

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11646

研究課題名(和文) 損傷乗越え複製が、癌細胞の増殖を促進する機構の解明

研究課題名(英文) How trans-lesion synthesis promote tumorigenesis?

研究代表者

立石 智 (Tateishi, Satoshi)

熊本大学・発生医学研究所・講師

研究者番号：00227109

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)：精製したヒトRAD18・RAD6B複合体タンパクは、ヒストンH2Aタンパクをモノおよびポリユビキチン化する活性があることがわかった。細胞を電離放射線照射すると、クロマチンタンパクのユビキチン化レベルが増加した。RAD18欠損細胞ではそのレベルが低下していた。RAD18は電離放射線照射に反応して、クロマチンタンパクをユビキチン化すると考えられる。RAD18欠損細胞でヒストンメチル化酵素の発現レベルが低下していた。RAD18はヒストンメチル化酵素の発現量を調節することが示唆された。RAD18はヒストンメチル化制御を介して、多様な遺伝子の発現をコントロールすると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

E3酵素であるRAD18は、DNA複製部位へ集積し損傷乗越え複製を複製停止部位に集積させることで、損傷乗越え複製を促進する機能をもつ。Rad18欠損マウスは、損傷乗越え複製酵素 欠損マウスと異なる表現型が見られた。RAD18には、損傷乗越え複製の制御とは異なる機序でゲノムを安定化する機構があると推論した。今回の研究で、RAD18は新たにヒストンタンパクのユビキチン化とメチル化に関与していることが示された。RAD18は正常細胞の増殖を維持する一方で、癌化した細胞の増殖も助けてしまう面をもつ。今回の研究成果が、老化の抑制研究または新規の抗癌剤の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We found that purified human RAD18 / RAD6B complex protein have an activity of mono- and polyubiquitinating histone H2A protein. Irradiation of cells with ionizing radiation increased the ubiquitination level of chromatin protein. The level was reduced in RAD18-deficient cells. RAD18 is thought to ubiquitinate chromatin proteins in response to ionizing radiation. The expression level of histone methyltransferase was decreased in RAD18-deficient cells. It was suggested that RAD18 regulates the expression level of histone methyltransferase. RAD18 is thought to regulate the expression of various genes through histone methylation regulation.

研究分野：ゲノムDNA安定性の維持機構 放射線生物学

キーワード：損傷トレランス RAD18 ヒストン ヒストンメチル化酵素 ユビキチン 放射線

1. 研究開始当初の背景

細胞に UV が照射されて DNA 鎖が損傷されて DNA 複製が停止すると、E3 酵素である RAD18 タンパクは DNA 複製部位へ集積して PCNA をユビキチン化する。特殊な DNA 複製酵素は、ユビキチン化 PCNA と強い親和性をもちため複製停止部位に集積し、損傷を乗り越えて DNA を複製する(損傷乗り越え複製)。Rad18 欠損マウスを作製しその表現型を調べた結果、損傷乗り越え複製酵素 欠損マウスと異なる表現型が見られた。このため、RAD18 には、損傷乗り越え複製の制御とは異なるメカニズムのゲノム安定化機構があると推論した。これまでの研究により、RAD18 は DNA が損傷しやすい環境でも DNA 複製と細胞増殖を維持する役割をもつ。正常細胞の増殖を維持する一方で、癌化した細胞の増殖も助けてしまう面をもつ。(熊本大学発生医学研究所損傷修復分野のホームページを参照：http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/department_of_cell_maintenance/) p53 遺伝子を欠損する細胞は、癌細胞のモデルである。この細胞から Rad18 遺伝子を欠損させると、細胞の増殖が低下する傾向が見られた。この時に細胞周期進行のブレーキの役割をもつ、p16 および p27 タンパクの量が増えていた。Rad18 タンパクは、p16 および p27 タンパクの発現を抑えることにより、癌細胞の増殖を促すことが考えられる。

2. 研究の目的

Rad18 がどのようなメカニズムで、p16 などの発現を制御するのか調べることが目的である。また、Rad18 がエピジェネティックにヒストンを修飾することにより、遺伝子発現を制御する可能性があるため、Rad18 によるヒストンタンパク修飾についても調べることになった。

3. 研究の方法

野生型細胞と Rad18 欠損細胞を用いて、各種のヒストンメチル化酵素の発現量を比較した。また、Rad18 タンパクによるヒストン修飾について調べるため、精製した RAD18・RAD6 タンパクと精製ヒストンタンパクを *in vitro* で反応された後におこる、ヒストン修飾反応についてウエスタン解析などにより調べた。さらに、*in vivo* での生物学的意義をさぐるため、野生型細胞と Rad18 欠損細胞に紫外線または電離放射線を照射した後に、どのようなヒストン修飾が Rad18 依存的におこるのか調べた。

4. 研究成果

(1) 精製 RAD18 タンパクは、ヒストン H2A タンパクをユビキチン化する
精製したヒト RAD18・RAD6B 複合体タンパクは、*in vitro* でヒストン H2A タンパクをモノおよびポリユビキチン化する活性があることがわかった。RAD6B タンパクだけでは、この活性は見られなかった。RAD18 には、zinc finger ドメインがある。このドメインを変異させた RAD18C207F タンパクは、ヒストン H2A タンパクをモノユビキチン化するが、ポリユビキチン化する活性は失われていた。

次に、*in vivo* での RAD18 によるヒストン H2A のユビキチン化の生物学的意義をさぐるため、

野生型ヒト細胞、RAD18 欠損細胞、RAD18 欠損+野生型 RAD18 細胞、RAD18 欠損+zinc finger 欠損 RAD18 細胞の 4 種類に電離放射線を照射した。培養後のヒストンユビキチン化レベルを、抗ユビキチン化ヒストン H2A 抗体を用いる細胞免疫検出により評価した。野生型細胞では電離放射線照射後に、クロマチンに含まれるタンパクのユビキチン化レベルの増加が見られた。これに対して、RAD18 欠損細胞ではそのレベルが約 30%低下していた。RAD18 欠損細胞に RAD18 を発現させた細胞では、それが回復していた。しかし zinc finger 欠損 RAD18 を発現させた細胞では、回復のレベルが低下していた。以上の結果から、RAD18 タンパクは *in vitro* でヒストン H2A タンパクをモノ、およびポリユビキチン化する。In vivo で RAD18 は電離放射線照射に応答して、クロマチンに含まれるタンパクをユビキチン化すると結論した。

(2) RAD18 により制御されられると思われるヒストンメチル化機構

野生型ヒト細胞およびその RAD18 欠損細胞、野生型マウス細胞およびその Rad18 欠損細胞をそれぞれ用いて、各種のヒストンメチル化酵素の発現レベルを比較した。その結果ヒト細胞、マウス細胞でも、ある種類のヒストンメチル化酵素の発現レベルが RAD18 欠損細胞で低下していた。RAD18 欠損細胞に野生型 RAD18 遺伝子を発現させた細胞では、そのヒストンメチル化酵素の発現の回復が見られた。RAD18 はヒストンメチル化酵素の発現量を調節することが示唆された。RAD18 はヒストンメチル化制御を介して、多様な遺伝子の発現をコントロールすると考えられる。現在、RAD18 タンパクとヒストンメチル化酵素の結合能力などを評価することにより、RAD18 によるヒストンメチル化の制御機構について調べている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takaoka Yutaka, Ohta Mika, Tateishi Satoshi, Sugano Aki, Nakano Eiji, Miura Kenji, Suzuki Takashi, Nishigori Chikako	4. 巻 9
2. 論文標題 In Silico Drug Repurposing by Structural Alteration after Induced Fit: Discovery of a Candidate Agent for Recovery of Nucleotide Excision Repair in Xeroderma Pigmentosum Group D Mutant (R683W)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 249 ~ 249
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines9030249	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 Lou Jitong, Yang Yang, Gu Qisheng, Price Brandon A, Qiu Yuheng, Fedoriw Yuri, Desai Siddhi, Mose Lisle E, Chen Brian, Tateishi Satoshi, Parker Joel?S, Vaziri Cyrus, Wu Di	4. 巻 3
2. 論文標題 Rad18 mediates specific mutational signatures and shapes the genomic landscape of carcinogen-induced tumors in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NAR Cancer	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/narcan/zcaa037	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 該当する
1. 著者名 Mustofa Md Kawsar, Tanoue Yuki, Chirifu Mami, Shimasaki Tatsuya, Tateishi Chie, Nakamura Teruya, Tateishi Satoshi	4. 巻 -
2. 論文標題 RAD18 mediates DNA double-strand break-induced ubiquitination of chromatin protein	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab010	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 Tanoue, Y., Toyoda, T., Sun, J, Mustofa, M.K., Tateishi, C., Endo, S., Motoyama, N., Araki, K., Wu, D., Okuno, Y., Tsukamoto, T., Takeya, M., Ihn, H., Vaziri, C., Tateishi, S.	4. 巻 138
2. 論文標題 Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J. Invest. Dermatol.	6. 最初と最後の頁 2550-2557
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jid.2018.05.015.	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 該当する

1. 著者名 Ariumi, Y., Kawano, K., Yasuda-Inoue, Y., Kuroki, M., Fukuda, H., Siddiqui, R., Turelli, P, Tateishi, S.	4. 巻 8
2. 論文標題 DNA repair protein Rad18 restricts LINE-1 mobility.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 15894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-34288-9.	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 該当する

1. 著者名 Yang, Y., Gao, Y., Zlatanou, A., Tateishi, S., Yurchenko, V., Rogozin, I.B., Vaziri, C.	4. 巻 17
2. 論文標題 Diverse roles of RAD18 and Y-family DNA polymerases in tumorigenesis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cell Cycle	6. 最初と最後の頁 833-843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15384101.2018.1456296.	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 該当する

1. 著者名 立石 智	4. 巻 69
2. 論文標題 タンパク質のモノユビキチン化	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 生体の科学	6. 最初と最後の頁 123-127
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Kawsar Md Mustofa, Satoshi Tateishi
2. 発表標題 Possible role of Rad18 in preventing cellular senescence
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 第42回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kawsar Md Mustofa, Yuki Tanoue, Satoshi Tateishi
2. 発表標題 Differential roles of Rad18 and Chk2 in genome maintenance and skin carcinogenesis following UV exposure
3. 学会等名 日本分子生物学会年会 第41回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

熊本大学 発生医学研究所 損傷修復分野 http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/department_of_cell_maintenance/ Kumamoto Univ. IMEG, Dept. Cell Maintenance http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/en/bunya_top/department_of_cell_maintenance/ http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/bunya_top/department_of_cell_maintenance/

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

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