



Title: DHX9 phosphorylation at S321 by ATM regulates DHX9 retention at DNA double-strand break sites and interaction with BRCA1

(ATMによるDHX9のS321におけるリン酸化はDHX9のDNA二本鎖切断部位での保持とBRCA1との相互作用を制御する)

Authors: Saaya Matsuya, Yuina Tsuchiya, Yudai Hiwatashi, Yurina Abe and Ryotaro Nishi

(松谷咲采 (東京工科大 大学院生)、土屋唯菜(東京工科大 大学院生)、樋渡雄大(東京工科大 学部生)、
阿部友理菜 (東京工科大 大学院生)、西良太郎(東京工科大 准教授))

Journal: Journal of Biological Chemistry 301 (2025) 110526

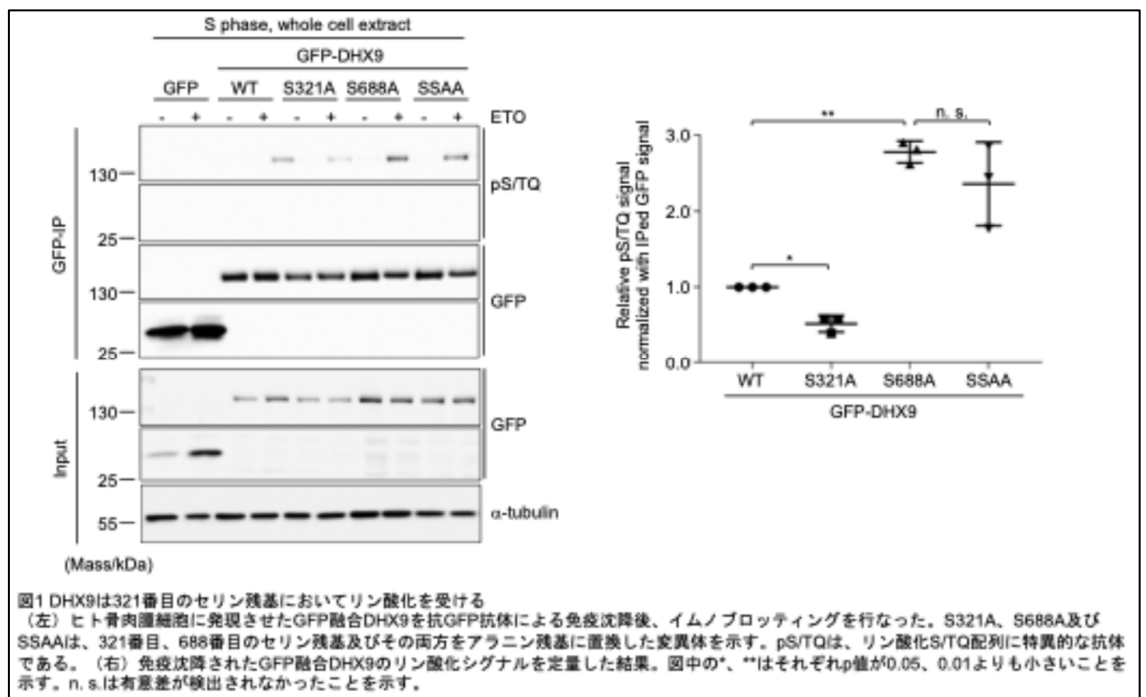
掲載年月: 2025 年 9 月

研究概要: DNA二本鎖切断は、ゲノムに生じるDNA損傷の中でも最も重篤なものであり、その修復においては、様々なDNA-RNA helicaseが機能することが報告されています。我々はこれまでの研究で、DNA-RNA helicaseであるDHX9がDNA二本鎖切断の修復に促進的に機能することを報告していましたが、DHX9の機能がどのように制御されているかは不明でした。本研究では、DNA二本鎖切断発生後にDHX9が321番目のセリン残基にリン酸化を受けることを明らかにしました。さらに、このリン酸化はATMと呼ばれるリン酸化酵素によって生じるものであることも明らかにしました。リン酸化を受けない、あるいはリン酸化を模倣した変異DHX9を用いた解析から、このリン酸化はDHX9をDNA二本鎖切断部位に係留することに重要である一方、下流のDNA二本鎖切断修復因子であるBRCA1との相互作用には阻害的であることが示されました。これらのことと一致して、DHX9リン酸化変異体（非リン酸化体もしくはリン酸化模倣体）を発現する細胞においては、DNA二本鎖切断修復効率の低下が認められました。

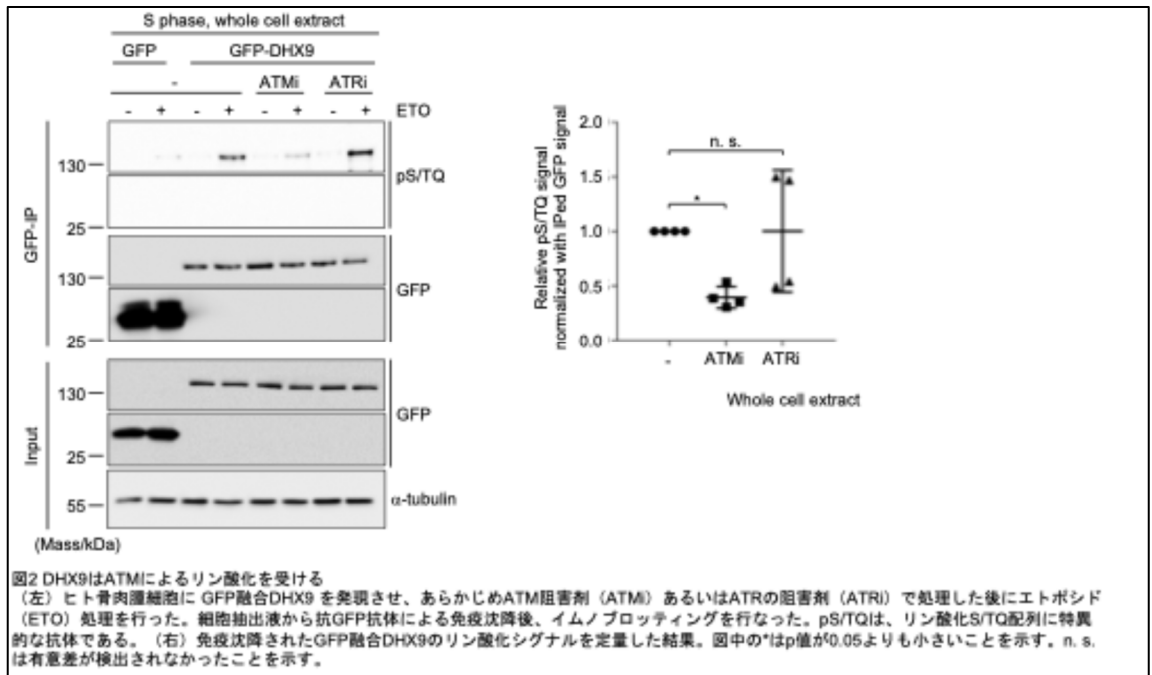
研究背景: 近年DNA二本鎖切断の修復過程において、一時的に形成されたDNA-RNAハイブリッド構造が修復の進行とともに解消されることが明らかになってきました。この解消を担うメカニズムは複数存在し、そのうちの一つにDNA-RNA helicaseと呼ばれる酵素群によるDNA-RNAハイブリッド構造の解消があります。本研究で着目したDHX9もDNA-RNA helicaseの一種であり、我々はDHX9がDNA二本鎖切断修復する促進する因子として同定していました。しかしながら、DHX9の機能制御については未解明となっており、DNA-RNAハイブリッド構造の時間的・空間的な制御を理解するためには、DHX9の制御を理解する必要があります。

研究成果: DNA二本鎖切断の発生後に、DHX9がどのような翻訳後修飾を受けるか明らかにする目的で、細胞をDNA二本鎖切断を生じる薬剤（エト

ポシド）で処理後に、DHX9タンパク質を免疫沈降とイムノブロッティングにより解析したところリン酸化を受けることが示されました。さらに、このリン酸化はDHX9の321番目のセリン残基に生じること、及びATM依存的に生じることを明らかにしました（図1、2）。これらに加えて、細胞周期のS期においてはクロマチン結合画分におけるDHX9のみがこ



のリン酸化を受けることが示されました。このリン酸化の DNA 二本鎖切断修復における重要性を検討するために、GFP 融合 DHX9 を発現する細胞に 405 nm レーザーによって DNA 二本鎖切断を誘起したところ、リン酸化を受けない変異体では野生型の DHX9 と比較して、その集積が減弱することが示されました。興味深いこと



に、リン酸化を受けない変異体及びリン酸化を模倣した変異体を用いて DNA 二本鎖切断修復において重要なタンパク質である BRCA1 との相互作用を検討したところ、リン酸化を模倣した変異体では野生型と比較して BRCA1 との相互作用が減弱していました（図 3）。これらの結果は、DHX9 のリン酸化は、DNA 二本鎖切断修復の進行に伴って非常に厳密に制御されることが重要であることを示唆しており、このリン酸化を制御する脱リン酸化酵素の同定が次の重要な研究であると考えられます。

社会への影響： 現在、多様な議論がなされている DNA 二本鎖切断発生後の DHX9 の機能制御について、リン酸化の非常に厳密な制御の存在を示すことが出来た。これにより、DNA 二本鎖切断修復の理解がさらに深まり DHX9 を標的とした創薬研究が促されるものと思われる。

専門用語：

DNA 二本鎖切断： ゲノム DNA に電離放射線やある種の抗がん剤が作用した時に生じる DNA 損傷の一つ。ゲノム DNA のホスホジエステル結合が両方の鎖において切断されているため、二本鎖切断と呼ばれる。DNA の末端が露出することから、変異が生じやすくまた、転座の原因にもなりうるため特に重篤な DNA 損傷であると考えられている。

免疫沈降： 多様なタンパク質が混在する細胞抽出液から、タグ（本研究の場合では GFP）あるいはタンパク質自体に対する抗体を用いて目的のタンパク質のみを回収する手法です。回収した目的タンパク質を解析する方法は多様ですが、本研究では主にイムノブロッティングを用いました。

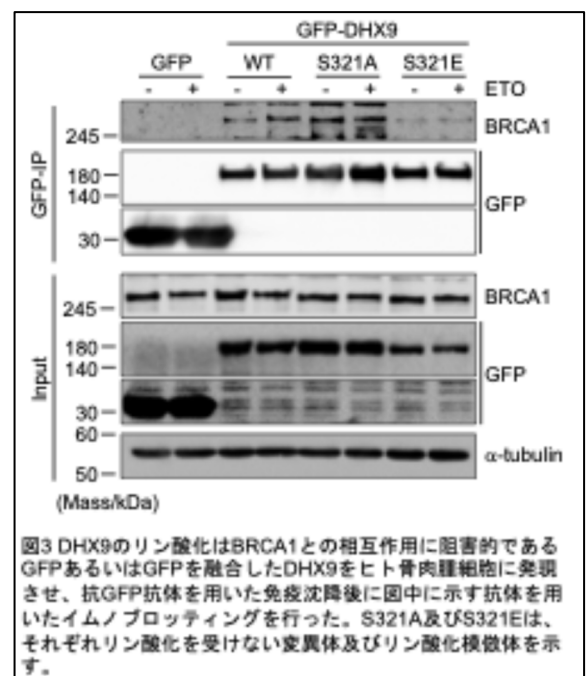


図3 DHX9のリン酸化はBRCA1との相互作用に阻害的である GFPあるいはGFPを融合したDHX9をヒト骨肉腫細胞に発現させ、抗GFP抗体を用いた免疫沈降後に図中に示す抗体を用いたイムノブロッティングを行った。S321A及びS321Eは、それぞれリン酸化を受けない変異体及びリン酸化模倣体を示す。