

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K12822

研究課題名(和文) ICL修復因子SLX4のフォーカス形成に関する新規ユビキチン化経路の探索

研究課題名(英文) Elucidation of the ubiquitination pathway mediating recruitment of SLX4 during ICL repair

研究代表者

勝木 陽子 (Katsuki, Yoko)

京都大学・生命科学研究科・特定助教

研究者番号：00645377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：小児遺伝病ファンコニ貧血(FA)の原因遺伝子産物であるSLX4は、ユビキチン結合ドメインを介し、未知のユビキチン化経路依存的にDNA損傷部位に集積して、DNA修復に寄与すると考えられている。本研究では、SLX4集積(フォーカス形成)に必要なアミノ酸配列を決定後、siRNAライブラリーを用いて集積に必要な因子のスクリーニングを行い、ユビキチンE3リガーゼRNF168を同定した。一方、ヒットした遺伝子群にFAコア複合体やFANCD2は含まれていなかった。以上から、SLX4はcanonicalなFA経路から独立して、RNF168によるユビキチン化依存的に損傷部位に集積すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SLX4集積に必要なユビキチン結合ドメインの欠損はファンコニ貧血(FA)を引き起こすため、その集積メカニズムは、FAの発症抑制に密接にかかわっている。このメカニズムを明らかにすることは、ゲノムの安定性や造血幹細胞の維持に役立つと考えられ、本課題にアプローチするための実験系を構築し、新規因子を同定したことに、本研究の学術的意義があるといえる。またファンコニ貧血をモデルとしたICL修復の研究を基に、内因性の化学物質がゲノム不安定性を引き起こすことで発がんに至るメカニズムをあきらかにすることは、広くがんの発生、予防や治療を考察するうえでも貴重な検討材料となり、社会的貢献につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Mutations in the SLX4 gene cause Fanconi anemia (FA-P). SLX4 encodes a large scaffold protein that possesses ubiquitin-binding domain and contributes to DNA interstrand crosslink (ICL) repair. Its recruitment to DNA damage site is required for ICL repair, and is mediated by an unidentified ubiquitination pathway.

To elucidate mechanisms to recruit SLX4 to the ICL lesion, we first determined SLX4 amino acid residues essential for the recruitment during ICL repair. Using GFP fusion with this region of SLX4, we carried out siRNA screening to find novel factors that are required for SLX4 recruitment to damage site and identified E3 ubiquitin ligase RNF168, which is known to function in DNA repair pathways. However, any components of the FA core complex or FANCD2 were not found as a hit candidate in our screening. Thus we concluded that SLX4 might be recruited to ICL site by a mechanism dependent on RNF168-mediated ubiquitination but independent on the canonical FA pathway during ICL repair.

研究分野：DNA修復

キーワード：ユビキチン化 ICL修復 フォーカス形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類においてゲノムの損傷を修復する遺伝子の欠損は、重篤な先天性遺伝病や、遺伝性発がんの原因となる。本研究の研究対象であるファンコニ貧血(FA)は、臨床的には骨格異常、再生不良性貧血、高発がん性の三主徴を呈し、細胞学的には染色体断裂と DNA 架橋剤に対する高感受性が特徴である。患者の造血幹細胞でみとめられるゲノム損傷は、細胞内のアルデヒドによる DNA クロスリンク損傷 (interstrand crosslink, ICL) の修復欠損に起因することが示唆されている。すでに 22 の原因遺伝子が同定されているが、FA 発症の分子基盤には多くの不明点が残されている。

FA の原因遺伝子産物 SLX4 /FANCP は、酵母からヒトまで保存された DNA 修復因子で、様々な分子と複合体をつくるスカフォールドタンパク質である (Fekairi S et al. Cell 2009)。ICL 修復において、SLX4 は DNA 切断酵素である構造特異的エンドヌクレアーゼと複合体を形成し、DNA 切断によってクロスリンク損傷を取り除く重要なステップで働く。そのために必要な機能ドメインのひとつが、ユビキチン結合ドメインである UBZ4 である (Kim Y et al. Blood 2013)。UBZ4 ドメインが欠損する SLX4 変異は修復異常を引き起こし、患者は FA を発症する (Kim Y et al. Nat Genet 2011, Stoepker C et al. Nat Genet 2011)。SLX4 の UBZ4 ドメインは、ユビキチン化された基質分子との会合を介して、SLX4 の損傷部位への集積を促進することが示唆されている。このドメインは線虫やカエル、トリ、哺乳類の SLX4 で保存されているが、いずれの種においても、結合するユビキチン化基質タンパク質、またその E3 ユビキチンリガーゼ等のユビキチン化経路因子は明らかにされておらず、また FA コア複合体や FANCD2 など、canonical な FA 経路因子が SLX4 の集積に必須であるか否かも不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、SLX4 の ICL 損傷部位への集積(以降、「フォーカス形成」と表記する)に必要な、最小アミノ酸配列の決定、新規ユビキチン化酵素の同定、ユビキチン化基質の同定、および ICL 修復における機能解析を目的とした。これらの発見により、SLX4 の集積を介して ICL 修復を司る、未同定のユビキチン化経路を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) GFP 融合 SLX4-N 発現細胞株の樹立と ICL 損傷によるフォーカス形成

SLX4 は核内でテロメアや PML ボディとよばれる構造体に局在することが知られており、その局在に必要なドメインやアミノ酸残基が C 末にあることが報告されている。申請者らは、ICL 修復における SLX4 の核内フォーカスに焦点をあてるため、UBZ4 を含む N 末の短い SLX4 を GFP と融合させ、レンチウイルス感染によって U2OS 細胞に発現させた。ICL 損傷誘導は、100ng/mL マイトマイシン C を用いて行った。この細胞株は後にスクリーニングに用いた。

(2) UBZ4 ドメイン変異体のフォーカス形成能の解析

ICL 修復において、SLX4 は UBZ4 ドメインを介して損傷部位に集積することが示唆されている。そこで、UBZ4 ドメインの機能欠損変異体を作製し、フォーカス形成能が減弱するか検討した。解析には IN Cell analyzer2000 を用いた。

(3) SLX4-N 発現による FANCP 患者由来細胞株(SLX4 機能欠損細胞)のクロノジェニックアッセイ

共同研究者である Younghwan Kim 博士(淑明女子大学、韓国)によって、hTERT およびヒトパピローマウイルス E6E7 を用いて不死化された FANCP 患者由来線維芽細胞に SLX4-N 野生

型および UBZ4 変異型を導入し、ICL 誘導剤シスプラチン感受性の検討をおこなった。

(4) siRNA ライブラリーを用いた SLX4 フォーカス形成に必要な因子のスクリーニング

安倍昌子博士(京都大学)の協力を得て、800 未満の siRNA ライブラリーを用いたスクリーニングを行った。3 - 1 で樹立した細胞株において、SLX4-N フォーカス形成能を IN Cell analyzer2000 で解析した。

(5) ソラレン添加時における UV-A レーザー照射による ICL 損傷誘導実験

共同研究者である太田智彦博士・呉文文博士(聖マリアンナ医科大学)の協力のもと、ICL レーザー実験を行い、SLX4-N 集積の RNF168 依存性を検討した。

4. 研究成果

(1) 申請者らは UBZ4 ドメインを含む短い SLX4-N を発現する細胞株を樹立したところ、全長 SLX4 では明瞭でなかった DNA 損傷局所への集積(フォーカス形成)をはっきりと確認できる系の構築に成功した。これは、SLX4 の C 末側にテロメアへの結合や SUMO との結合モチーフなど、UBZ4 ドメイン以外の SLX4 核内局在に機能する部分が存在しているためと解釈している。GFP タグにより可視化した SLX4 を用いた結果、SLX4 の N 末(1-900 アミノ酸残基)が ICL 損傷依存的にフォーカスを形成するのに必要で、この N 末 SLX4 は ICL 誘導剤への患者細胞の感受性をレスキューできることが確認された。N 末端にあるいくつかのドメインをさらに欠失させたところ、SLX4 のダイマー形成に必要な BTB ドメインも、損傷後のフォーカス形成に影響を与えることが示唆された。

(2) 前述の系を用いて、研究協力者である安倍博士の協力のもと siRNA スクリーニングを行い、SLX4 のフォーカス形成に必要なユビキチン化酵素 RNF168 を同定することに成功した。一方、canonical な FA 経路の因子は、本スクリーニングでは同定されなかった。またスクリーニングの結果から、候補遺伝子は複数存在するが、ユビキチン化基質の同定には至らなかった。

(3) ユビキチンリガーゼ活性をもたない RNF168 変異体は、ICL 損傷後にフォーカス形成するが、この細胞では SLX4 の集積は障害された。CRISPR/Cas9 システムにより RNF168 欠損細胞株を樹立したところ、ICL 損傷剤であるシスプラチンへの感受性が認められた。またソラレン処理後に UV-A を照射することで核内局所に ICL 損傷を誘導すると、SLX4 のリクルートが確認されたが、UBZ ドメイン変異や RNF168 ノックダウンによって、SLX4 の集積が減弱することがあきらかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

RFWD3-Mediated Ubiquitination Promotes Timely Removal of Both RPA and RAD51 from DNA Damage Sites to Facilitate Homologous Recombination. Inano S, Sato K, Katsuki Y, Kobayashi W, Tanaka H, Nakajima K, Nakada S, Miyoshi H, Knies K, Takaori-Kondo A, Schindler D, Ishiai M, Kurumizaka H, Takata M. Mol Cell. 2017 Jun 1;66(5):622-634. (査読有)

〔学会発表〕(計 7 件)

【国内学会】

DNA クロスリンク切断酵素 SLX4 のユビキチン化による制御機構. 勝木陽子, 安倍昌子, Haico van Attilum, 中田慎一郎, 鐘巻将人, Youghwan Kim, 矢部みはる, 矢部普正, 高田穰. 第

41回日本分子生物学会年会ワークショップ, 2018年11月予定. パシフィコ横浜 .

DNAクロスリンク修復因子SLX4のユビキチン化による制御機構. 勝木陽子, 安倍昌子, 中田慎一郎, 鐘巻将人, 矢部みはる, 矢部普正, 高田穰. 日本放射線影響学会第61回大会ワークショップ, 2018年11月予定. 長崎ブリックホール .

DNAクロスリンク修復因子SLX4のユビキチン化による制御機構. 勝木陽子, 安倍昌子, 中田慎一郎, 鐘巻将人, 矢部みはる, 矢部普正, 高田穰. 日本遺伝学会第90回大会(奈良大会)ワークショップ, 2018年9月. 奈良先端科学技術大学院大学 .

ICL修復因子SLX4はRNF168依存的なユビキチン化経路を介して損傷部位に集積する. 勝木陽子, 安倍昌子, Haico van Attikum, 中田慎一郎, 鐘巻将人, Youghwan Kim, 矢部みはる, 矢部普正, 高田穰. 2017年度生命科学系学会合同年次大会ワークショップ, 2017年12月, 神戸ポートピアホテル .

【国際学会】

RNF168 mediates the recruitment of SLX4 via ubiquitination during ICL repair. Yoko Katsuki, Masako Abe, Haico van Attikum, Masato T. Kanemaki, Shinichiro Nakada, Miharuru Yabe, Hiromasa Yabe, Yonghwan Kim, Minoru Takata. Poster presentation in the 2nd International Symposium on Radiation Therapy and biology, November 2018. Kyoto University, Kyoto, Japan. (査読有)

RNF168 mediates the recruitment of SLX4 via ubiquitination during ICL repair. Yoko Katsuki, Masako Abe, Haico van Attikum, Masato T. Kanemaki, Shinichiro Nakada, Miharuru Yabe, Hiromasa Yabe, Yonghwan Kim, Minoru Takata. Poster presentation in Gordon Research Conference Genomic Instability, July 2018. The Hong Kong University of Science and Technology, Hong Kong, China. (査読有)

RNF168 mediates the recruitment of SLX4 via ubiquitination during ICL repair. Yoko Katsuki, Masako Abe, Haico van Attikum, Masato T. Kanemaki, Shinichiro Nakada, Miharuru Yabe, Hiromasa Yabe, Yonghwan Kim, Minoru Takata. Poster presentation in 3rd DNA Replication/Repair Structures and Cancer Conference, February 2018. Fiesta Americana Condesa, Cancun, Mexico. (査読有)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年:

国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：安倍 昌子
ローマ字氏名：(ABE, masako)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。