

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K12244

研究課題名（和文）核内ミオシンによるDNA二本鎖切断修復制御機構の解明

研究課題名（英文）Investigation for the regulatory mechanism of DNA double-strand break repair by nuclear myosin

研究代表者

西 良太郎（Nishi, Ryotaro）

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：80446525

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：DNA二本鎖切断（DNA double-strand break: DSB）は最も細胞毒性の高いDNA損傷の一つである。DSBは主に、相同組換え修復あるいは非相同末端再結合により修復されるが、これらの最上流ではMRN（MRE11-RAD50-NBS1）複合体がDSB応答全体を制御する。従って、MRN複合体制御の解明は、DSB修復の全容の理解に必須である。本研究では、MRN複合体と相互作用する新規因子として同定した核内ミオシンはMRN複合体のMRE11と相互作用することを明らかにした。さらに、核内ミオシンノックアウト細胞を用いて、核内ミオシンは相同組換え修復に促進的に機能することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでにDSB修復の基本的な分子機構が解明されてきた。近年ではDSB修復はDSBが生じたゲノム上の転写活性や、隣接する核内構造体等によって複雑な制御を受けることが明らかにされつつあり、ヒト細胞核内ではDSB修復は画一的な反応ではなく、複数のサブパスウェイから構成されることが示唆されている。本研究では、正確性の高いDSB修復機構である相同組換え修復に促進的に機能する因子を新たに同定し、その細胞生存における重要性を明らかにした。このことは、ゲノム安定性維持という生命の根幹をなす現象に新たな視点を加えるだけでなく、遺伝子領域におけるゲノム編集の正確な効率化に利用することも可能であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：DNA double-strand break (DSB) that is caused by ionizing radiation etc. is one of the most deleterious types of DNA damage. In human cells, DSBs are mainly repaired by either homologous recombination or non-homologous end joining. Since MRN (MRE11-NBS1-RAD50) complex regulates pathway choice, initiation of homologous recombination, and DSB responses, revealing regulatory mechanism of MRN complex is mandatory to understand DSB repair. This research aimed to unveil regulatory mechanism of MRN complex by characterizing newly identified MRN complex interactor, nuclear myosin. We found that nuclear myosin interacted with MRN complex in nuclei and mainly interacted with MRE11. In addition, we also found that nuclear myosin facilitated homologous recombination.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 相同組換え修復 核内ミオシン DNA二本鎖切断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報をコードするゲノム DNA が安定に保持されることは、正常な生命活動に必須である。しかしながら、ゲノム DNA は常に損傷 (DNA 損傷) を受ける危険に曝露されており、生じた DNA 損傷は転写、DNA 複製や染色体分配の障害となりゲノム不安定性の原因となる。電離放射線やある種の抗がん剤等によって生じる DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand break: DSB) は極めて細胞毒性の高い DNA 損傷の一つである。ヒト細胞において DSB は主に特徴の異なる二つの機構、1) 相同組換え修復 (homologous recombination: HR)、2) 非相同末端再結合 (non-homologous end-joining: NHEJ) により修復される。HR は姉妹染色分体を修復の鋳型とする忠実性の高い修復機構であるが、NHEJ は DSB 末端を直接的に再結合する修復エラーを生じやすい機構である。

これまでに HR および NHEJ の基本的な分子機構が解明されてきたが、近年ではこれらの DSB 修復機構は DSB が生じたゲノム上の転写活性や、隣接する核内構造体等によって複雑な制御を受けることが明らかにされつつある。このことから、ヒト細胞核内では DSB 修復は画一的な反応ではなく、DSB が生じた環境により制御される多様性に富む反応、すなわち複数のサブパスウェイ、から構成されることが示唆されており、これらのサブパスウェイとそれを規定する環境要因の解明が待たれていた。重要なことに、転写が活発な領域、即ち遺伝子領域において生じた DSB の修復には正確性の高い HR が NHEJ よりも優先的に選択されることが知られており、この HR が古典的な分子機構に依存するものなのか、あるいは新規の機構によるものかは不明であった。

一方、これまでに我々は核内構造体を介した空間的な DSB 修復制御の重要性について研究を行ってきた。なかでも、転写が活発な遺伝子領域に隣接する核内構造体である nuclear speckle に局在する脱ユビキチン化酵素および DNA-RNA ヘリカーゼが HR を促進する機構について明らかにしてきた。この研究により nuclear speckle 近傍に生じた DSB の HR による修復には、DSB 依存的に形成された R-loop の適切な解消が重要であることが示唆されたが、HR の開始に必須の因子である MRN (MRE11-RAD50-NBS1) 複合体との関連性は不明であった。これらの研究から、DSB 修復の最上流で機能する因子である MRN 複合体の空間的な制御および翻訳後修飾の理解が重要であると考え、我々が独自に同定した核内ミオシンに注目した本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

MRN 複合体は DSB 部位に最も速くリクルートされる因子の一つであり、DSB 修復機構の選択、HR の開始、NHEJ の制御および細胞周期チェックポイントの活性化に重要な役割を果たす複合体である。DSB 修復の最上流で機能する MRN 複合体はそのサブパスウェイを決定・制御する上でも重要な因子であると考えられる。そこで、多様な DSB 修復開始機構を明らかにする目的で、MRN 複合体と相互作用する新規因子の同定を行なった。そのために、MRE11 をベイトとした共免疫沈降および質量分析を行い、核内に存在する非筋ミオシン IIA [non-muscle myosin IIA (NMIIA)] を同定した。本研究では、核内に存在する NMIIA の DSB 修復における機能を解明することで、DSB 修復の新たなサブパスウェイを解明することを目的とした。

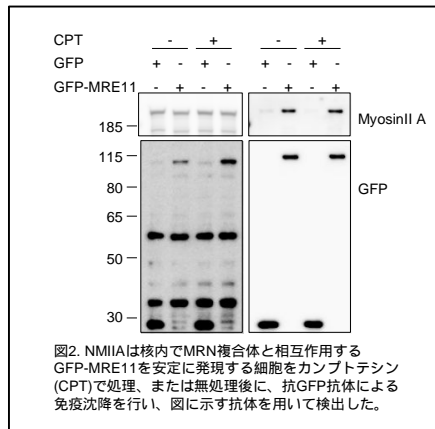
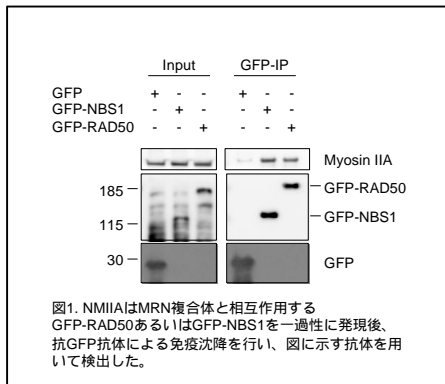
3. 研究の方法

まず、核内ミオシンが MRN 複合体と相互作用するのか、あるいは MRE11 のみと相互作用するのかをエピトープタグを融合した NBS1、あるいは RAD50 を一過性に発現し、共免疫沈降により検証する。ついで、核内においてこれらのタンパク質が相互作用することを共免疫沈降により検証する。さらに、核内ミオシンが MRN 複合体のうち、どのサブユニットと結合するかをそれぞれの因子をノックダウンした条件下で共免疫沈降を行うことにより明らかにする。また、CRISPR/Cas9 システムを利用して、核内ミオシンノックアウト細胞を樹立し、この細胞のトポイソメラーゼ I 阻害薬であるカンプトテシン (片側のみの DSB を誘発し、相同組換え修復反応を検討する場合に使用する) 処理後におけるシグナル伝達をイムノプロットングにより検討することで、いずれの DSB 修復機構に核内ミオシンが寄与するかを明らかにする。これらに加えて、核内ミオシンが関与する DSB 修復を可視化するために、核局在化シグナルを融合した GFP 融合 NMIIA をヒト細胞に発現させ、405 nm レーザー照射によって生じる DSB 部位における動態の検討を試みた。

4. 研究成果

(1) NMIIA は MRN 複合体と相互作用する。

エピトープタグを融合した NBS1、あるいは RAD50 を一過性に発現し、共免疫沈降により内在性の NMIIA との相互作用を検討した (図 1)。いずれの場合においても、内在性 NMIIA との相互作用が認められ、NMIIA は MRN 複合体と相互作用することが示唆された。

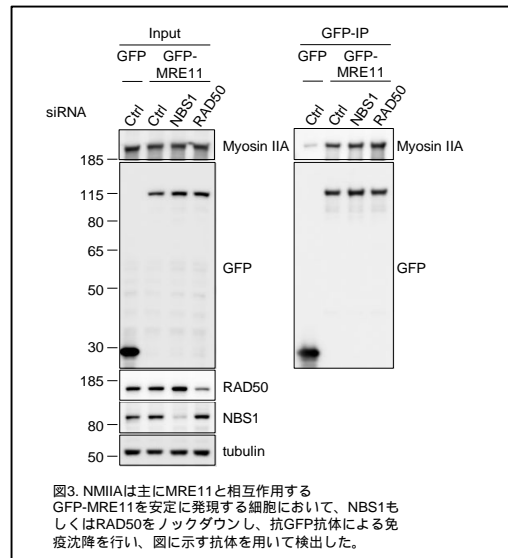


(2) NMIIA は核内において MRN 複合体と相互作用する。

ミオシンは主に細胞質に局在するタンパク質である一方、MRN 複合体は核内に主に局在するタンパク質である。さらに、これまでに核内ミオシンに関する報告はあるもののその存在量は微量であり、本研究で検出した NMIIA が核内のものであり細胞質画分の混入である可能性を検討した(図2)。核抽出液を用いた共免疫沈降においても NMIIA と MRE11 の相互作用が認められ、両者は核内で複合体を形成していることが示唆された。一方、トポイソメラーゼ I 阻害剤であるカンプトテシン処理後においてもその相互作用に明確な変化は認められず、安定な複合体であることが示唆された。

(3) NMIIA は主に MRE11 と相互作用する。

NMIIA と MRN 複合体の相互作用の詳細を明らかにする目的で、NBS1 あるいは RAD50 を特異的な siRNA によりノックダウンした条件下で、GFP タグを融合した MRE11 を用いた共免疫沈降を行い NMIIA との相互作用を検討した(図3)。NBS1 及び RAD50 をノックダウンした場合においても、MRE11 と NMIIA の相互作用に変化は認められず、MRN 複合体において NMIIA は主に MRE11 と相互作用することが明らかになった。



(4) NMIIA は HR に促進的に機能する。

NMIIA の DSB 修復における機能を検討する目的で、まず、NMIIA ノックアウト細胞を樹立した。NMIIA ノックアウト細胞、及び親株である U2OS 細胞をカンプトテシン処理し、免疫プロットティングにより HR に関わるシグナル伝達を検討した。RPA2 の 4 番目及び 8 番目のセリン残基のリン酸化 (pRPA2 S4/S8) は、HR の初期過程である DNA-end resection (一本鎖 DNA の形成) の進行に伴って増加し、最終的に DNA-end resection に対してフィードバック阻害効果を示すことが知られている。NMIIA ノックアウト細胞では、親株と比較して pRPA2 S4/S8 の顕著な減弱が認められた。このことは、核内ミオシンが HR のうち、DNA-end resection に促進的に機能することを示唆している。

(5) NMIIA の DSB 部位における動態解析

NMIIA が関与する DSB 修復を可視化するために、核局在化シグナルを融合した GFP 融合 NMIIA をヒト細胞に発現させ、405 nm レーザー照射によって生じる DSB 部位における動態の検討を試みた。免疫プロットティングでは、この融合タンパク質の発現が確認されたが生細胞を用いたイメージングではほとんどが細胞質に局在しており、核局在化シグナル配列が想定通りに機能していない可能性が示された。また、この条件下で核内に DSB を 405 nm のレーザー照射により発生させたが、NMIIA の集積などは検出されなかった。これまでに他の研究グループからも NMIIA の核内での存在をイメージングでの検出に成功した例は報告されておらず、極めて微量の NMIIA が核内に存在することが示唆された。

本研究により、NMIIA が HR に促進的に機能すること及び MRN 複合体のうち、MRE11 と相互作用することが示され、新たな HR の制御機構の存在が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Misaki Matsui, Shoki Kajita, Yuina Tsuchiya, Wakana Torii, Shiori Tamekuni and Ryotaro Nishi	4. 巻 833
2. 論文標題 USP49 is a novel deubiquitylating enzyme for gH2AX in DNA double-strand break repair	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 gene	6. 最初と最後の頁 146599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2022.146599	査読の有無 有
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 Mizuho Okamoto, Masanori, Shimogishi, Akari Nakamura, Yusuke Suga, Kyosuke Sugawara, Michio Sato, Ryotaro Nishi, Akio Fujisawa, Yorihiro Yamamoto, Misato Kashiba	4. 巻 710
2. 論文標題 Differentiation of THP-1 monocytes to macrophages increased mitochondrial DNA copy number but did not increase expression of mitochondrial respiratory proteins or mitochondrial transcription factor A	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 108988
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.abb.2021.108988	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計34件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ryotaro Nishi
2. 発表標題 Integrative understanding of homologous recombination repair orchestrated by USP42-DHX9 axis
3. 学会等名 ATWorkshop 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松谷 咲采, 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9のリン酸化がDNA二本鎖切断応答に果たす役割の解明
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DExH Box Helicase DHX9の動態を制御するドメインの相同組換え修復における機能の解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 DNA-RNA helicase DHX9のコピキチン化が相同組換え修復に果たす役割の検討
2. 発表標題 瀧本 滉明, 土屋 唯菜, 松谷 咲采, 池亀 颯稀, 西 良太郎
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松谷 咲采, 土屋 唯菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA二本鎖切断に伴って生じるDNA-RNA helicase DHX9のリン酸化の意義の解明
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 松谷 咲采, 池亀 颯稀, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DExH Box Helicase, DHX9による相同組換え修復の促進に重要なドメインの解析
3. 学会等名 第95回日本生化学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 松谷 咲采, 池亀 颯稀, 西 良太郎
2. 発表標題 DHX9による相同組換え修復の促進に必要なドメインの同定と解析
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 松谷 咲采, 土屋 唯菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復におけるDNA-RNA helicase DHX9のリン酸化の意義の解明
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 瀧本 滉明, 土屋 唯菜, 松谷 咲采, 西 良太郎
2. 発表標題 DHX9と相互作用するE3リガーゼのDSB修復における機能
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 土屋 唯菜, 松谷 咲采, 西 良太郎
2. 発表標題 相同組換え修復においてDExH Box RNA Helicase, DHX9の各ドメインが果たす役割の解明
3. 学会等名 2022年度日本生化学会関東支部例会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 西 良太郎、土屋 唯菜、松谷 咲采、瀧本 滉明、堀尾 彩衣
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9によるDNA二本鎖切断修復制御
3. 学会等名 第64回日本放射線影響学会 第36回京都大学放生研シンポジウム「ユビキチンが彩る放射線応答」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋 唯菜、松谷 咲采、西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9の動態解析
3. 学会等名 第65回日本薬学会関東支部例会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西 良太郎、松谷 咲采、土屋 唯菜、瀧本 滉明、堀尾 彩衣
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復におけるDNA-RNAヘリカーゼの役割
3. 学会等名 第92回日本遺伝学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松谷 咲采、土屋 唯菜、勝木 陽子、高田 穰、西 良太郎
2. 発表標題 相同組換え修復におけるDNA-RNA helicase DHX9のリン酸化の意義の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 瀧本 滉明, 土屋 唯菜, 松谷 咲采, 勝木 陽子, 高田 穰, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9のコピキチン化が相同組換え修復に果たす役割の検討
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 松谷咲采, 勝木 陽子, 高田 穰, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9による相同組換え修復制御機構の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 松谷咲采, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA二本鎖切断修復におけるDHX9タンパク質のドメイン解析
3. 学会等名 第64回日本放射線影響学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 西 良太郎
2. 発表標題 DHX9の翻訳後修飾を介したDNA二本鎖切断修復制御
3. 学会等名 第41回染色体ワークショップ・第22回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松谷 咲采, 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9のリン酸化はDNA二本鎖切断応答を制御する
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉山 友菜、野間 菜実子、小野田 優、岩本 大輝、近松 歩美、松尾 祐希、渡邊 花凜、西 良太郎、萬年 太郎、早野 俊哉
2. 発表標題 DNA損傷応答におけるBarrier-to-autointegration factor (BAF)の役割
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 阿部 友理菜, 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 松谷 咲采, 西 良太郎
2. 発表標題 タンパク質アルギニンメチル化によるDNA二本鎖切断修復制御の解明
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9の動態制御と翻訳後修飾は相同組換え修復促進に重要である
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 池亀颯稀, 西良太郎
2. 発表標題 核スペックルによるDNA二本鎖切断修復の制御
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DHX9のRGGドメインはDNA二本鎖切断修復に重要な役割を果たす
3. 学会等名 日本環境変異原ゲノム学会第52回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 松谷 咲采, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 相同組換え修復におけるDHX9のRGGモチーフメチル化が53BP1のリクルートに果たす役割
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松谷 咲采, 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9のリン酸化はDNA二本鎖切断応答を制御する
3. 学会等名 日本放射線影響学会第66回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田麻衣子、堀尾彩衣、チャアゾンヘン、鈴木啓司、西良太郎、矢野和義
2. 発表標題 DSB修復とプロテアソームによるタンパク質分解の共役機構の解析
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 松谷 咲采, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DHX9による相同組換え修復促進機構の解明
3. 学会等名 第67回日本薬学会関東支部大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松谷 咲采, 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 阿部 友理菜, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9のリン酸化はDNA二本鎖切断応答を制御する
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋 唯菜, 池亀 颯稀, 阿部 友理菜, 松谷 咲采, 西 良太郎
2. 発表標題 DNA-RNA helicase DHX9の細胞内動態制御と翻訳後修飾を介した相同組換え修復促進機構の解明
3. 学会等名 日本遺伝学会第95回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西 良太郎
2. 発表標題 コエンザイムQ10とゲノム安定性維持機構の新たな関係
3. 学会等名 第20回日本コエンザイムQ協会研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 土屋唯菜、西良太郎
2. 発表標題 DHX9のドメインを介した相同組換え修復促進機構の解明
3. 学会等名 八王子染色体ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松谷咲采、西良太郎
2. 発表標題 DNA二本鎖切断によって生じるDHX9のリン酸化の役割
3. 学会等名 八王子染色体ワークショップ
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 西 良太郎
2. 発表標題 RNAとDNA修復のクロストーク：What am I doing?
3. 学会等名 八王子染色体ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京工科大学 応用生物学部 分子生物学研究室
<https://nishi-lab.bs.teu.ac.jp>
東京工科大学 応用生物学部 西研究室
<https://nishi-lab.bs.teu.ac.jp>

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
研究 分 担 者	逆井 良 (Sakasai Ryo) (10549950)	金沢医科大学・医学部・准教授 (33303)	

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
---------	---------