

Press Release

研究成果

報道解禁

あり

本研究成果は論文掲載先である Cell Reports から、以下の通り報道解禁設定があります。

TV・ラジオ・WEB ……7月14日（水）午前0時（日本時間）
新聞 ……7月14日（水）朝刊（日本時間）

2021年7月9日

分野： 生命科学・医学系

キーワード：DNA 損傷修復、放射線、RIF1、脱リン酸化酵素 PP1、抗がん剤

切断された DNA をつなぎ直す、細胞の初動対応を解明

—抗がん剤耐性細胞の生成の仕組みや免疫疾患の原因の解明に期待—

【研究成果のポイント】

- ◆ 放射線などで切れてしまった DNA を修復するための初動対応の仕組みを発見
- ◆ RIF1 による DNA 二本鎖切断^{※1}の修復経路の制御に、脱リン酸化酵素 PP1 が関与
- ◆ 遺伝性の乳がん、卵巣がん、免疫疾患の原因解明や治療法の発展への貢献に期待

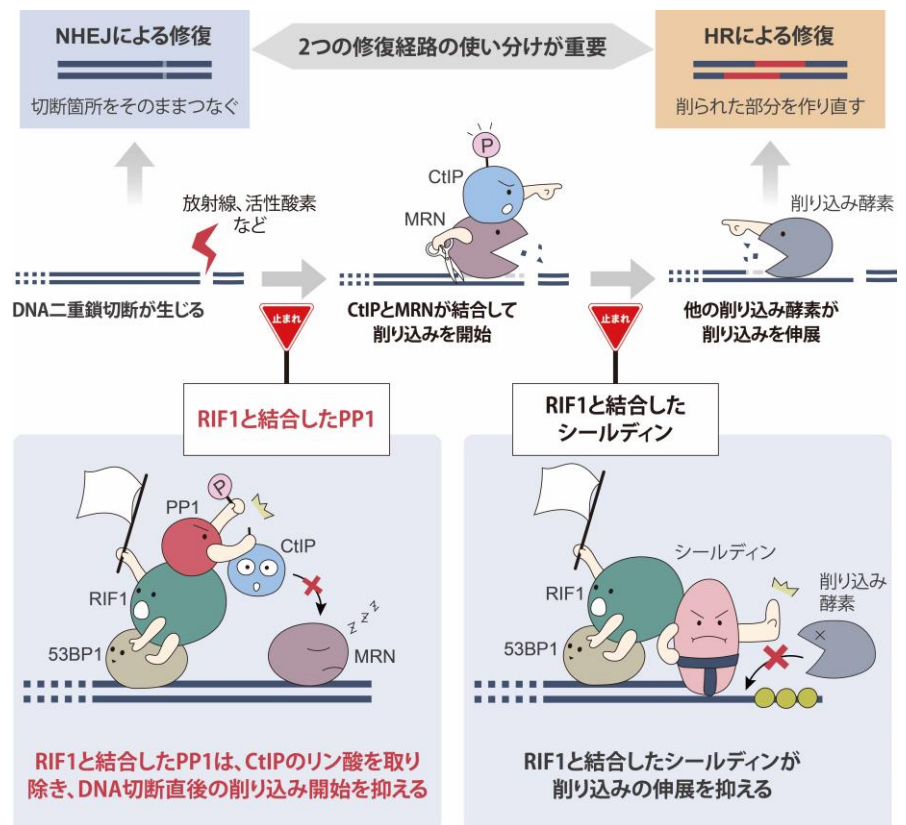
❖ 概要

大阪大学大学院理学研究科の磯部真也特任助教（常勤）、小布施力史教授らの研究グループは、損傷を受けた DNA を直ちに修復するための初動対応の仕組みを発見しました。

細胞が持つ生物の設計図である DNA は、紫外線、放射線や化学物質、ウイルスなどによって絶えず損傷を受けており、その頻度は、1 細胞あたり、1 日に 1 万から 100 万箇所ともいわれています。中でも、DNA が完全に切れてしまう二本鎖切断（double-strand break; DSB）は、特に重篤な DNA 損傷のひとつです。一方で、細胞は二本鎖切断を修復するしくみを備えており、非相同末端結合修復^{※2}（non-homologous end-joining; NHEJ）と相同組換え修復^{※3}（homologous recombination; HR）の 2 つの経路が知られています。NHEJ では、DNA の切断面をそのままつなぎ直すのに対し（図上・左）、HR では切断箇所をわざと「削り込み」することによって一本鎖 DNA を露出させ、それに似た配列を持つ別の DNA を鋳型にして修復を行います（図上・右）。

NHEJ による修復と HR による修復は、直す二本鎖切断の状況や場所によって得意、不得意があり、実際の生物の細胞では 2 つの経路が巧みに使い分けられています。このどちらで修復するかは、DNA の「削り込み」を行うか（HR）、行わないか（NHEJ）によって決まります。二本鎖切断が起きた時に修復経路が適切に選択されないと、DNA 配列の欠落、染色体の転座や重複などが生じて変異が蓄積し、細胞の老化やがん化のリスクが高まるとともに、様々な疾病を引き起こしてしまいます。

2018 年に、RIF1 というタンパク質（図：緑色の丸顔）がシールドイン（Shieldin）タンパク質（図：お相撲さん）と結合して、削り込みの途中の一本鎖 DNA に集まると削り込みの「伸展」が止まり、削られた DNA が埋め戻されて NHEJ が選択されることが報告され、話題となりました。今回、私たちは、RIF1 と結合して NHEJ を引き起こす、シールドイン以外のタンパク



Press Release

質、PP1 (protein phosphatase 1) を発見しました。細胞の中で DNA の二本鎖切断が起こると、DNA の切断面に RIF1 が集まってきます。私たちはこの RIF1 に PP1 (図: 赤い丸顔) が結合すると、削り込みが「開始」しなくなる現象と、そのメカニズムを明らかにしました。

今回の発見から、細胞の中で DNA の二本鎖切断が起こると、DNA の切断面に集まった RIF1 は、PP1 を介して二本鎖切断の直後に DNA 末端の削り込みの「開始」を防ぐことと、削り込みの途中でシールドインを介して削り込みの「伸展」を防ぐ、という 2 つの異なる方法により、HR に向かわせる DNA 末端の削り込みを段階的に制御し、結果として NHEJ が選択されるといふ、二本鎖切断直後の初動対応の様子が見えてきました。

RIF1 が関わる DNA 修復の制御メカニズムは、ある種のがんや免疫機能に重要な役割を果たしていると考えられており、今回の研究成果はこれらの疾患の原因解明や治療に貢献できる可能性があります。

本研究成果は、英国の University of Aberdeen との国際共同研究であり、2021 年 7 月 14 日 (水) 午前 0 時 (日本時間) に国際雑誌「Cell Reports」のオンライン版で公開されます。

❖ 研究の背景

放射線などで生じた DSB を修復する仕組みとして、細胞は NHEJ と HR の 2 つの経路を備えています。

これらの NHEJ による修復と HR による修復は、直す二本鎖切断の状況や場所によって、得意、不得意があります。例えば、DNA 複製の阻害で引き起こされる二本鎖切断は、NHEJ では正常に修復できないので HR で修復する必要があります。一方、HR による修復は鋳型にする相同染色体が必要なため、細胞分裂に先立って DNA 複製が行われた後にしか機能しません。また、ヒトの DNA には反復配列などの良く似た塩基配列が数多く存在しており、それらの間で HR が起こってしまうと、染色体転座や欠損という変異を引き起こすこともあります。そのため、実際の生物の細胞では 2 つの修復経路が巧みに使い分けられています。

二本鎖切断を 2 つの経路のどちらで修復するかは、DNA の「削り込み」を行うか (HR)、行わないか (NHEJ) によって決まります。放射線などにより二本鎖切断が生じると、切断面には、MRE11、RAD50、NBS1 という 3 つのタンパク質から成り立つ、MRN と呼ばれる削り込みを行う酵素が集まってきます (図: 紫色の丸顔)。そして、CtIP というタンパク質 (図: 青色の丸顔) が、リン酸化 (リン酸の印が付加) することによって、MRN に結合します。すると、MRN の酵素は活性化されて、HR による修復のために必要な一本鎖 DNA を露出するための削り込みを開始します (図上・中)。

この仕組みに競合するようにはたらくのが、RIF1 タンパク質です (図: 緑の丸顔)。切断面に RIF1 タンパク質が結合すると、削り込みが行われず NHEJ による修復が選択されます。

最近の報告から、切断面に存在する RIF1 にシールドイン (Shieldin) というタンパク質 (図: お相撲さん) が結合すると、削り込み途中の一本鎖 DNA に集まることで、削り込みの「伸展」が止まり、削り込み部分を埋め戻すことで、HR による修復を抑制して NHEJ による修復が選択されることが明らかになりました。

一方、削り込みが開始する前にも NHEJ による修復が起こることも知られています。シールドインは削り込み開始後の一本鎖 DNA に結合してはたらくので、私たちは、RIF1 にはシールドインの他にも結合するタンパク質があって、MRN による削り込みの開始を抑制しているのではないかと考えました。

❖ 本研究の内容

そこで本研究では、シールドイン以外の RIF1 に結合するタンパク質を質量分析により探索することにしました。その結果、PP1 という脱リン酸化酵素 (図: 赤い丸顔) が RIF1 に結合するタンパク質として見出されました。この PP1 に着目して解析したところ、二本鎖切断が生じた直後の RIF1 のはたらきに PP1 が関与していることがわかりました。

リン酸は、様々なタンパク質に付加されたり (リン酸化)、外されたり (脱リン酸化) することで、そのタンパク質の活性や性質を変える修飾分子として知られています。PP1 は、このリン酸をタンパク質から取り除く脱リン酸化酵素で、体内の様々な反応に関わっています。

Press Release

実験により、PP1 が RIF1 に結合して働くと、CtIP（図：青い丸顔）に付加されているリン酸（図：P と書かれたピンクの玉）がはずされ、MRN に結合して削り込みの反応を活性化するという本来の働きができなくなります（図下・左）。すなわち、RIF1 に結合した PP1 は MRN による DNA の削り込みの開始を抑制していることがわかりました。

今回の私たちの発見から、細胞の中で DNA の二本鎖切断が起こると、DNA の切断面に集まった RIF1 は、PP1 を介して二本鎖切断直後に DNA 末端の削り込みの「開始」を防ぐことと、削り込みの途中で、シールドインを介して削り込みの「伸展」を防ぐ、という 2 つの異なる方法により HR に向かわせる DNA 末端の削り込みを段階的に制御しているという、二本鎖切断直後の初動対応の様子が見えてきました。

❖ 本研究成果が社会に与える影響（本研究成果の意義）

DNA 損傷修復に関わる遺伝子の変異はさまざまな疾患の原因となることが知られています。例えば、RIF1 は、乳がん、卵巣がんの原因遺伝子である BRCA1 と深い関わりがあります。BRCA1 は HR による修復を促進する遺伝子で、この遺伝子に変異があると HR による修復機能が低下し、それに伴い、乳がんを発症する生涯リスクが 80% になるという報告もあります。オラパリブ (Olaparib)^{※4} という抗がん剤は、この HR による修復機能の低下を逆手に取り、がん細胞を殺す薬です。しかしながら、投薬を続けるとオラパリブの効かない細胞（抗がん剤耐性細胞）が現れてくることが知られており、問題になっています。RIF1 の機能に問題があると、NHEJ による修復への誘導が起こらないため、BRCA1 がいない状態でも異常な HR 経路が発動され、抗がん剤耐性細胞になることが実験的に証明されています。今回**私たちが発見した RIF1 と結合している PP1 の働きは、シールドインとともに RIF1 の DNA 損傷修復における機能そのものであるため、抗がん剤耐性細胞が出現する仕組みや、解決への糸口になる可能性があります。**

また、RIF1 の機能不全が免疫疾患を引き起こすことも知られています。免疫反応に重要な抗体タンパク質の産生には NHEJ のメカニズムが利用されており、NHEJ の効率が下がると体内の抗体の産生量が減少するためです。抗体産生には RIF1 に結合しているシールドインに関わる反応と、RIF1 が関与するにもかかわらずシールドインが関与しない反応があることが報告されています。ここでも RIF1 に結合している PP1 がはたらいている可能性は十分考えられます。

今回の我々の発見は基礎的な知見ですが、将来的にこれらの疾患の原因解明や治療に貢献することが期待できるのではないかと考えています。

❖ 特記事項

本研究成果は、2021 年 7 月 14 日（水）午前 0 時（日本時間）に国際科学誌「Cell Reports」（オンライン）に掲載されます。

タイトル：“Protein Phosphatase 1 acts as a RIF1 effector to suppress DSB resection prior to Shieldin action”

著者名：Shin-Ya Isobe, Shin-ichiro Hiraga, Koji Nagao, Hiroyuki Sasanuma, Anne D Donaldson, and Chikashi Obuse

なお、本研究は、英国の University of Aberdeen との国際共同研究であり、JSPS 科研費 JP19H03156, JP18H04713, JP18H05532, JP25116004, JP18H04900, JP19H04267, 三菱財団、Cancer Research UK awards C1445/A19059, DRCPGM/100013 の助成を受けたものです。

❖ 用語説明

※1 DNA 二本鎖切断

二本鎖の DNA が切断されて生じる損傷のことで、細胞にとって最も脅威な DNA 損傷の 1 つと考えられている。放射線による被曝や細胞がエネルギーを産生する時に生じる活性酸素などにより生じる。普通の生活でも DNA 損傷の数は細胞あたり一日数万から数十万個になると言われており、そのうち 100 箇所程度は DNA 二本鎖切断と考えられている。DNA 二本鎖切断が完全に修復されないと、細胞は正常に増殖することができず、がん化や細胞死を引き起こすことが知られ

Press Release

ている。

※2 非相同末端結合修復

DNA 二本鎖切断の修復経路の1つで、近くの DNA 末端同士を結合して修復する。放射線などにより生じる損傷に対して素早く反応することができるが、切断部位の DNA 情報が一部欠損してしまう場合が多い。

※3 相同組換え修復

DNA 二本鎖切断の修復経路の1つで、損傷がおきた部分と同一の正常な配列を探し出して、鋳型にして組換え機構により修復する。多くの場合、DNA 情報の欠損が発生しないが、鋳型となる同一の DNA 配列がない時は働けない。また、非常に似通った配列を間違えて鋳型としてしまい、DNA 情報の変異を引き起こしてしまう欠点がある。

※4 オラパリブ (Olaparib)

2014 年、アメリカ食品医薬品局 (FDA)により承認された抗がん剤で、日本においても 2018 年にリムパーザという名前で承認されている。BRCA1、BRCA2 に変異をもつ卵巣がん、乳がん、前立腺がん、膵臓がん等の治療に用いられている。BRCA1 や BRCA2 などの変異により相同組換え修復が正常に行われない細胞では、オラパリブにより生じた複雑な DNA 二本鎖切断を直すことができず、細胞死を誘導すると考えられている。

❖ 本件に関する問い合わせ先

<研究に関すること>

大阪大学 大学院理学研究科 特任助教 (常勤) 磯部 真也 (いそべ しんや)
TEL : 06-6850-5987 FAX : 06-6850-5987 E-mail : s.isobe@bio.sci.osaka-u.ac.jp

大阪大学 大学院理学研究科 教授 小布施 力史 (おぶせ ちかし)
TEL : 06-6850-5812 FAX : 06-6850-5987 E-mail : obuse@bio.sci.osaka-u.ac.jp

<広報・報道に関すること>

大阪大学 理学研究科 庶務係
TEL : 06-6850-5280 FAX : 06-6850-5288 E-mail : ri-syomu@office.osaka-u.ac.jp

❖ 参考 URL

小布施 力史教授 研究者総覧 URL <http://osku.jp/k0658>

【小布施教授のコメント】

普通の生活でも DNA 損傷の数は細胞あたり一日数万個になると言われています。DNA の二本鎖が切れてしまった損傷は放置すると遺伝情報の異常を誘発し、“がん”など疾患を引き起こします。細胞は、たくさんの種類のタンパク質を動員して、DNA 損傷の状況を検知し、適切な方法を選んで修復しています。その中で、私たちは DNA の二本鎖切断が起こった直後に適切な修復方法を選択するために働く新たなタンパク質を発見し、それが働く仕組みを明らかにしました。この基礎研究がきっかけとなって、将来的には、がんや免疫疾患の原因が解明されることが期待されます。