

令和 2 年 3 月 20 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 613

氏 名

佐藤 浩一

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：Utrecht（国名：オランダ王国）
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。
染色体脆弱部のゲノム維持機構に関する研究
3. 派遣期間：平成 30 年 2 月 28 日 ～ 令和 2 年 2 月 27 日
4. 受入機関名及び部局名
Hubrecht Institute, Knipscheer Group
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入也可)**
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

がんは我が国が克服すべき疾病の 1 つであり、日本人の死因のおよそ 3 割を占める。がんに対する効果的な治療法の開発、更にはその予防を実現し、この疾病を克服するためには、細胞がん化やがん抑制機構の分子基盤の理解が必須である。留学先の Knipscheer 研究室では、細胞のがん化・悪性化の抑制に重要な「染色体脆弱部位の複製・維持機構の解明」を目的とし、研究を実施した。

細胞のがん化・悪性化の要因となるのが染色体断裂、転座といった染色体異常である。興味深いことに、がん細胞で染色体異常が観察される遺伝子座の多くは、DNA 複製が停止しやすい「染色体脆弱部位」と一致する。ヒトゲノムでは、これまで数十の染色体脆弱部位が同定されており、こうした染色体脆弱部位の一部はグアニン塩基に富む配列で構成されることが知られてる。がんを好発する家系にみられる rare fragile site と呼ばれる脆弱部位や、脆弱 X 症候群、Jacobsen 症候群といった遺伝子疾患の原因となる *FRAXA*、*FRAXE*、そして *FRA11B* といった脆弱部位はその代表例である。

こうしたグアニンに富む DNA 配列は、DNA 複製の際に「グアニン 4 重鎖(以下、G4)」と呼ばれる構造を形成することが示唆されている。G4 は、2 重鎖 DNA が開裂して生じる単鎖 DNA 領域において、4 つのグアニン塩基が Hoogsteen 水素結合により平面状に結合した「グアニン 4 量体」が相互に重なり合った構造をとる。G4 抗体と次世代シーケンシング技術を用いて、ヒトゲノムでは近年 70 万を超える G4 形成領域が同定され、とりわけ染色体脆弱部位の中でも、この G4 形成領域ががん細胞における染色体異常のホットスポットとなっていることが明らかになってきた。G4 は、最も小さいものでも B 型の 2 重鎖 DNA より直径が大きく、DNA ポリメラーゼの伸長反応を阻害することが派遣先研究室内の先行研究により明らかにされている(Castillo Bosch *et al.*, *EMBO J.*, 2014)。真核生物の DNA 複製では、DNA ポリメラーゼεがリーディング鎖の DNA 合成を担当し、これが CDC45 および GINS 複合体と共に DNA ヘリカーゼである MCM2-7 複合体と結合する(CDC45-GINS-MCM2-7 複合体は CMG 複合体と呼ばれる)。一方でラギング鎖では、DNA ポリメラーゼδがプライマーゼである DNA ポリメラーゼαと共役し DNA 合成を担う。しかし、G4 構造がレプリソームと呼ばれるこの複製装置に及ぼす影響は明らかにされておらず、この 2 次構造領域の複製・維持機構も未解明で

ある。これらの問題により、染色体脆弱部位の維持機構はがん生物学における重要課題にも関わらず、長年その本態が不明なままであった。

生物学においては、反応の生化学的試験管内再構成がその機構の解明に必須である。真核生物の DNA 複製が試験管内再構成されたことによりその機構が急速に明らかにされたことが近年の好例である(Yeeles *et al.*, *Nature*, 2015)。同様に、この問題を解決するためには、染色体脆弱部位の複製反応を試験管内再構成し、生化学的手法により解析することが必要不可欠である。本研究では、生理的な DNA 複製・修復反応を試験管内で再現できるアフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)卵抽出液を用いて、生化学的手法により染色体脆弱部位の複製反応の機構の解明に取り組み、それに成功した。

Xenopus 卵抽出液を用いた DNA 複製反応系では、まず 2 重鎖プラスミド DNA と High speed supernatant (HSS)と呼ばれる *Xenopus laevis* 卵抽出分画を混合し、プラスミド DNA 上に複製前複合体をアセンブリーさせる。その後、Nucleoplasmic extract (NPE)と呼ばれる *Xenopus laevis* 卵抽出分画を混合することで、生理的なレプリソームによる二方向性の DNA 複製が開始され、プラスミド DNA が 1 ラウンドのみ複製される。プラスミド DNA は *Xenopus laevis* 卵抽出液で急速にクロマチン化されるため、これら一連の複製反応は全てクロマチン上で行われる。そのため、DNA 複製が完了した直後、プラスミド DNA はニックを有する弛緩した環状構造(ニック構造)をとるが、一度複製末端がライゲーションされると、プラスミド DNA は位相幾何学的にスーパーコイル構造に変換される。このニックとスーパーコイル構造は、複製されたプラスミド DNA を除タンパクし、アガロースゲル電気泳動により分離することでそれぞれ容易に観察できる。

この試験管内複製系を用いて G4 構造を含むプラスミド DNA を複製した際、プラスミド DNA の一部は、ニック産物近くに検出される中間体(ニック様構造)にまず変換され、その後約 1 時間をかけてスーパーコイル DNA へと変換されることが観察された。この中間体は G4 構造特異的に検出され、G4 を安定化させる化合物 PhenDC₃の存在下では、ニック様構造とスーパーコイル構造がまず 1:1 の割合で検出され、その後約 3 時間をかけ同様の構造変換が観察された。このニック様構造の本態を明らかにするために、次に変性アガロースゲル電気泳動による解析を行った。この解析では、放射性ヌクレオチドを用いて新生鎖をラベルした後、複製されたプラスミド DNA を制限酵素により線状化し、変性アガロースゲル電気泳動により新生鎖を単鎖 DNA として分離する。この解析により、G4 構造を有するプラスミド DNA の複製中間体において、G4 構造の周囲に新生鎖のギャップが存在することが明らかとなった。このギャップ形成は、レプリソームが G4 領域で停止する強い証拠である。この中間体では、岡崎フラグメントのサイズと一致する数百塩基ほどのギャップがまず形成されたが、5'-3'リゼクションによりそのサイズは一過的に約 2000 塩基まで拡大し、その後何かしらの機構により G4 領域が複製され、ギャップは完全に埋められた。さらに、ギャップ形成に起因すると思われる ATR 経路の活性化も観察された。以上から、これらのギャップ構造を有する中間体がニック様中間体の本態であると考えられる。興味深いことに、G4 構造をもたない相補鋳型鎖はギャップ形成を伴わず迅速に複製が完了した。これらの結果は、DNA 複製が G4 構造で停止する一方で、その相補鋳型鎖(非 G4 鎖)の複製は G4 構造によって影響を受けず、姉妹染色分体が G4 形成領域で迅速に分離することを強く示唆している。実際、この分離は線状化した複製産物を二次元電気泳動することにより確認された。

次に G4 形成領域における DNA 複製の停止位置を 1 塩基分解能で明らかにするために、G4 構造を含むプラスミド DNA の複製産物を制限酵素で消化し、その断片を変性シーケンスゲルにより解析した。その結果、DNA 合成は G4 構造の 26-13 塩基上流で一度停止し、その後 3-1 塩基上流までアプローチしたのち再度停止することが明らかになった。これらの停止は一過的であり、20-30 分後には DNA 合成が開始され、G4 構造が複製された。*Xenopus laevis* 卵抽出液による試験管内複製系において、複製開始点はランダムで決定される。したがって、この反応系では G4 構造がリーディング鎖の鋳型としても、ラギング鎖の鋳型としても複製され、シーケンスゲルで得られる DNA 合成停止位置の情報はその混合のものとなる。そこで、次にレプリソームの進行方向を制限することで、G4 構造におけるリーディング鎖およびラギング鎖の停止位置をそれぞれ明らかにした。

G4 構造が挿入されたプラスミド DNA は、その約 400 塩基対下流に 48 リピートの *lacO* オペロン配列から構成される約 1500 塩基対の反復配列を有する。このため、リコンビナント LacI タンパク質をプラスミド DNA に結合させた後に DNA 複製反応を開始させると、G4 構造の下流から上流方

向へと進むレプリソームの進行が阻害され、G4 領域は常に一定方向の単一複製フォークにより複製されることになる。この反応系では、G4 構造における一過的な合成の停止が観察されたものの、2つの複製フォークによる反応と同等の速度でG4構造が複製された。したがって、単一複製フォークはG4構造の複製に十分であることが示された。G4構造の26-13塩基上流における停止は、リーディング鎖によるG4複製反応でのみ観察された。真核生物ではリーディング鎖上をCMG複合体がポリメラーゼεの前方で移動するため、この停止産物はCMG複合体がG4構造によって停止した際に生じるフットプリントと考えられる。実際、CMG複合体の構成因子であるMCM7タンパク質が複製中にG4構造に集積することがChIPによる解析で観察された。これらの結果はCMG複合体がG4に衝突した際、その構造を解消できず停止することを強く示唆する。一方、G4構造から3-1塩基上流におけるDNA合成停止はラギング鎖およびリーディング鎖による複製反応で観察された。そのため、リーディング鎖では停止したCMG複合体が何かしらの機構でG4構造から消失したのち、DNAポリメラーゼεがG4構造へアプローチし、G4構造で停止すると考えられる。一方でG4がラギング鎖型鎖に形成される場合、CMG複合体はG4形成領域を停止せずに通過し、その後方でDNAポリメラーゼδがG4構造で停止すると考えられる。

CMG複合体がG4構造で停止したのちに消失する機構は2つ考えられる。1つ目の機構はCMG複合体のポリユビキチン化を伴うp97タンパク質によるCMG複合体の「アンローディング」であり、DNA鎖間架橋(ICL)修復でみられる(Wu *et al.*, *Nature*, 2019)。2つ目はCMG複合体のDNA損傷下流への「トラバース」であり、DNA-タンパク質架橋(DPC)損傷部のDNA複製反応において報告された(Sparks *et al.*, *Cell*, 2018)。そこでG4複製反応におけるCMG消失機構を明らかにするため、LacIを用いてG4構造をリーディング鎖で複製し、MCM7のG4構造における集積と、その400塩基対下流である*lacO*リピータ配列における集積をそれぞれChIPにより解析した。もしCMG複合体がG4構造をトラバースするのであれば、CMG複合体は下流の*lacO*リピータ配列に結合したLacIにより停止する。一方でCMG複合体がアンローディングされた場合、この停止は観察されない。この解析の結果、CMG複合体はG4構造の下流に集積することが観察された。さらに、p97阻害剤はCMG複合体のフットプリントの消失に影響を与えなかった。これらの結果から、CMG複合体はG4構造をトラバースすることが明らかになった。

しかし、CMG複合体はどのようにG4構造をトラバースするのであろうか？また、G4構造で停止したDNAポリメラーゼはどのようにDNA合成を再開し、この構造を複製するのであろうか？これらの課題を解明するため、次に、複製中のG4構造に集積する因子を同定した。この実験では、*Xenopus laevis* 卵抽出液を用いて、G4構造を有する単鎖DNAプラスミドをプライマー伸長法により複製し、その複製中間体をプルダウン法により回収したのち、プラスミドDNAに結合する因子を質量分析で網羅的に解析した。その結果、2つのDNAヘリカーゼであるFANCIとRPAがG4構造特異的に検出された。これらのタンパク質は*Xenopus laevis* 卵抽出液では複製反応開始とともにG4に集積し、複製完了に伴いプラスミドDNAから解離した。RPAはG4結合タンパク質として報告されているが、DNA複製における役割は不明である。そこで、この役割を明らかにするために抗RPA抗体を作製し、RPAを卵抽出液から免疫除去した。その結果、RPA除去下において、CMGトラバースが特異的に阻害されることが明らかになった。一方で、FANCIを免疫除去した際は、停止したDNAポリメラーゼの合成再開が特異的に阻害された。興味深いことに、RPAとFANCIの二重免疫除去下では、両反応が共に著しく阻害された。これらの複製阻害は、リコンビナントタンパク質として精製したFANCIおよびRPAを*Xenopus laevis* 卵抽出液に加えることで相補されたが、ATPase活性を欠損したFANCIそしてRPA変異体によって相補されなかった。二重免疫除去下では、リーディング鎖およびラギング鎖によるG4構造の複製は共に95%程度低下するため、この2つのタンパク質のDNAヘリカーゼ活性がG4構造の複製に必須であることが明らかになった。また、これらの結果は、CMGトラバースがRPAによって触媒されるものの、この反応にはFANCIも部分的に冗長的な役割を担っていることを示唆している。同様に、FANCIはG4構造で停止したDNAポリメラーゼの合成再開を触媒するが、RPAも部分的に冗長的な役割をこの反応に有すると考えられる。

次にこれら2つのDNAヘリカーゼによるG4複製機構をより詳細に解析するために、まずChIPにより2つのDNAヘリカーゼの集積のタイミングを比較した。RPAは複製開始以前からG4構造

に集積しており、リーディング鎖による G4 複製の際には、CMG 複合体の G4 構造への衝突と同期して解離した。一方で FANCI は、RPA の G4 からの解離に伴って G4 構造へ集積した。この DNA ヘリカーゼのスイッチはラギング鎖で G4 構造を複製した際にも観察された。これらの結果は、以下の 2 段階からなるモデルを示唆している。1. まず G4 構造が RPA によって認識され、CMG 複合体の G4 トラバースを促進する。2. その過程で RPA は G4 構造から解離するが、次に FANCI が G4 構造に集積し G4 複製を促進する。実際、RPA の解離は DNA 複製依存的であり、DNA 複製が起らない場合は FANCI の集積は見られなかった。また、ATPase 活性を欠損した RPA 変異体を *Xenopus laevis* 卵抽出液に加えた際、CMG トラバースと共に FANCI の集積が著しく阻害されたため、FANCI は CMG トラバース後に G4 構造に集積することが示された。また、RPA の免疫除去下では、FANCI が RPA の代わりに複製開始以前から G4 領域に集積し、同様に FANCI の免疫除去下においては RPA が CMG トラバース後に再度集積することが観察された。これらの結果から、通常 RPA が CMG トラバースの触媒を行い、FANCI が G4 構造で停止した DNA ポリメラーゼの合成再開を促進するが、どちらかの DNA ヘリカーゼが欠失している場合には、残りの因子が相補的な役割を担うことが明らかとなった。ラギング鎖においても同様に、FANCI 非存在下においては RPA が DNA ポリメラーゼを補助し、G4 複製を促進させることが明らかになった。

ではどのようにこれらの DNA ヘリカーゼは CMG トラバースを触媒するのであろうか？FANCI の免疫除去下では、CMG トラバースは阻害されずに、DNA ポリメラーゼの合成再開のみが特異的に阻害される。このことは、CMG トラバース後も G4 構造が維持されている強い証拠である。RPA は 3'-5' DNA ヘリカーゼであるため、CMG 複合体と同方向に DNA 上を移動する。このヘリカーゼは試験管内で二重鎖 DNA を解くことが証明されているが、その活性には 5'側に単鎖 DNA 構造が必要である。この単鎖 DNA は CMG ヘリカーゼが RPA に接近した際に作られる可能性があり、その際 RPA は CMG 複合体に先んじて G4 下流領域へと 2 重鎖 DNA をほどこしながら進み、G4 下流領域には単鎖 DNA 領域がつくられることになる。そこで、次に G4 構造の下流または上流に単鎖 DNA 領域を挿入し、リーディング鎖によって複製させることで、この単鎖 DNA 領域の形成が CMG トラバースに十分であるかを検証した。その結果、G4 下流に単鎖 DNA 領域がある場合にのみ、RPA と FANCI の二重免疫除去下においても効率的な CMG トラバースが観察された。このことから、RPA は CMG の接近にともなって下流に移動し単鎖 DNA 領域を作ることで CMG トラバースを促進することが明らかになった。RPA 非存在下においては FANCI が CMG トラバースを触媒する。しかし、この DNA ヘリカーゼの方向性は 5'-3'であり、RPA とは逆である。このことから、FANCI は非 G4 鋳型鎖上を G4 下流へと移動することで RPA と同様に単鎖 DNA を作り出すことが予想される。実際、FANCI による CMG トラバースの触媒は、G4 非鋳型鎖上に DPC を付与し、FANCI の DNA 上の移動を阻害した際に著しく阻害された。このため、FANCI は RPA とは異なり、G4 非鋳型鎖上を G4 領域の下流に向かって移動することで単鎖 DNA 領域を作り出し、CMG トラバースを促進させることが明らかになった。CMG トラバース後は DNA ポリメラーゼが G4 構造で停止するが、以下の理由から 2 つの DNA ヘリカーゼによって G4 構造がほどこれることで合成の再開が行われることが明らかになった。まず、複製終了後は RPA の集積がみられず、G4 構造が消失していることが強く示唆される。さらに、G4 構造の下流に単鎖 DNA を挿入した場合、ATPase 欠損変異体存在下において CMG トラバースは相補されるものの、DNA ポリメラーゼの再開は著しく阻害されたままである。そのため、ヘリカーゼ活性による G4 構造の破壊がこの反応に必須であると考えられる。

以上のように、本研究では G4 複製機構の解明を通し、染色体脆弱部位の維持機構の一端を明らかにできた。これらの結果は、派遣期間中に 3 つの関連学会にて発表を行い、本年 3 月中旬に学術誌に投稿予定である。また、本研究課題の他にロッテルダム・エラスムス大学医学部との共同研究を遂行し、がん抑制タンパク質である BRCA2 の新規相互作用因子として HSF2BP を同定し、その機能を解明した。この成果は 2 報の論文として派遣期間中に発表した(Brandsma *et al.*, *Cell Rep.*, 2019; Sato *et al.*, *Nucleic Acid Res.*, 2020)。さらに、アルコール摂取により生じるアセトアルデヒドによって引き起こされる ICL 修復機構の解明に成功し、その成果は *Nature* 誌に第二著者として掲載された(Hodskinson, Bolner *et al.*, *Nature*, 2020)。その他に、責任著者として ICL 修復に関する News&Views 記事を発表した(Sato and Knipscheer, *Nat. Chem. Biol.* 2020)。

引用文献（報告者の氏名は下線で示す）

Brandsma I, Sato K, van Rossum-Fikkert SE, van Vliet N, Sleddens E, Reuter M, Odijk H, van den Tempel N, Dekkers DHW, Bezstarosti K, Demmers JAA, Maas A, Lebbink J, Wyman C, Essers J, van Gent DC, Baarends WM, Knipscheer P, Kanaar R, Zelensky AN. HSF2BP Interacts with a Conserved Domain of BRCA2 and Is Required for Mouse Spermatogenesis. *Cell Rep.* 27, 3790-3798. 2019.

Castillo Bosch P, Segura-Bayona S, Koole W, van Heteren JT, Dewar JM, Tijsterman M, Knipscheer P. FANCD1 promotes DNA synthesis through G-quadruplex structures. *EMBO J.* 33, 2521-2533. 2014.

Hodkinson MR, Bolner A, Sato K, Kamimae-Lanning AN, Rooijers K, Witte M, Mahesh M, Silhan J, Petek M, Williams DM, Kind J, Chin JW, Patel KJ, Knipscheer P. Alcohol-derived DNA crosslinks are repaired by two distinct mechanisms. *Nature* doi: 10.1038/s41586-020-2059-5, in press. 2020.

Sato K, Brandsma I, van Rossum-Fikkert SE, Verkaik N, Oostra AB, Dorsman JC, van Gent DC, Knipscheer P, Kanaar R, Zelensky AN. HSF2BP negatively regulates homologous recombination in DNA interstrand crosslink repair. *Nucleic Acids Res.* 48, 2442-2456. 2020.

Sato K and Knipscheer P. Rewiring E2 enzymes. *Nat. Chem. Biol.* 16, 227-229. 2020

Sparks JL, Chistol G, Gao AO, Räschle M, Larsen NB, Mann M, Duxin JP, Walter JC. The CMG Helicase Bypasses DNA-Protein Cross-Links to Facilitate Their Repair. *Cell* 176, 167-181. 2019.

Yeeles JT, Deegan TD, Janska A, Early A, Diffley JF. Regulated eukaryotic DNA replication origin firing with purified proteins. *Nature* 519, 431-435. 2015.

Wu RA, Semlow DR, Kamimae-Lanning AN, Kochenova OV, Chistol G, Hodkinson MR, Amunugama R, Sparks JL, Wang M, Deng L, Mimoso CA, Low E, Patel KJ, Walter JC. TRAIP is a master regulator of DNA interstrand crosslink repair. *Nature* 567, 267-272. 2019.