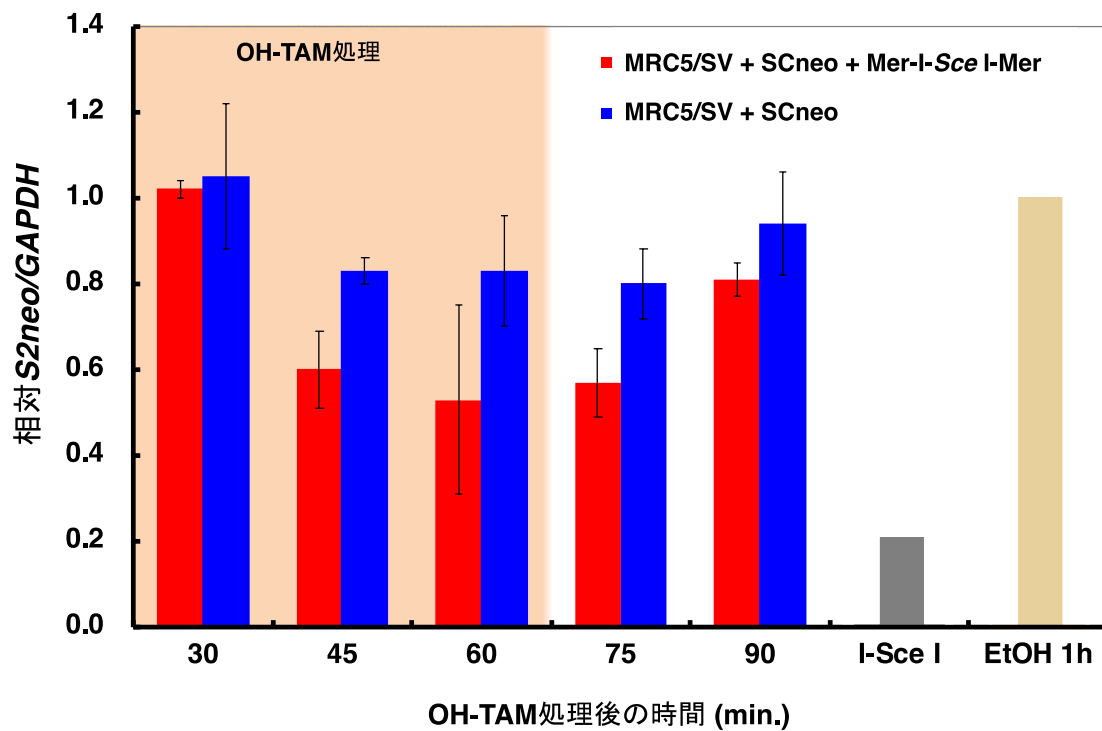


図 7: OH-TAM 処理による DSB 導入と OH-TAM 除去後の DSB 再結合  
 Mer-I-Sce I を発現する細胞と発現しない細胞について、示された時間での OH-TAM 処理後の DSB 誘導を定量リアルタイム PCR によって解析した。グラフは未処理のコントロールと比較した時の S2neo/GAPDH の相対量を表している。エラーバーは、少なくとも 3 回の独立した実験から得られた標準誤差を示す。EtOH: エタノール 1 時間処理、I-Sce I: EtOH 1h サンプルを *in vitro* で I-Sce I 処理、相対 S2neo/GAPDH: EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値。

### 3-2 細胞周期同調の確認

HR の細胞周期依存性を解析するにあたり、まず血清飢餓と colcemid 処理による細胞周期の同調を行った。本研究で使用した細胞株 MRC5/SV + SCneo + Mer-I-Sce I #1-4 の倍加時間は 30~31 時間であることを参考に、細胞周期同調の処理条件と時間を決定した。31 時間の血清飢餓による G0/G1 同調、colcemid (終濃度 25 ng/ml) による M 期同調、そして shake off による M 期細胞の回収を行い、シャーレにまき直して M 期同調解放後の経過時間と細胞周期の関係を解析した。細胞周期解析は、Tali<sup>®</sup> Image-Based Cytometer (Thermo Fisher Scientific) を利用したイメージサイトメトリー (図 8) もしくは FACS (fluorescence-activated cell sorting) を用いたフローサイトメトリーによって実施した。

同調後 0 時間では G2/M 期細胞が約 70~80%と大部分を占めており、時間が進むにつれて細胞周期が進行し、同調解放後 3~12 時間は G1 期、12 時間から S 期に入り始め、16 時間後では S 期後期に到達、20 時間で再び G2 期へ移行することが確認された。

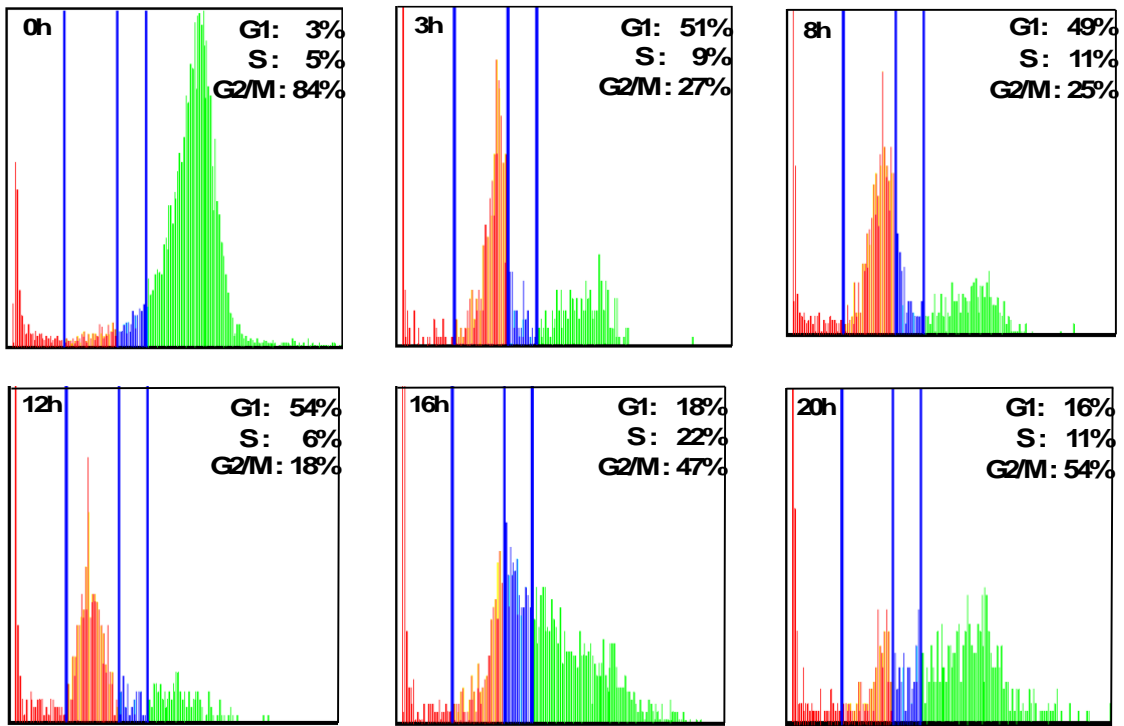


図 8: Tali® Image-Based Cytometer による細胞周期の確認

同調開放後の時間を各データの左上に示し、細胞周期割合の解析結果を右上に示した。

Tali® Image-Based Cytometer による解析のみでは DNA 量が同等の G2 期細胞と M 期細胞を区別することができないため、顕微鏡による細胞核の観察も実施した (図 9、10)。固定した細胞をギムザ染色し、染色体が凝縮しているかどうかを判断基準として G2 期と M 期の細胞の割合を解析した。図 9 に示すように、Mitotic shake off で得られた細胞の大半は M 期であり、計数解析より約 80%の細胞が M 期であることが確認された (図 10)。

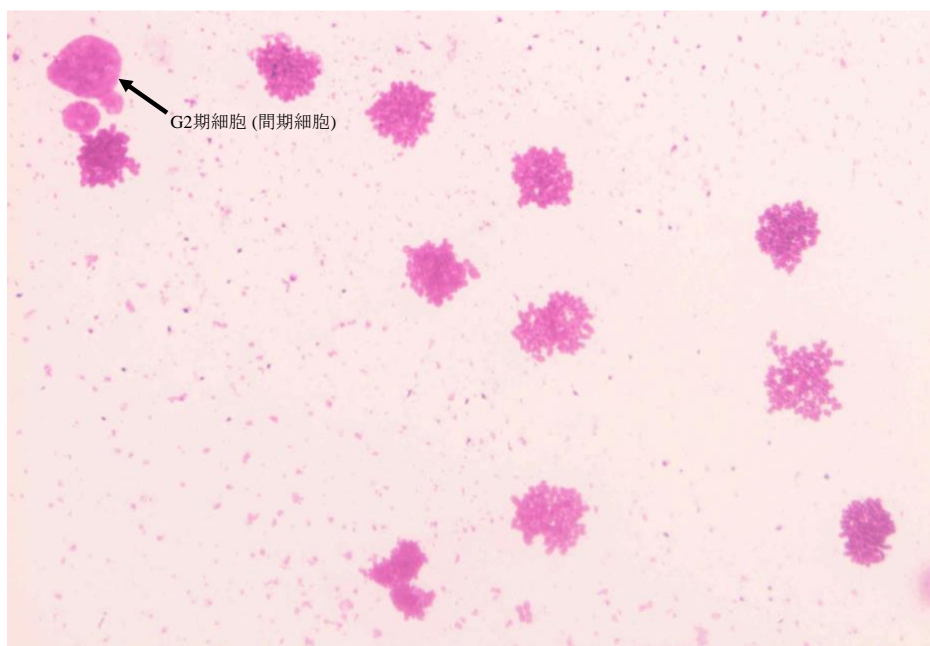


図 9: 同調解放後 0 時間における代表的な染色体観察画像  
矢印で示した細胞のみが G2 期 (間期) 細胞であり、残りの細胞は全て M 期細胞である。

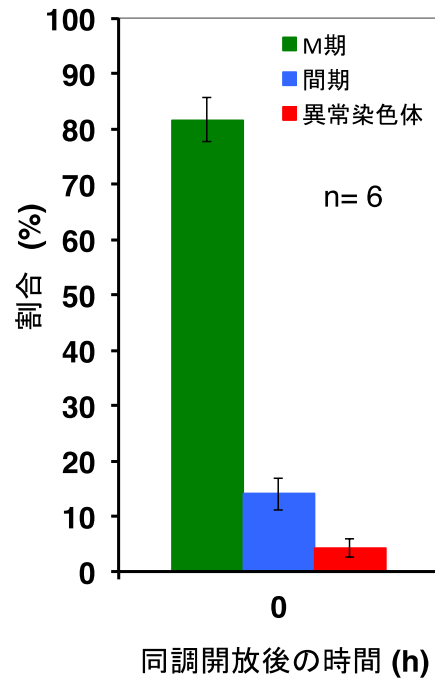


図 10: 染色体観察による細胞周期同調解放直後の M 期割合解析

全細胞における M 期細胞、G2 期 (間期細胞)、異常染色体を持つ細胞の割合を示した。データは 1 回の実験につき 1000 個以上の細胞核を解析した結果である。Bar は 6 回の独立した実験から得られた標準誤差を示す。



MRC5/SV + SCneo + Mer-I-Sce I #1-4 細胞の放射線感受性の細胞周期依存性を調べた結果、M 期である同調後 0 時間で最も生存率が低く、ほとんどが G1 期細胞と考えられる同調後 3 時間にかけて生存率は増加し、その後 9 時間まで同程度となっている。その後 S 期に入ると考えられる同調後 12 時間で生存率がわずかに低下し、S 期後半である 18 時間後に最も生存率が高くなった (図 11)。この結果は、過去に報告されている放射線感受性の細胞周期依存性 [Terasima & Tolmach 1963a, Sinclair 1968] と一致していることから、本研究で用いた細胞においても、ゲノムに導入している SCneo レポーターや Mer-I-Sce I 融合タンパク質の影響を受けずに、DNA 損傷応答機構が正常に機能していることが確認された。

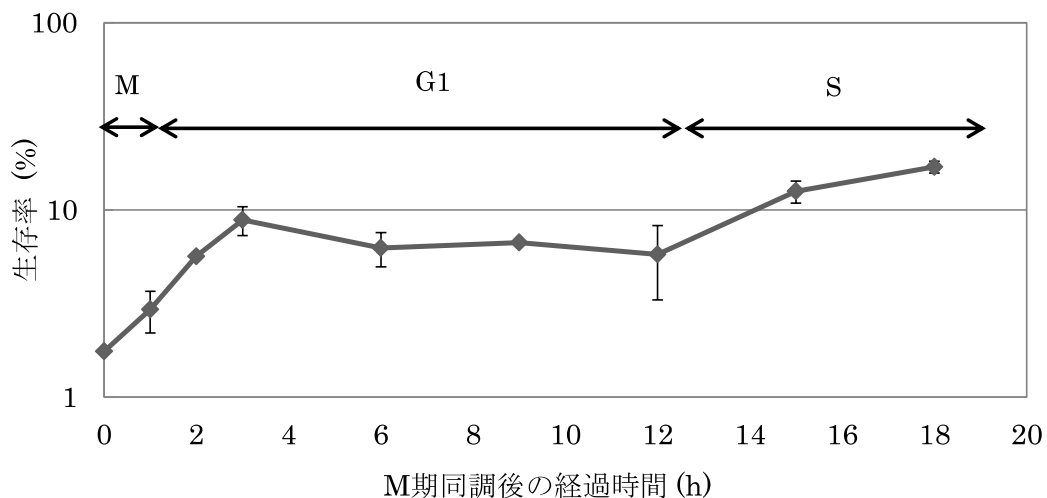


図 11: 4Gy の X 線に対する生存率の細胞周期依存性  
Bar は 2 回の独立した実験から得られた標準誤差を示す。

さらに、OH-TAM 処理中に継続して colcemid を添加し続けた場合と、同調解放のために colcemid を除去した場合について OH-TAM 処理後1時間での細胞周期を解析した (図 12)。colcemid を除去して OH-TAM で 1 時間処理された M 期同調細胞は、OH-TAM 1 時間の処理終了時に一部が G1 期に進行していたが、colcemid を継続的に処理していた場合は M 期に停止したままであることが確認された。

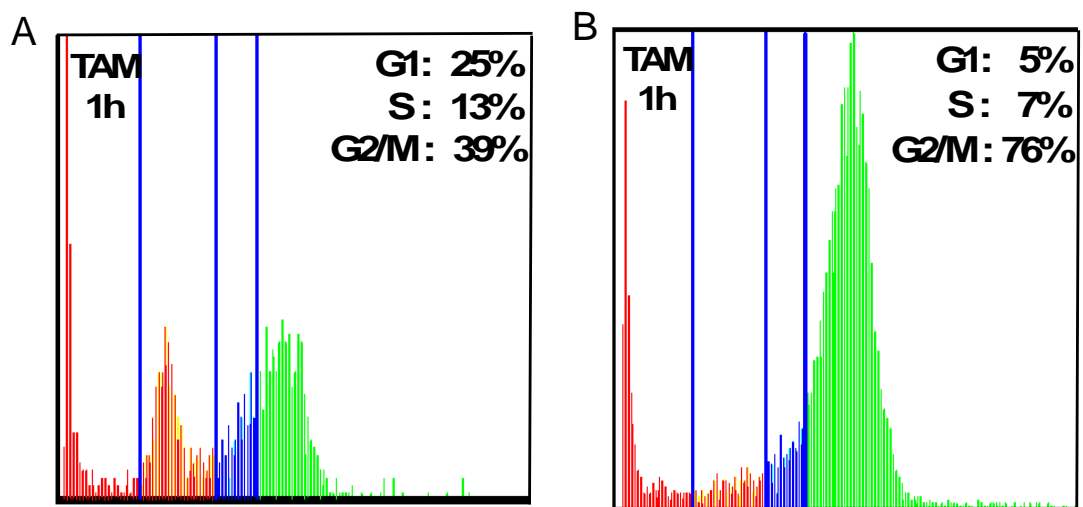


図 12: 1 時間の OH-TAM 処理終了時における同調解放した M 期あるいは colcemid で継続処理した M 期細胞の細胞周期

Tali® Image-Based Cytometer による解析の例を示す。

(A) colcemid を除去して OH-TAM 処理 (1h) した場合

(B) OH-TAM 処理 (1h) 中に colcemid を継続的に処理していた場合

### 3-3 同調細胞における DSB 導入および DSB 再結合の確認

各細胞周期に同調した細胞においても OH-TAM 添加によって DSB が導入できるかどうかを、S2neo 配列に対する定量リアルタイム PCR を用いて解析した (表 3-8) (図 13-18)。非同調細胞で観察された DSB 導入およびその後の再結合 (図 7) と同様の時間経過が、解析したどの細胞周期においても観察された。なお、M 期においては核膜が消失していることから核移行制御ではなく Mer-I-Sce I-Mer と HSP90 との結合が解除されたことにより DSB が導入されたものと考えられる。いずれにしても、Mer-I-Sce I-Mer 融合ヌクレアーゼによる DSB 誘導は、細胞周期全体を通じて機能することが示された。

表 3: MRC5/SV + SCneo + Mer I-Sce I 細胞 (同調開放後 0h) における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB の解析

0h	相対 S2neo/GAPDH				
OH-TAM 処理 時間 (min)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	平均	標準誤差
30	1.77	1.75	2.35	1.96	0.20
45	0.65	1.31	1.5	1.15	0.26
60	0.88	1.55	1.01	1.15	0.21
75	1.4	2.38	1.77	1.85	0.29
90	1.33	2.23	1.96	1.84	0.27

相対 S2neo/GAPDH: EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値

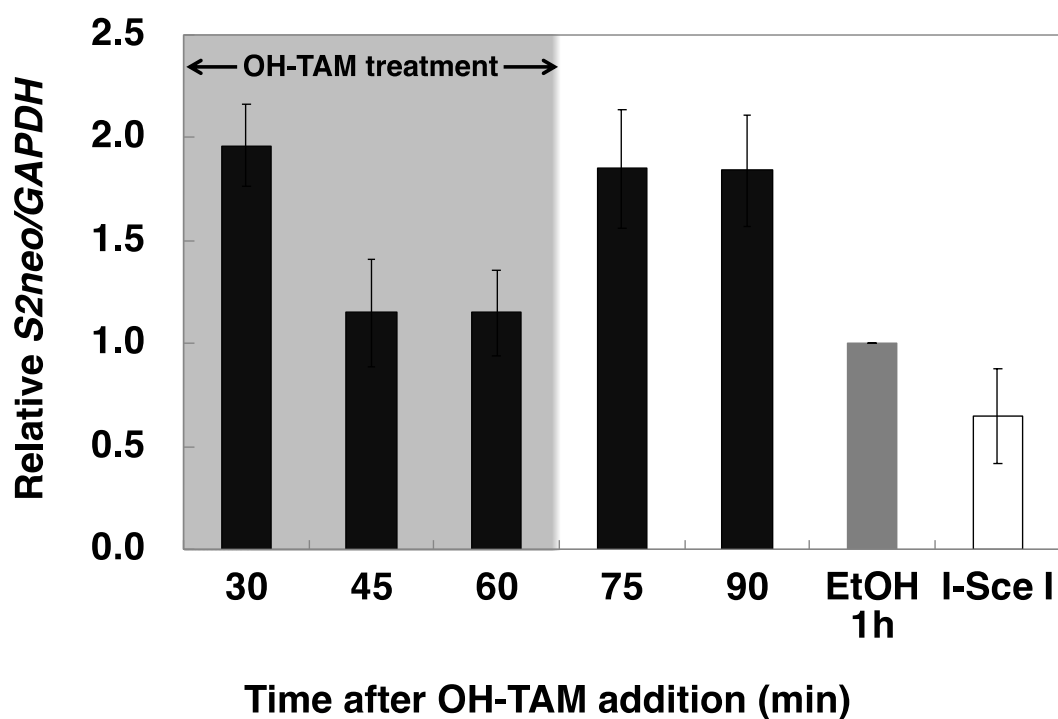


図 13: 同調解放後 0h (M 期) における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入と再結合  
OH-TAM 処理は 1 時間である。Bar は 3 回の独立した実験から得られた標準誤差を示す。

表 4: MRC5/SV + SCneo + Mer I-Sce I 細胞 (同調開放後 3h) における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB の解析

3h	相対 S2neo/GAPDH				
OH-TAM 処理 時間 (min)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	平均	標準誤差
30	0.88	2.01	1.8	1.56	0.35
45	0.51	0.84	1.32	0.89	0.24
60	0.66	1.26	1.05	0.99	0.18
75	0.86	1.63	1.92	1.47	0.32
90	0.75		1.27	1.01	0.26

相対 S2neo/GAPDH: EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値

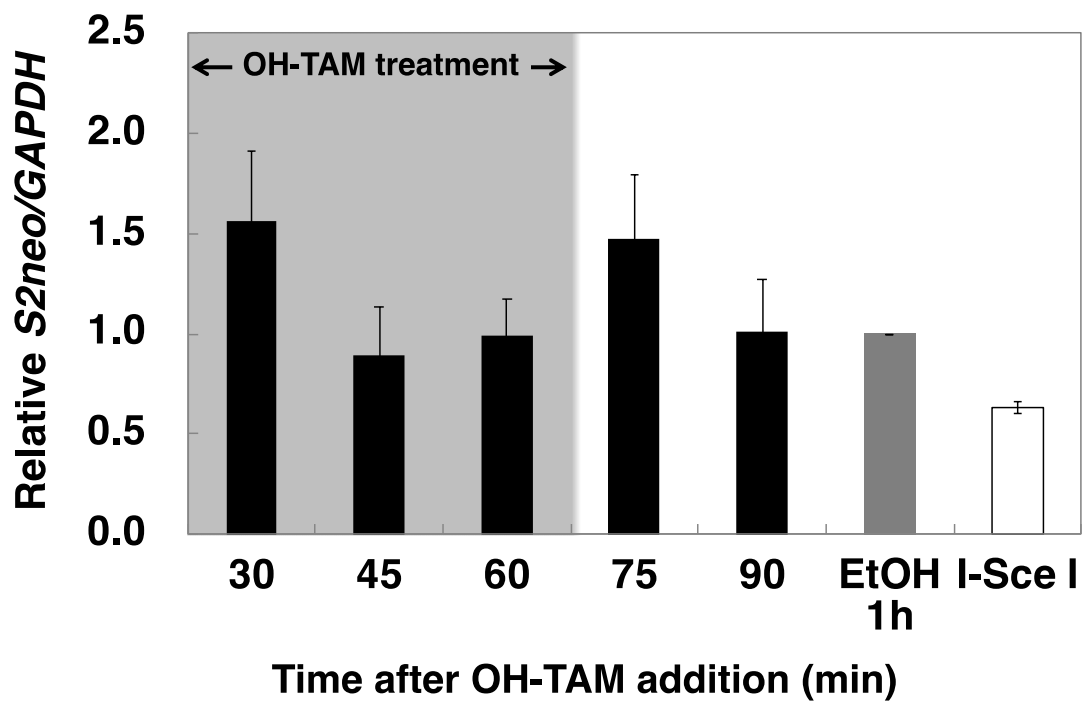


図 14: 同調解放後 3h における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入と再結合  
OH-TAM 処理は 1 時間である。Bar は 3 回の独立した実験から得られた標準誤差を示す。

表 5: MRC5/SV + SCneo + Mer I-Sce I 細胞 (同調開放後 8h) における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB の解析

8h	相対 S2neo/GAPDH
OH-TAM 処理 時間 (min)	Exp. 1
30	1.16
45	0.77
60	0.72
75	0.96
90	0.93

相対 S2neo/GAPDH: EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値

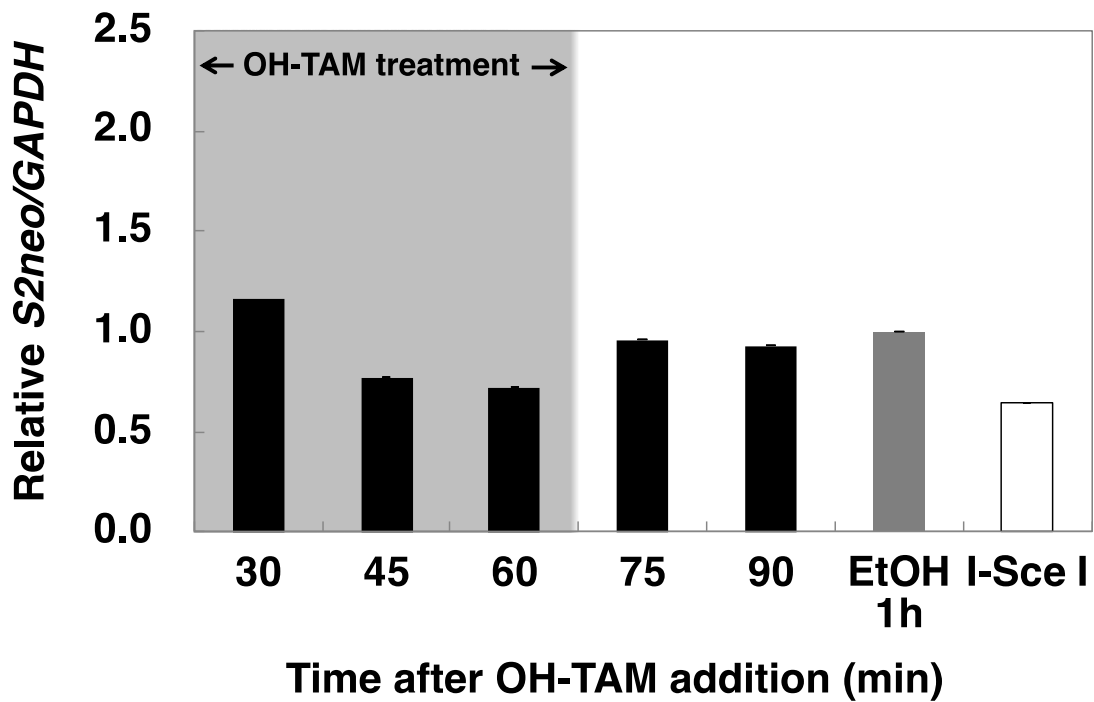


図 15: 同調解放後 8h における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入と再結合  
OH-TAM 処理は 1 時間である。

表 6: MRC5/SV + SCneo + Mer I-Sce I 細胞 (同調開放後 12h) における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB の解析

12h	相対 S2neo/GAPDH			
OH-TAM 処理 時間 (min)	Exp. 1	Exp. 2	平均	標準誤差
30	1.48	1.57	1.53	0.05
45	0.95	0.92	0.94	0.02
60	0.83	1.06	0.95	0.12
75	1.93	1.41	1.67	0.26
90	0.93	1.41	1.17	0.24

相対 S2neo/GAPDH: EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値

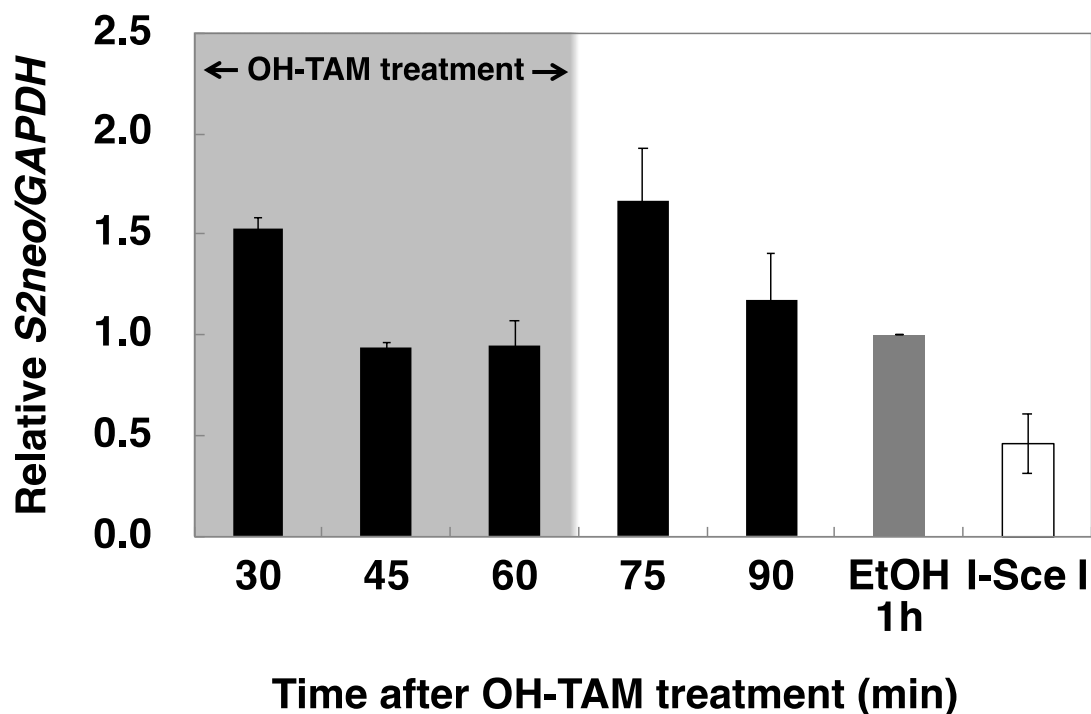


図 16: 同調解放後 12h における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入と再結合  
OH-TAM 処理は 1 時間である。Bar は 2 回の独立した実験から得られた標準誤差を示す。

表 7: MRC5/SV + SCneo + Mer I-Sce I 細胞 (同調開放後 16h) における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB の解析

16h	相対 S2neo/GAPDH				
OH-TAM 処理 時間 (min)	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	平均	標準誤差
30	1.41	1.49	1.31	1.40	0.05
45	0.52	0.91	0.82	0.75	0.12
60	1.09	1.07	0.74	0.97	0.11
75	1.2	1.36	1.21	1.26	0.05
90	0.88	1.22	1.03	1.04	0.10

相対 S2neo/GAPDH: EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値



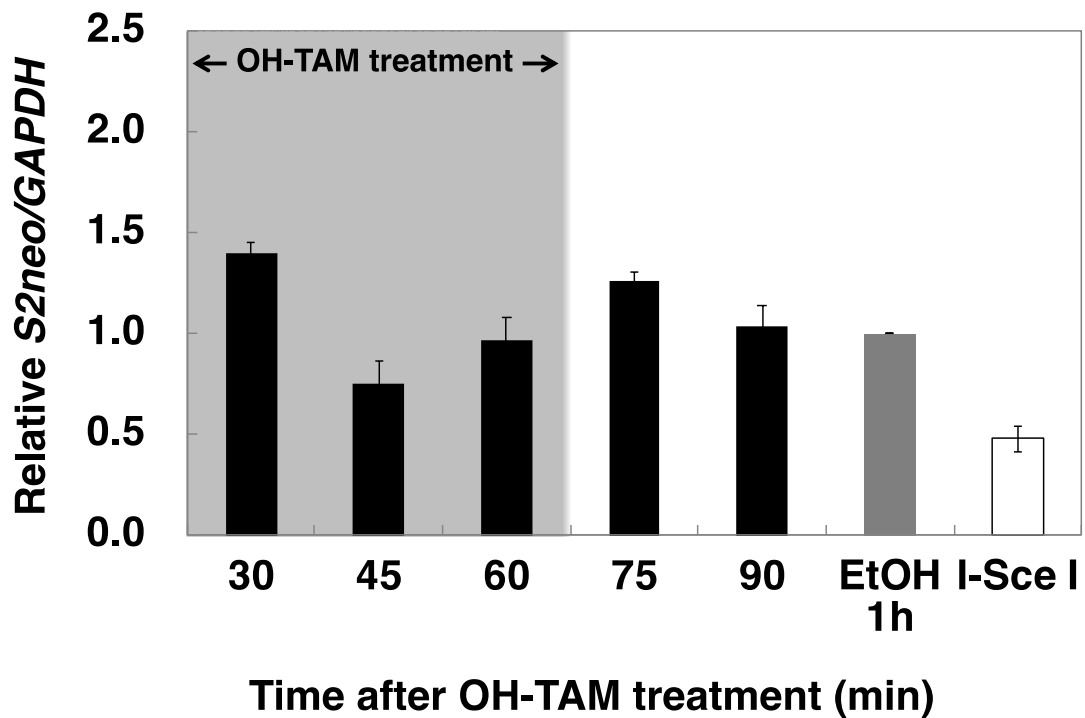


図 17: 同調解放後 16h における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入と再結合  
OH-TAM 処理は 1 時間である。Bar は 3 回の独立した実験から得られた標準誤差を示す。

表 8: MRC5/SV + SCneo + Mer I-Sce I 細胞 (同調開放後 20h) における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB の解析

20h OH-TAM 処理 時間 (min)	相対 S2neo/GAPDH				
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3	平均	標準誤差
30	2	1.9	1.54	1.81	0.14
45	1.09	0.87	1.05	1.00	0.07
60	1.09	0.91	0.94	0.98	0.06

75	1.95	1.93	1.34	1.74	0.20
90	1.54	1.7	1.21	1.48	0.14

相対 S2neo/GAPDH: EtOH 処理サンプルの S2neo/GAPDH を 1 とした時の相対値

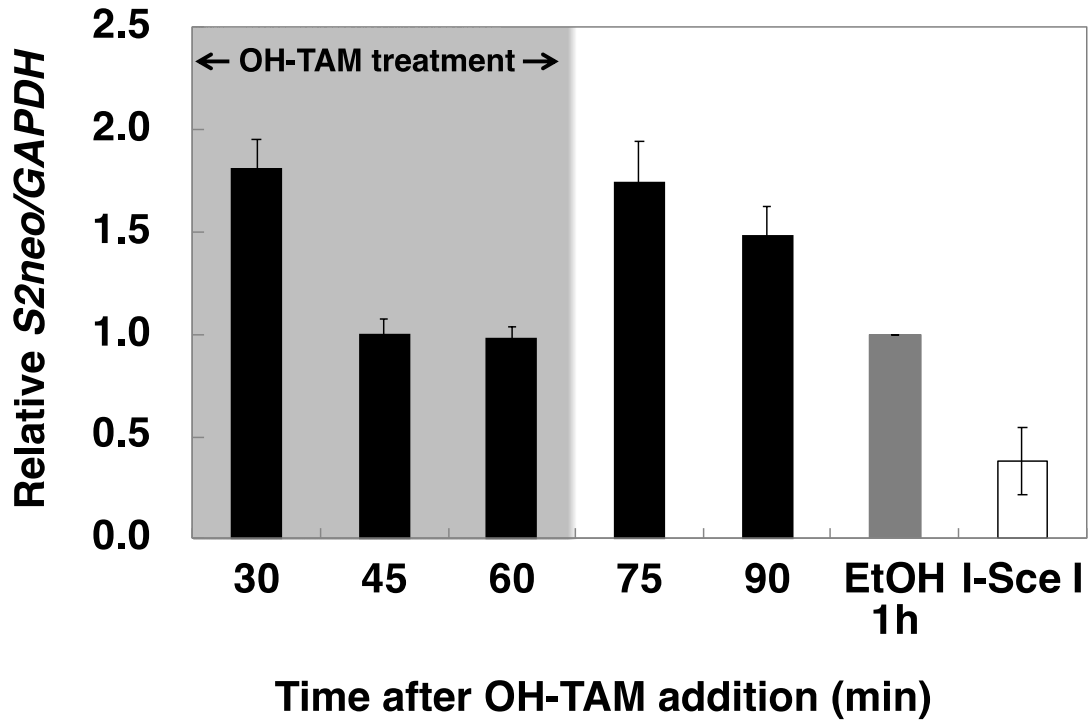


図 18: 同調解放後 20h における S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入と再結合  
OH-TAM 処理は 1 時間である。Bar は 3 回の独立した実験から得られた標準誤差を示す。

### 3-4 HDR 頻度の細胞周期依存性

SCneo に時間・部位特異的に導入した DSB に対する HDR 頻度の細胞周期依存性の解析結果を図 19 に示した。S 期後半にあたる同調解放後 16 時間では、以前から報告されている結果と一致して HDR 頻度が最も高く、G1/S 期の境界付近の 12h では最も HDR 頻度が低く

なった。興味深いことに、同調解放直後の M 期細胞においても S 期と同程度とはいかないまでも G1 期と比べて明らかに高いレベルで HDR が起きており、同調後 3 時間では HDR 頻度が明らかに低下していることから M 期細胞で HDR が機能することが示唆された。

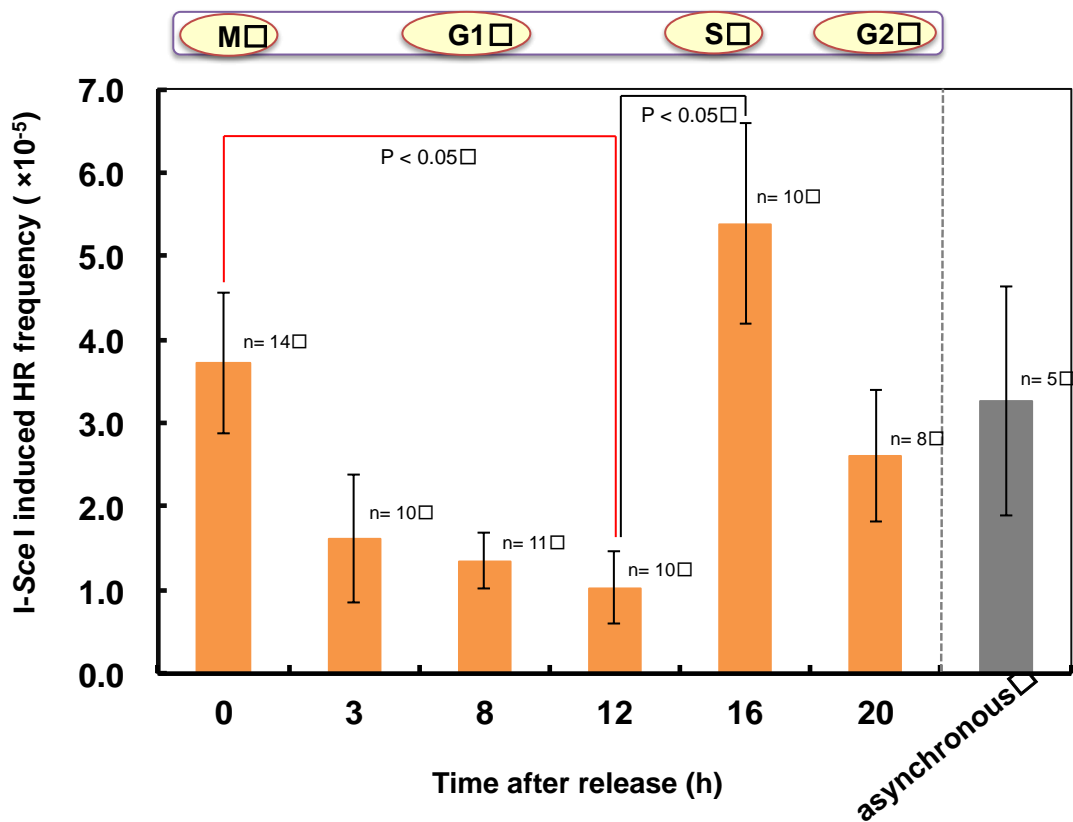


図 19: HDR 頻度の細胞周期依存性解析結果

横軸は同調開放後の時間、縦軸は I-Sce I 誘発の HDR 頻度を示す。

Bar は少なくとも 5 回の独立した実験から得られた標準誤差を示し、各時間ポイントにおける実験回数を n で示した。

本研究では細胞周期を M 期に同調した後で colcemid を除き、1 時間の OH-TAM 処理を行い、HDR 頻度を解析してきたが、OH-TAM 処理を行っている 1 時間の間での細胞周期進行が HDR 頻度に影響を及ぼし、M 期における HDR 頻度を直接的に解析できていない可能

性が考えられた。そこで、その可能性を排除するために、1 時間の OH-TAM 処理の間も colcemid を添加したままにすることで細胞周期の進行を制限し、OH-TAM による DSB における HDR 頻度の解析を行った (図 21)。加えて、継続した colcemid 処理によって DSB 導入およびその後の再結合に影響が見られないこともリアルタイム PCR による解析で確認した (表 9、図 20)。

colcemid を添加したままで細胞周期を M 期に留まらせた場合においても、コルセמידを除いた場合の結果と比較して大きな変化は見られず、高い HDR 頻度を示した (図 21)。

以上の観察結果は、DSB の少なくとも数%が M 期に修復可能であり、一部の DSB は修復されずに、次の細胞周期段階まで残存する可能性があることを示している。

表 9: MRC5/SV + SCneo + Mer I-Sce I 細胞 (同調開放後 0h) における継続した colcemid 処理後の S2neo への OH-TAM 誘導 DSB の解析

0h (+colcemid)	相対 S2neo/GAPDH
OH-TAM 処理 時間 (min)	Exp. 1

30	0.94
45	0.96
60	0.65
75	0.65
90	0.99

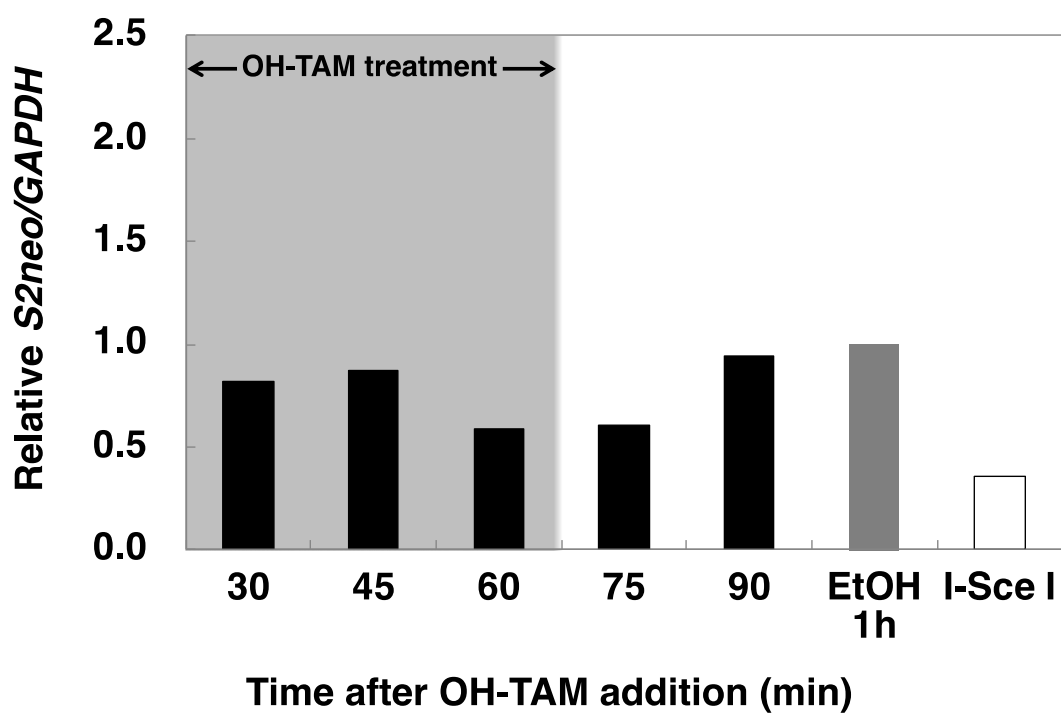


図 20: 同調解放後 0h (M 期) における継続した colcemid 処理後の S2neo への OH-TAM 誘導 DSB 導入と再結合  
OH-TAM 処理は 1 時間である。

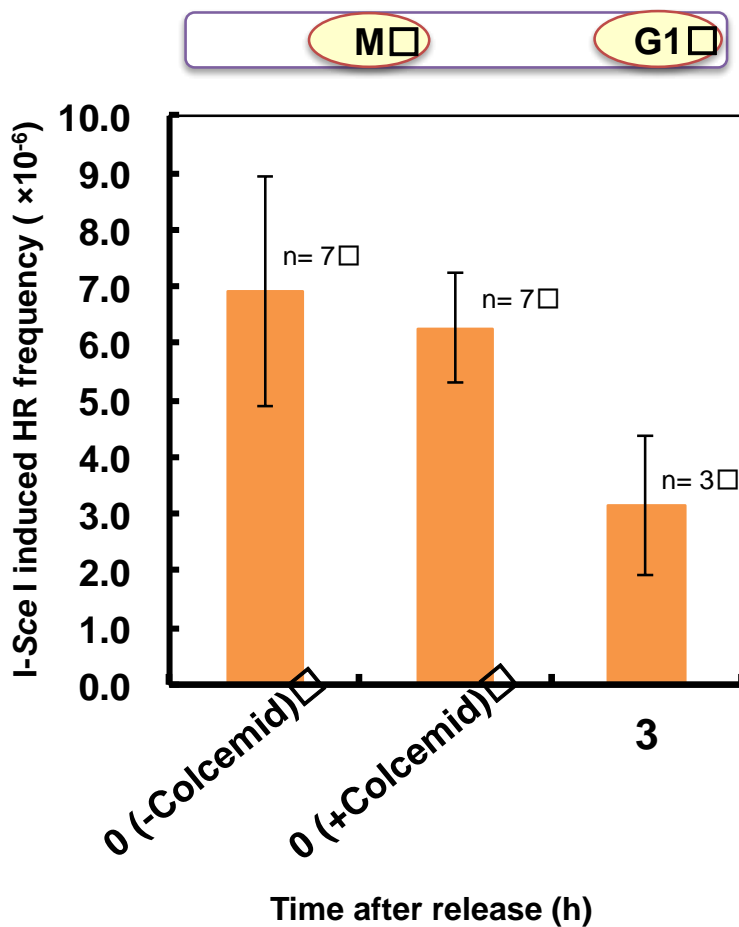


図 21: 継続した colcemid 処理を行った M 期細胞における HDR 頻度  
 横軸には同調開放後の時間および処理条件、縦軸は I-Sce-I 誘発の HDR 頻度を示す。0 (-colcemid) は同調解放後に OH-TAM 処理をした細胞、0 (+colcemid) は OH-TAM 処理中も colcemid を継続して添加した細胞である。比較のために、同調解放後 3 時間の G1 期細胞についても改めて解析した。Bar は少なくとも 3 回の独立した実験から得られた標準誤差を示し、その実験回数を n で示した。

### 3-5 HDR 組換え型の解析

本研究で使用した SCneo レポーターは、HDR の組換え型も検出可能であり、修復に短い領域を利用した STGC 型と、長い鑄型領域を利用した LTGC 型もしくは姉妹染色分体交換 (SCE) による型の 2 型に分けられる。S2neo 配列の両端にプライマーを設定して PCR で増幅後、制限酵素 *Nco* I または *I-Sce* I ヌクレアーゼ処理を行い、電気泳動するとバンドパターンにより STGC 型と LTGC/SCE 型の区別が可能となる (図 22)。

解析の結果、細胞周期全体を通してほとんどの HDR 修復が STGC 型で行われていることが確認された。なお、多少ではあるが S 期に進行するにつれて LTGC/SCE による HDR が増加する傾向が認められた (表 10、図 23)。

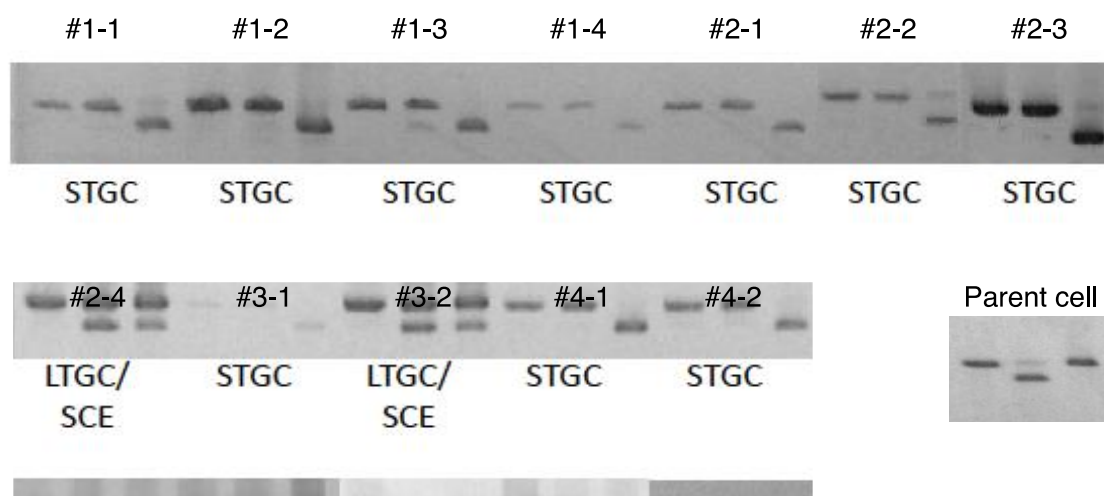


図 22: 組換え型解析結果の例

試料の番号はクローン番号、Parent cell は元の S2neo を示し、分析結果を STGC、LTGC/SCE で示した。

表 10: HDR 産物の解析結果

同調解放後の時間 (h)		解析クローン数	修復産物とその割合			
			STGC		LTGC/SCE	
			クローン数	%	クローン数	%
M	0	29	25	86.21	4	13.79
G1	3	44	42	95.45	2	4.55
	8	32	31	96.88	1	3.13
S	12	33	27	81.82	6	18.18
	16	42	38	90.48	4	9.52
G2	20	38	36	94.74	2	5.26

同調解放後の時間は shake off 後の経過時間を示し、STGC は short-tract gene conversion, LTGC/SCE は long-tract gene conversion/sister chromatid exchange を示す。

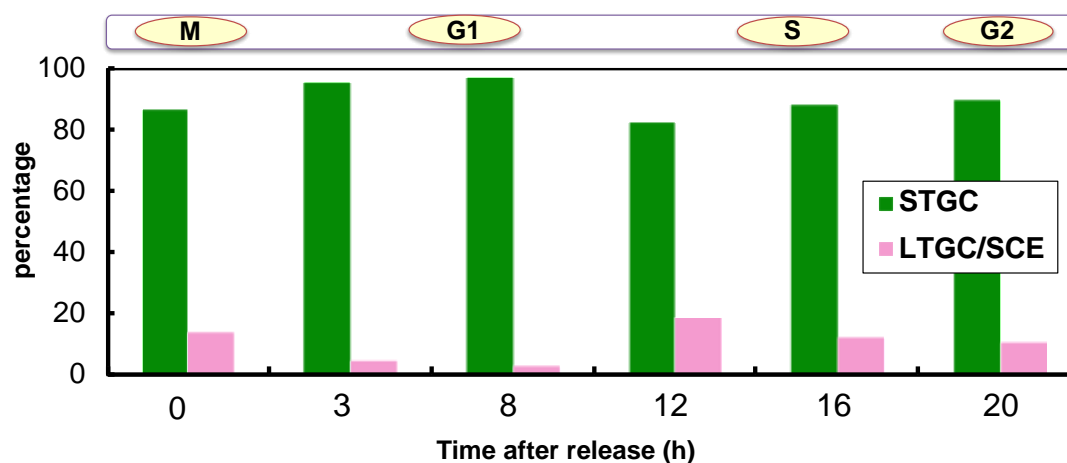


図 23: 細胞周期ごとの HDR 産物の解析結果

横軸には M 期同調から解放後の時間を示した。STGC は short-tract gene conversion, LTGC/SCE は long-tract gene conversion/sister chromatid exchange を示す。



### 3-6 M 期において生じた DSB に集積する修復因子の解析

M 期でも組換え修復 (HDR) が機能する可能性が示唆されたため、その機構に関するさらなる解析を行った。その結果を図 24 および図 25 に示した。HDR に関わる RAD51、NBS1、C-NHEJ に関わる 53BP1、DNA-PKcs に対するクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて M 期で生じた DSB 部位に集積する修復関連タンパク質を調べた。DSB 部位に集積したタンパク質量の相対値は、ヒストン H3 量によって補正を行った後に、エタノール処理したコントロール細胞で得られた結果と比較した相対値とした。

まず、DSB 部位から 206 bp 離れた DSB 近傍では、DSB マーカーとしてよく知られるリン酸化ヒストン H2AX ( $\gamma$ H2AX) の集積が DSB 導入直後から見られ、OH-TAM 除去後 1 時間で  $\gamma$ H2AX は減少し、除去後 2 時間で再び集積した。HR 修復の初期応答と HR に重要である NBS1 は、いずれの時間においてもほとんど集積は見られなかった。一方で、HR 修復に必要なタンパク質である RAD51 リコンビナーゼは、DSB 導入直後に顕著な集積の増加が見られ、OH-TAM 除去 1 時間後および 2 時間後では大幅に減少した。

DSB から 594 bp 離れた遠位部位では、 $\gamma$ H2AX が OH-TAM 除去後 2 時間にかけて徐々に集積する傾向が見られた。NBS1 は DSB 導入直後に集積が見られ、OH-TAM 除去後 1 時間でピークとなり、2 時間で減少した。RAD51 は NBS1 と同様の挙動を示した。

C-NHEJ 因子であるリン酸化 DNA-PKcs (pS2056) は、OH-TAM 除去から 2 時間後に近位部位と遠位部位の両方で明確に DSB に蓄積していた。しかし、細胞をコルセミドで継続的に処理した場合、この蓄積は見られなかった。これは、近位部位での  $\gamma$ H2AX の再びの増加と共に細胞が G1 期に進行したときに、DNA-PKcs が蓄積できたことを示唆している。DSB 誘導およびその修復期間中に細胞をコルセミドで継続的に処理した場合にも、DSB の近位および遠位の両方で OH-TAM を除去してから 1 時間後に RAD51 の広範な蓄積が検出された。

RAD51 の集積と遠位での NBS1 集積は、M 期においても HDR が機能している可能性を示唆する。

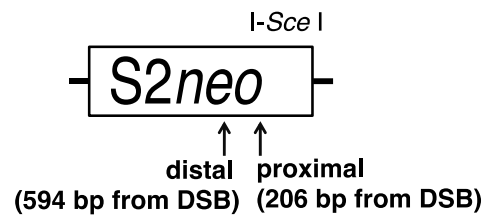


図 24: ChIP 解析で使したリアルタイム PCR プローブと S2neo レポーターに対するプライマーの位置

I-Sce I 切断部位は、太字の縦線で示した。本研究では、I-Sce I による DSB から 206 bp と 594 bp の位置にプローブを設定した。

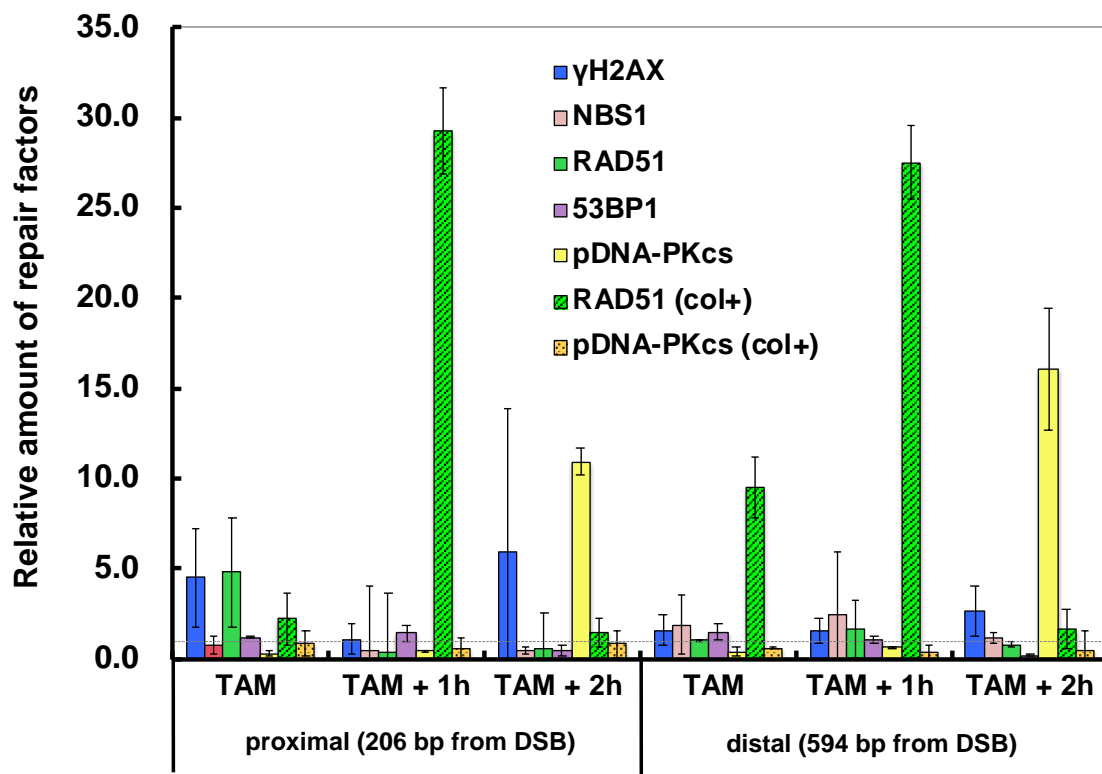


図 25: M 期で生じた DSB 付近にリクルートされる HDR 因子の ChIP 解析結果

I-Sce I 誘導の DSB 部位の近位および遠位で検出された HR 因子 (NBS1、RAD51) または C-NHEJ 因子 (53BP1、リン酸化 DNA-PKcs pS2056) の相対量を示している。修復因子の相対量は、1 時間の OH-TAM 処理直後 (TAM)、OH-TAM 除去 1 時間後 (TAM + 1h)、OH-TAM 除去の 2 時間後 (TAM + 2h) にモニターした。修復因子の相対量は、ヒストン H3 の量に対して標準化した値に基づいてエタノール処理されたコントロールを 1.0 とした時の相対値で表されている。OH-TAM 処理中に colcemid を継続的に処理した細胞の RAD51 およびリン酸化 DNA-PKcs (pS2056) の結果も合わせて示した (col+)。

## 第 4 章 考察

本研究では M 期を含めた HDR 頻度を解析するために特化した細胞系として、MRC5/SV + SCneo + Mer-I-Sce I #1-4 細胞株を樹立した。樹立した細胞株における放射線感受性の細胞周期依存性を調べたところ、過去に報告されている結果 [Terasima & Tolmach 1963a, Sinclair 1968] と一致していたことから、本研究で用いた細胞は細胞周期を同調することができ、ゲノムに導入している SCneo レポーターや Mer-I-Sce I 融合タンパク質の影響を受けずに、DNA 損傷応答機構が正常に機能していることが確認された。

I-Sce I エンドヌクレアーゼによって特異的に誘導された DSB の部位における HDR の細胞周期依存性を解析ところ、最大の HDR 頻度は S 期中期から後期 (colcemid 除去から 16 時間) で観察され、M 期である M 期同調後 0 時間と比較して G1 期集団である同調後 3 時間、6 時間にかけて HR 頻度は最も低くなった。驚くべきことに、HDR 頻度の大幅な上昇が M 期でも観察された (図 19)。M 期での HDR 頻度のこの増加は、細胞周期全体で DSB 誘導効率に差がない (図 13-18) ことから、核膜の喪失によるものとは考えにくい。すなわち、この結果は姉妹染色分体が存在する S 期後半から G2 期でのみ HR が機能するとした従来の考え [Karanam *et al.* 2012, Mladenov *et al.* 2013, Ceccaldi *et al.* 2016] とは異なり、M 期でも HR が機能することを示唆するものである。先に述べたように、電離放射線を照射した M 期細胞の生存率と比較して S 期で照射した場合の生存率の方が高かった [Terasima & Tolmach 1963a, Sinclair 1968] (図 11)。コロニー形成法による生存率の評価は、アポトーシスや増殖停止した細胞も含めて評価していることから、DNA 損傷修復は S 期細胞の方が M 期細胞よりも効率よく機能することが考えられる。これらを踏まえると、DNA 損傷修復全体に対する HR 頻度の割合は、S 期よりも M 期の方が高いことが推測される。S/G2 期における DSB 修復では HR および C-NHEJ の両方が機能できるはずである。一方、M 期では C-NHEJ が抑制されているとい

う報告があることから [Orthwein *et al.* 2014、Terasawa *et al.* 2014、Benada *et al.* 2015]、M 期における全体の DSB 修復頻度自体は低いものの、C-NHEJ よりも HR が優先的に機能していることが考えられる。

G1 期で HDR 頻度が低い理由としては、HDR に必要とされる姉妹染色分体が存在しないことが第一に考えられるが、本研究で用いた SCneo レポーターは同一鎖内での組換えも可能なことから HR において相同鎖の検索と鎖侵入を担う RAD51 と、その反応を触媒する BRCA2 の細胞周期依存的な発現量が関与する可能性の方が大きいと考えられる。RAD51 の転写は、G1 後期から M 期までの間でのみ行われ、RAD51 タンパク質の発現は G<sub>0</sub>/G1 期で最も低く、S 期で増加して G2/M 期で最も高くなることが報告されている [Yamamoto *et al.* 1996、Chen *et al.* 1997]。また、BRCA2 も RAD51 と同様に細胞周期依存的にその転写が制御されており、G1 期では mRNA のレベルが低く、G1 期後半から S 期にかけて BRCA2 の mRNA レベルが最大となることが報告されている [Vaughn *et al.* 1996]。G2 期までに発現した RAD51 や BRCA2 が G1 期には減少し、G1 期後半ではそれらの量が最小になると考えると、M 期から G1 期への細胞周期の進行に伴い、HDR 頻度が減少したことと一致する。

DSB が実際に M 期中に修復されたことをさらに確認するために、colcemid の継続的な存在下で DSB 誘導と修復を進行させた。顕著な HDR 頻度の増加が検出されたが、colcemid 除去直後に DSB を誘導した場合に見られた HDR 頻度と比べると低いものであった (図 21)。しかしながら、これらの観察は M 期の DSB が実際に HDR 経路を通して細胞分裂の前に DSB を修復できることを強く示唆するものであった。

M 期では C-NHEJ による DSB 修復が抑制されているという報告がいくつもある [Giunta *et al.* 2010、Wei *et al.* 2011、Zhang *et al.* 2011、Krajewska *et al.* 2012、Yu *et al.* 2012、Lee *et al.*

2014、Orthwein *et al.* 2014、Terasawa *et al.* 2014、Benada *et al.* 2015] が、頻繁に分裂を繰り返す細胞においては M 期でも DNA 損傷修復を必要とする可能性は十分にある。細胞分裂が頻繁に行われていると考えられるマウス胎児期への  $\gamma$  線照射は、出生後の新生児よりも寿命短縮率や発がんリスクが低いことが報告されている [Sasaki & Fukuda 2005]。特に 1 Gy 以下の線量では、寿命やがんの発生頻度に非照射群と有意な差がみられないことがわかっている。一般的に細胞増殖が盛んな臓器や細胞は、電離放射線に対して感受性が高いことが知られているが、本研究が明らかにした M 期で HR が機能しているという事実は、C-NHEJ よりも正確な修復が可能である HR 修復が細胞分裂の多いマウス胎児においても分裂期に機能し、その代わりに修復ができなかった細胞はアポトーシスなどで排除されている可能性が考えられる。このように、本研究の成果は胎児期での電離放射線抵抗性についての新たな知見に繋がるかもしれない。

過去のいくつかの報告 [Minocherhomji *et al.* 2015、Thompson *et al.* 2019、Godinez *et al.* 2020、Ovejero *et al.* 2020] は M 期における DSB 修復の存在を示唆しており、有糸分裂 DNA 修復合成を示す最近の報告によってさらに裏付けられる [Minocherhomji *et al.* 2015]。有糸分裂期 DNA 修復合成 (Mitotic DNA repair synthesis: MiDAS) は、近年になって新たに報告されたメカニズムであり、DNA 複製後期の中間体を解消することで複製ストレス下における細胞増殖をサポートする [Minocherhomji *et al.* 2015、Graber-Feesl *et al.* 2019]。また、真核生物において分裂期での染色体の正確な分離には、分裂後期までに DNA 複製を完全に終了させることを必要とするが、ゲノムサイズの大きな細胞は間期に複製を完了できず、不完全に複製された DNA 領域を残したまま有糸分裂期に入ることがある。この領域は MiDAS を介して分裂期初期にプロセッシングされることが知られている [Sonneville *et al.* 2019]。MiDAS には HDR

に關与することが報告されている FANCD2 および RAD52 リコンビナーゼ [Unno *et al.* 2014, Kan *et al.* 2017] が主要な役割を果たすことが示唆されている [Bhowmick *et al.* 2016, Graber-Feesl *et al.* 2019]。MiDAS の一例として、軽度の複製ストレス後の M 期後期において、解離しつつある姉妹染色分体の間を ultrafine bridges (UFBs) と呼ばれる構造体が糸を張ったように形成されてしまう現象が挙げられる。この姉妹染色分体の非分離を避けるには、M 期で DSB が修復される必要があり [Minocherhomji *et al.* 2015]、これは体細胞における有糸分裂 DSB 修復のさらなる証拠となるであろう。本研究は、初期から中期の有糸分裂期の細胞における HDR 経路を介した DSB 修復の存在を示す世界で最初の直接的な証拠を提供する一方で、M 期に存在する DSB の一部は残存し、G1 期に持ち越される可能性を残している。実際、MDC1-TOPBP1 複合体が M 期中の染色体安定性を維持するために、引き続く G1 期において修復が活性化されるまで DSBs を繋ぎ止めるという報告があり [Leimbacher *et al.* 2019]、DSB の一部が G1 期に持ち越されることは事実であろう。

M 期でも組換え修復 (HDR) が機能する機構に関するさらなる解析をクロマチン免疫沈降 (ChIP) 法を用いて調べた。特に細胞がコルセミドで継続的に処理された場合において、DSB の近くで HDR に關与する主要な組換え因子である RAD51 のリクルートが起きることが示唆された (図 25)。C-NHEJ 因子であるリン酸化 DNA-PKcs は、OH-TAM 除去の 2 時間後に DSB の近くに蓄積したが、細胞をコルセミドで継続的に処理した場合は蓄積しなかった (図 25)。これらの観察は、残存した一部の DSB が G1 期へと持ち越され修復されること、および M 期の DSB が HDR 経路を通して細胞分裂の前に修復できることをさらに強く示唆するものである。

M 期のクロマチンは高度に凝縮しており、これらの条件下で DSB を修復することは難しいかもしれない。しかしながら、減数分裂期中に数百のプログラムされた DSBs がゲノムの至る所



に形成され、HR によるこれらの DSBs の修復が相同染色体の対合およびクロスオーバー形成を促進し、適切な染色体分配のために必要不可欠であるという事実 [Kim *et al.* 2010、Keeney *et al.* 2014、Lam & Keeney 2014、Hunter 2015、Gray & Cohen 2016、Zickler & Kleckner 2016] を合わせれば、M 期細胞においても HR 修復が機能できることは十分に合理的な応答と考えられる。

今回使用した SCneo レポーターはどのような HDR によって DSB が修復されたのかということも検出可能であり、修復に短い領域を利用した STGC 型と長い領域を利用した LTGC 型または姉妹染色分体交換 (SCE) 型の 2 型に分けることができる。これまでに SCneo レポーター以外の修復解析レポーターを含めて HDR 修復産物の解析がいくつかのグループによって行われているが、いずれのグループも crossover を伴わない gene conversion (STGC 型) が主な産物であることを報告している [Lin *et al.* 1999、Johnson & Jasin 2000、Saleh-Gohali & Helleday 2004、Puget *et al.* 2005]。本研究でも細胞周期全体を通してほとんどの HDR 修復が STGC を通して行われていることが確認された一方で、S 期に入るにつれて多少ではあるが LTGC/SCE による HDR が増加することが示唆され (図 23)、S 期における組換え反応の亢進を示すものと考えられる。

本研究は M 期でも HR が機能する可能性を明確に示した世界で最初の研究である。M 期における DNA 損傷応答や損傷修復に関する研究は、間期に対する研究と比較してデータが少ない。本研究の結果を踏まえた解析をさらに深化させることで、M 期における DNA 損傷応答に関する知見が増えて、DSB 修復の全容が明らかになることを期待したい。

## 第 5 章

# 参考文献

- Asainthanbly, A. and Chen, D.J. (2009) Cellular responses to DNA double-strand breaks after low-dose gamma-irradiation. *Nucleic Acids Res.* **37**, 3912-3923.
- Benada, J., Burdová, K., Lidak, T., von Morgen, P., Macurek, L. (2015) Polo-like kinase 1 inhibits DNA damage response during mitosis. *Cell Cycle* **14**, 219-231.
- Bhowmick, R., Minocherhomji, S., Hickson, I.D. (2016) RAD52 facilitates mitotic DNA synthesis following replication stress. *Mol. Cell* **64**, 1117-1126.
- Biehs, R., Steinlage, M., Barton, O., Juhász, S., Künzel, J., Spies, J., Shibata, A., Jeggo, P.A., Löbrich, M. (2017) DNA Double-Strand Break Resection Occurs during Non-homologous End Joining in G1 but Is Distinct from Resection during Homologous Recombination. *Mol. Cell* **65**, 671-684.
- Ceccaldi, R., Rondinelli, B., D'Andrea, A.D. (2016) Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends cell Biol.* **26**, 52-64.
- Ciccia, A. and Elledge, S.J. (2010) The DNA Damage Response: Making it safe to play with knives. *Mol. Cell* **40**, 179-204.
- Chang, H.H.Y., Pannunzio, N.R., Adachi, N., Lieber, M.R. (2017) Non-homologous DNA end joining and alternative pathways to double-strand break repair. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **18**, 495-506.
- Chen, F., Nastasi, A., Shen, Z., Brenneman, M., Crissman, H., Chen, D.J. (1997) Cell cycle-dependent protein expression of mammalian homologs of yeast DNA double-strand break repair genes Rad51 and Rad52. *Mutat. Res.* **384**, 205-211.
- Cooper, S. (2003) Reappraisal of serum starvation, the restriction point, G0, and G1 phase arrest points. *FASEB J.* **17**, 333-340.
- Delacôte, F. and Lopez, B.S. (2008) Important of the cell cycle phase for the choice of the appropriate DSB repair pathway, for genome stability maintenance. *Cell Cycle* **7**, 33-38.
- Eigsti, J. and Dustin, P., Jr. (1955) Colchicine in agriculture, medicine, biology, and chemistry. *Iowa State College Press.*

Frankenberg-Schwager, M., Gebauer, A., Koppe, C., Wolf, H., Pralle, E., Frankenberg, D. (2009) Single-Strand Annealing, Conservative Homologous Recombination, Nonhomologous DNA End Joining, and the Cell Cycle-Dependent Repair of DNA Double-Strand Breaks Induced by Sparsely or Densely Ionizing Radiation. *Radiat. Res.* **171**, 265-273.

Fukushima, T., Takata, M., Morrison, C., Araki, A., Fujimori, A., Abe, M., Tatsumi, K., Jasin, M., Dhar, P.K., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Chiba, T., Takeda, S. (2001) Genetic analysis of DNA-dependent protein kinase reveals an inhibitory role of Ku in late S-G2 phase DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* **276**, 44413-44418.

Giunta, S., Belotserkovskaya, R., Jackson, S.P. (2010) DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis. *J. Cell Biol.* **190**, 197-207.

Gomez Godinez, V., Kabbara, S., Sherman, A., Wu, T., Cohen, S., Kong, X., Maravillas-Montero, J.L., Shi, Z., Preece, D., Yokomori, K., Berns, M.W. (2020) DNA damage induced during mitosis undergoes DNA repair synthesis. *PLoS One* **15**, e0227849.

Graber-Feesl, C.L., Pederson, K.D., Aney, K.J., Shima, N. (2019) Mitotic DNA Synthesis Is Differentially Regulated between Cancer and Noncancerous Cells. *Mol. Cancer Res.* **17**, 1687-1698.

Gray, S. and Cohen, P.E. (2016) Control of meiotic crossovers: from double-strand break formation to designation. *Annu. Rev. Genet.* **50**, 175–210.

Hinz, J.M., Yamada, A., Salazar, E.P., Tebbs, R.S., Thompson, L.H. (2005) Influence of double-strand-break repair pathways on radiosensitivity throughout the cell cycle in CHO cells. *DNA Repair* **4**, 782-792.

Hunter, N. (2015) Meiotic recombination: The essence of heredity. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016618.

Johnson, R.D., Liu, N., Jasin, M. (1999) Mammalian XRCC2 promotes the repair of DNA double-strand breaks by homologous recombination. *Nature* **401**, 397-399.

Johnson, R.D. and Jasin, M. (2000) Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *EMBO J.* **19**, 3398-3407.

Kan, Y., Batada, N.N., Hendrickson, E.A. (2017) Human somatic cells deficient for RAD52 are impaired for viral integration and compromised for most aspects of homology-directed repair. *DNA Repair* **55**, 64-75.

Karanam, K., Kafri, R., Loewer, A., Lahav, G. (2012) Quantitative live cell imaging reveals a gradual shift between DNA repair mechanisms and a maximal use of HR in mid S phase. *Mol. Cell* **47**, 320-329.

Keeney, S., Giroux, C.N., Kleckner, N. (1997) Meiosis-specific DNA double-strand breaks are catalyzed by Spo11, a member of a widely conserved protein family. *Cell* **88**, 375-384.

Keeney, S., Lange, J., Mohibullah, N. (2014) Self-organization of meiotic recombination initiation: General principles and molecular pathways. *Annu. Rev. Genet.* **48**, 187-214.

Kim, K.P., Weiner, B.M., Zhang, L., Jordan, A., Dekker, J., Kleckner, N. (2010) Sister cohesion and structural axis components mediate homolog bias of meiotic recombination. *Cell* **143**, 924-937.

Krajewska, M., Heijink, A.M., Bisselink, Y.J.W.M., Seinstra, R.I., Silljé, H.H.W., de Vries, E.G.E., van Vugt, M.A.T.M. (2012) Forced activation of Cdk1 via wee1 inhibition impairs homologous recombination. *Oncogene* **16**, 1-8.

Lam, I. and Keeney, S. (2014) Mechanism and regulation of meiotic recombination initiation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a016634.

Lee, D.H., Acharya, S.S., Kwon, M., Drane, P., Guan, Y., Adelmant, G., Kalev, P., Shah, J., Pellman, D., Marto, J.A., Chowdhury, D. (2014) Dephosphorylation enables the recruitment of 53BP1 to double-strand DNA breaks. *Mol. Cell* **54**, 512-525.

Leimbacher, P.A., Jones, S.E., Shorrocks, A.K., de Marco Zompit, M., Day, M., Blaauwendraad, J., Bundschuh, D., Bonham, S., Fischer, R., Fink, D., Kessler, B.M., Oliver, A.W., Pearl, L.H., Blackford, A.N., Stucki, M. (2019) MDC1 Interacts with TOPBP1 to Maintain Chromosomal Stability during Mitosis. *Mol. Cell* **74**, 571-583.

Lin, Y., Lukacsovich, T., Waldman, A.S. (1999) Multiple pathways for repair of DNA double-strand breaks in mammalian chromosomes. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 8353-8360.

- Mahaney, B.L., Meek, K., Lees-Miller, S.P. (2009) Repair of ionizing radiation-induced DNA double strand breaks by non-homologous end-joining. *Biochem. J.* **417**, 639-650.
- Mao, Z., Bozzella, M., Seluanov, A., Gorbunova, V. (2008) DNA repair by nonhomologous end joining and homologous recombination during cell cycle in human cells. *Cell Cycle* **7**, 2902-2906.
- Minocherhomji, S., Ying, S., Bjerregaard, V.A., Bursomanno, S., Aleliunaite, A., Wu, W., Mankouri, H.W., Shen, H., Liu, Y., Hickson, I.D. (2015) Replication stress activates DNA repair synthesis in mitosis. *Nature* **528**, 286–290.
- Mladenov, E., Magin, S., Soni, A., Iliakis, G. (2013) DNA double-strand break repair as determinant of cellular radiosensitivity to killing and target in radiation therapy. *Front. Oncol.* **3**.
- Orthwein, A., Fradet-Turcotte, A., Noordermeer, S.M., Canny, M.D., Brun, C.M., Strecker, J., Escribano-Diaz, C., Durocher, D. (2014) Mitosis inhibits DNA double-strand break repair to guard against telomere fusions. *Science* **344**, 189-193.
- Orthwein, A., Noordermeer, S.M., Wilson, M.D., Landry, S., Enchev, R.I., Sherker, A., Munro, M., Pinder, J., Salsman, J., Dellaire, G., Xia, B., Peter, M., Durocher, D. (2015) A mechanism for the suppression of homologous recombination in G1 cells. *Nature* **528**, 422-426.
- Ovejero, S., Bueno, A., Sacristán, M.P. (2020) Working on Genomic Stability: From the S-Phase to Mitosis. *Genes* **11**, doi:10.3390/genes11020225.
- Puget, N., Knowlton, M., Scully, R. (2005) Molecular analysis of sister chromatid recombination in mammalian cells. *DNA Repair* **4**, 149-161.
- Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., Löbrich, M. (2003) Pathway of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell Biol.* **23**, 5706-5715.
- Sabatons, S.A., Green, M.D., Forsburg, S.L. (2012) Continued DNA synthesis in replication checkpoint mutants leads to fork collapse. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 4986-4997.
- Sakamoto, S., Iijima, K., Mochizuki, D., Nakamura, K., Teshigawara, K., Kobayashi, J., Matsuura, S., Tauchi, H., Komatsu, K. (2007) Homologous recombination repair is regulated by domains at the N- and C-terminus of NBS1 and is dissociated with ATM functions. *Oncogene* **26**, 6002-6009.

- Saleh-Gohali, N. and Helleday, T. (2004) Conservative homologous recombination preferentially repairs DNA double-strand breaks in the S phase of the cell cycle in human cells. *Nucleic Acids Res.* **32**, 3683-3668.
- Sallmyr, A. and Tomkinson, A.E. (2018) Repair of DNA double-strand breaks by mammalian alternative end-joining pathways. *J. Biol. Chem.* **293**, 10536-10546.
- Sasaki, S. and Fukuda, N. (2005) Temporal Variation of Excess Mortality Rate from Solid Tumors in Mice Irradiated at Various Ages with Gamma Rays. *J. Radiat. Res.* **46**, 1-19.
- Saul, R.L. and Ames, B.N. (1986) Background levels of DNA damage in the population. *Basic Life Sciences* **189**, 529-535.
- Scully, R., Panday, A., Elango, R., Willis, N.A. (2019) DNA double-strand break repair-pathway choice in somatic mammalian cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 698-714.
- Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M., Jeggo, P.A. (2011) Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J.* **30**, 1079-92.
- Shibata, A., Moiani, D., Arvai, A.S., Perry, J., Harding, S.M., Genois, M.M., Maity, R., van Rossum-Fikkert, S., Kertokallio, A., Romoli, F., Ismail, A., Ismalaj, E., Petricci, E., Neale, M.J., Bristow, R.G., Masson, J.Y., Wyman, C., Jeggo, P.A., Tainer, J.A. (2014) DNA double-strand break repair pathway choice is directed by distinct MRE11 nuclease activities. *Mol. Cell* **53**, 7-18.
- Shrivastav, M., De Haro, L.P., Nickoloff, J.A. (2008) Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. *Cell Res.* **18**, 134-147.
- Sinclair, W.K. (1968) Cyclic X-ray responses in mammalian cells in vitro. *Radiat. Res.* **33**, 620-643.
- Sonneville, R., Bhowmick, R., Hoffmann, S., Mailand, N., Hickson, I.D., Labib, K. (2019) TRAIIP drives replisome disassembly and mitotic DNA repair synthesis at sites of incomplete DNA replication. *Elife* **8**, e48686.

Takata, M., Sabe, H., Hata, A., Inazu, T., Homma, Y., Nukada, T., Yamamura, H., Kurosaki, T. (1994) Tyrosine kinases Lyn and Syk regulate B cell receptor-coupled Ca<sup>2+</sup> mobilization through distinct pathways. *EMBO J.* **13**, 1341–1349.

Takata, M., Sasaki, M.S., Sonoda, E., Morrison, C., Hashimoto, M., Utsumi, H., Yamaguchi-Iwai, Y., Shinohara, A., Takeda, S. (1998) Homologous recombination and non-homologous end-joining pathways of DNA double-strand break repair have overlapping roles in the maintenance of chromosomal integrity in vertebrate cells. *EMBO J.* **17**, 5497-5508.

Tauchi, H., Kobayashi, J., Morishima, K., van Gent, C.D., Shiraishi, T., Verkaik, S.N., vanHeems, D., Ito, E., Nakamura, A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., Matsuura, S., Komatsu, K. (2002) Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature* **420**, 93-98.

Terasawa, M., Shinohara, A., Shinohara, M. (2014) Canonical Non-Homologous End Joining in Mitosis Induces Genome Instability and Is Suppressed by M-phase-Specific Phosphorylation of XRCC4. *PLoS Genet.* **10**, e1004563.

Terasima, T. and Tolmach, L.J. (1963a) X-ray sensitivity and DNA synthesis in synchronous populations of HeLa cells. *Science* **140**, 490-492.

Terasima, T. and Tolmach, L. (1963b) Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. *Exp. Cell Res.* **30**, 344–362.

Thompson, R., Gatenby, R., Sidi, S. (2019) How Cells Handle DNA Breaks during Mitosis: Detection, Signaling, Repair, and Fate Choice. *Cells* **8**, 1049; doi:10.3390/cells8091049.

Unno, J., Itaya, A., Taoka, M., Sato, K., Tomida, J., Sakai, W., Sugasawa, K., Ishiai, M., Ikura, T., Isobe, T., Kurumizaka, H., Takata, M. (2014) FANCD2 binds CtIP and regulates DNA-end resection during DNA inter-strand crosslink repair. *Cell Rep.* **7**, 1039-47.

Vaughn, J.P., Cirisano, F.D., Huper, G., Berchuck, A., Futreal, P.A., Marks, J.R., Iglehart, J.D. (1996) Cell cycle control of BRCA2. *Cancer Res.* **56**, 4590-4594.

Verdaasdonk, J.S. and Bloom, K. (2011) Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **12**, 320-332.



Wei, Z., Guang, P., Ahiaw-Yih, L., Pumin, Z. (2011) DNA damage response is suppressed by the high Cyclin dependent kinase 1 activity in mitotic mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 35899-35905.

Yamamoto, A., Taki, T., Yagi, H., Habu, T., Yoshida, K., Yoshimura, Y., Yamamoto, K., Matsushiro, A., Nishimune, Y., Morita, T. (1996) Cell cycle-dependent expression of the mouse Rad51 gene in proliferating cells. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 1-12.

Yu, B., Dalton, W.B., Yang V.W. (2012) CDK1 regulates Mediator of DNA Damage Checkpoint 1 during mitotic DNA damage. *Cancer Res.* **72**, 1-6.

Zhang, Y., Riesterer, C., Ayrall, A.M., Stablitzky, F., Littlewood, T.D., Reth, M. (1996) Inducible site-directed recombination in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* **24**, 543-548.

Zhang, W., Peng, G., Lin, S.Y., Zhang, P. (2011) DNA damage response is suppressed by the high Cyclin dependent kinase 1 activity in mitotic mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **286**, 35899-35905.

Zickler, D. and Kleckner, N. (2016) A few of our favorite things: pairing, the bouquet, crossover interference and evolution of meiosis. *Semin. Cell Dev. Biol.* **54**, 135–148.

## 謝辞

本博士論文は、筆者が茨城大学大学院理工学研究科環境機能科学専攻博士後期課程在学時の研究成果をまとめたものである。同研究科教授の田内広博士には指導教官として、本博士研究を実施する機会を与えて頂き、その遂行にあたって学部時代から長きにわたり温かいご指導ご鞭撻を賜りました、深く感謝申し上げます。

さらに、同研究科教授の立花章博士ならびに同研究科教授の中村麻子教授には、日頃の研究を進めるにあたって大変多くのご助言ご協力を頂きました、厚く感謝申し上げます。

また、実験のご指導および議論を通じまして、多くの助言や知識を与えて下さいました穀田哲也さんをはじめとする研究室の皆様にご心より感謝致します。

最後に、博士後期課程への進学を支援してくれました両親に対して、この場を借りて感謝申し上げます。

改めまして、本博士研究の遂行および論文の執筆に関して、多大なるご指導ご協力を賜りました皆様に対しまして、重ねて深謝の意を表して謝辞とさせていただきます。