

令和 4 年 9 月 13 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04267

研究課題名(和文)放射線等で生じたゲノム切断の切断端に付く付加体を除去するユビキチン経路の解明

研究課題名(英文)Elucidation of the ubiquitin pathway that removes adducts attached to DNA double-strand breaks

研究代表者

笹沼 博之(SASANUMA, Hiroyuki)

公益財団法人東京都医学総合研究所・基礎医科学研究分野・副参事研究員

研究者番号：00531691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断修復は相同組換えと非相同末端結合経路で修復される。切断端に化学修飾や共有結合した蛋白質があると、非相同末端結合経路の再結合や相同組換え時のDNA合成を阻害する。そのため修復の前に、切断端は5'リン酸基と3'水酸基を保持した切断端に変換しておく必要がある。本研究の目的は、切断端周辺の付加体(塩基損傷や切断端に共有結合する蛋白質)を除去し、3末端水酸基と5'末端リン酸基をもつ切断端に変換する分子メカニズムを明らかにすることにあった。本研究によって、切断端周辺の付加体の除去にユビキチンリガーゼUBC13, RAP80, BRCA1が重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

抗がん治療では、放射線照射によりDNA損傷を与え腫瘍細胞を殺傷する。放射線感受性を高める増感剤は、治療効果を高めるのみならず照射線量を減らすことにつながる。本研究では、放射線によって切断端に発生する塩基損傷や蛋白質付加体の除去機構を明らかにした。本研究で同定したUBC13ユビキチン化酵素依存的な付加体除去の分子機構をもとに、放射線増感剤開発が可能となる。放射線生物学において、「切断端に発生する塩基損傷や蛋白質付加体の除去」の分子機構は長らく不明であったが、本研究によってその分子メカニズムの一端が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：DNA double strand breaks (DSBs) are mainly repaired by Non-Homologous End Joining (NHEJ) and Homologous Recombination (HR). While the ends of DSBs induced by restriction enzyme harbor 5'-phosphate and 3'-hydroxy group, those induced by ionizing radiation (IR) do not. IR induces DSBs with a variety of chemical modifications at DSB end-proximal regions. Such DSBs with chemical/protein adducts interfere DSB repair process. The molecular mechanism by which the adducts at DSB sites are processed remains elusive. The aim of this research project is to clarify its molecular mechanism of adduct removal from DSB-ends. We identified the molecules involved in adduct removal. Ubiquitin E2 ligase UBC13-dependent ubiquitination at the DSB end-proximal region promotes the removal of adducts and its repair by NHEJ. We proposed a model that the ubiquitinated proteins are recognized by RAP80-BRCA1, which transfers its DNA damaging signal to MRE11 nuclease to adduct removal.

研究分野：放射線生物学

キーワード：がん DNA修復 相同組換え

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖切断は、最も重篤な DNA 損傷であり修復されない場合には細胞死を引き起こす。DNA 二重鎖切断の修復には、相同組換えと非同末端結合修復がある。相同組換えにおいて、切断端の相同配列への侵入(相同鎖検索反応)後に DNA 合成、あるいは非同末端結合経路による切断端の再結合、いずれの反応においても切断末端の DNA 形状が重要である。DNA 合成のためには 3' 末端の水酸基、切断端の再結合のためには 5' 末端のリン酸基が必須である。しかし放射線等で発生する偶発的な DNA 切断は、3' 末端水酸基と 5' 末端リン酸基を保持していることは稀である。放射線の直接作用により切断された DNA 周辺には、間接作用により発生するラジカル分子が塩基を損傷すると考えられており、こうした塩基損傷を含む DNA 切断端は「dirty end」と呼ばれ、制限酵素による DNA 切断端(3' 末端水酸基と 5' 末端リン酸基を保持する「clean end」)に比べ、修復が困難であることがわかっている。偶発的な DNA 切断は、相同組換えや非同末端結合経路による修復の前に 3' 末端水酸基と 5' 末端リン酸基をもつ切断にトリミングされる必要がある。3' 末端水酸基と 5' 末端リン酸基をもつ切断にトリミングされる分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、切断端周辺に発生する塩基損傷や切断端に共有結合する蛋白質を除去し、3' 末端水酸基と 5' 末端リン酸基をもつ切断端に変換する分子メカニズムを明らかにすることになった。

3. 研究の方法

目的を達成するために、細胞内に「clean end」と「dirty end」を発生させ、修復のキネティクスを調べることで「dirty end」に関わる因子とその分子メカニズムを解析した。「clean end」の発生には、細胞内発現させた制限酵素をタモキシフェンによって核移行させることによって DNA 切断を発生させた(図 1)。「dirty end」は、放射線とエトポシド処理によって発生させた。エトポシドは、Top2 の阻害剤であり、切断端に Top2 分子が共有結合した DNA 切断を発生させる。発生した DNA 切断数を合わせるために野生型細胞を使用し、放射線線量、エトポシド曝露量、タモキシフェン処理時間を調整した。DNA 切断数は、DNA 切断マーカである γ H2AX 抗体による免疫染色により測定した。DNA 修復に関与することが知られている遺伝子の欠損細胞を多数作製し、これらの欠損細胞に「clean end」と「dirty end」を発生させ、 γ H2AX foci を指標に DNA 修復キネティクスを調べた。もし「dirty end」の除去に関係する遺伝子であれば、その欠損細胞において「clean end」修復に異常を示さず、放射線やエトポシドによって発生する「dirty end」修復が遅延するはずであると考えた。

4. 研究成果

研究代表者は、以前の研究で放射線やトポイソメラーゼ阻害剤によって発生した「dirty end」の除去反応の解析を行い、Mre11 ヌクレアーゼが「dirty end」除去反応に重要な役割を果たしていることを見出した。本研究の解析により、Mre11 ヌクレアーゼの制御因子として、UBC13、RAP80、BRCA1 遺伝子を同定した。UBC13 はユビキチン E2 リガーゼ酵素、RAP80 は複数のユビキチン結合ドメインをもち BRCA1 と相互作用することが知られている(図 2)。これらの遺伝子機能欠損細胞では、「dirty end」を発生させる放射線やエトポシドによる修復に異常があり、修復が遅れた。このことから、「dirty end」には UBC13 が DNA 切断部位周辺の基質分子をユビキチン化し、ユビキチン化された基質を RAP80 が認識し、BRCA1 をリクルートするモデルを提唱した。このモデルをサポートするように、UBC13 発現抑制細胞においてはユビキチン Foci が減少し、RAP80 と BRCA1 Foci が大きく低下した。また「dirty end」をトリミングするヌクレアーゼである MRE11 Foci も減少した。2016 年に研究代表者が発表

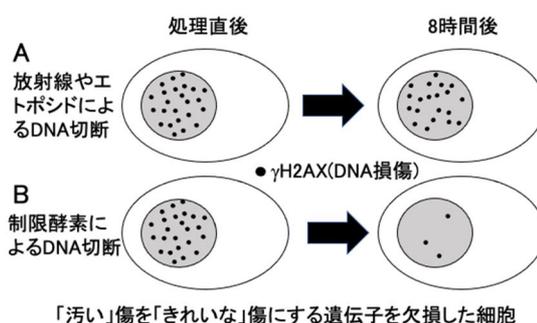


図 1 放射線によって発生する「汚い」傷修復に関与する遺伝子を同定するアッセイ
エストロゲン受容体を融合した 8 塩基認識型制限酵素(ER-AsiSI)を発現した細胞を作製した。タモキシフェン処理により ER-AsiSI は核移行し、ゲノム DNA を切断する。タモキシフェン濃度と処理時間を調整し、1 Gy 放射線による DNA 損傷数と ER-AsiSI による DNA 損傷数を同程度にした。

した M.CeII 誌、2018 年の PNAS 誌の論文に引き続き、本研究成果を iScience 誌に報告した。

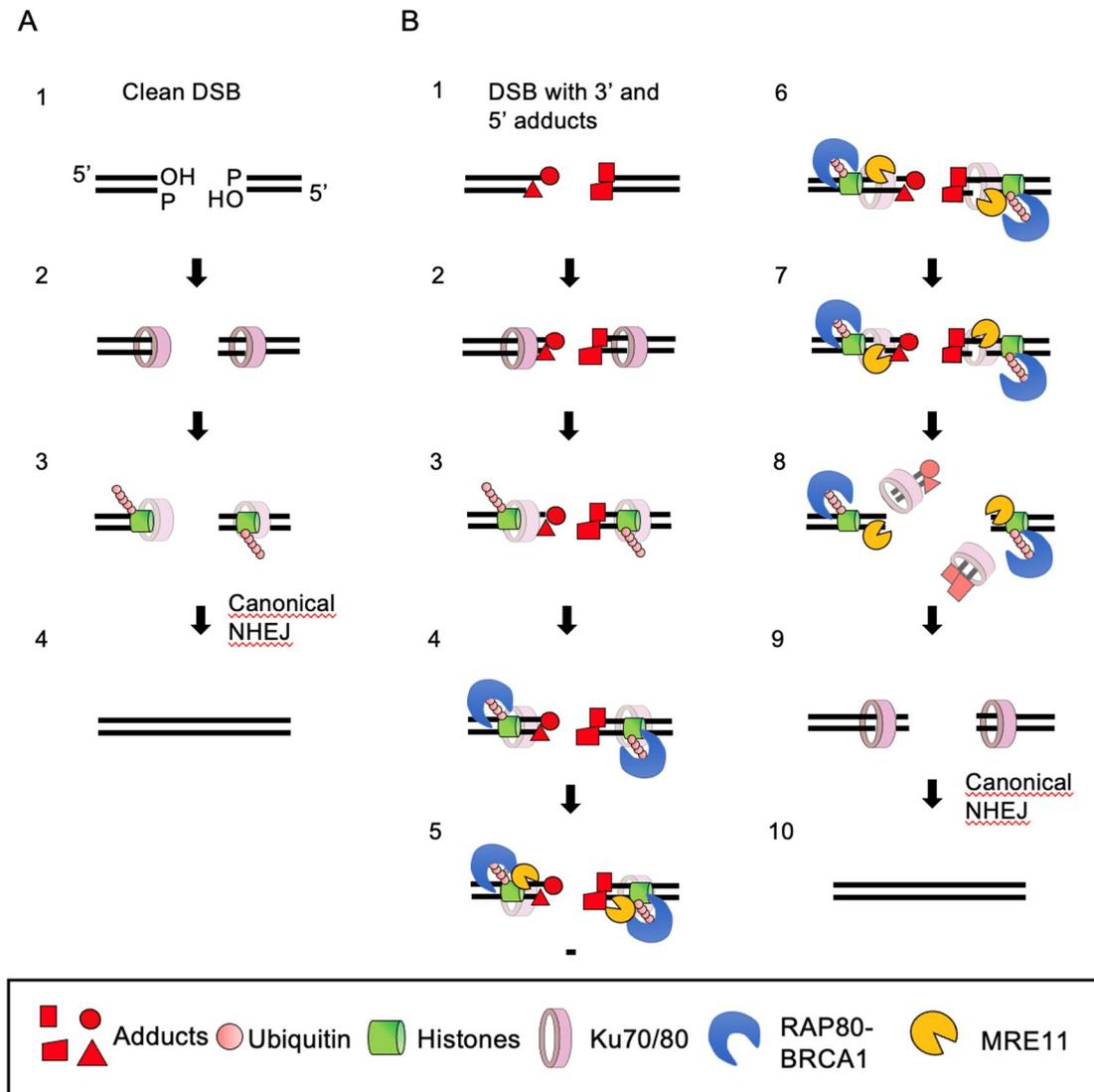


図2 本研究成果のまとめ

G1 期において、5' 末端にリン酸基と 3' 末端に水酸基を有する「Clean DSB」では、非相同末端結合経路が切断端を再結合する。一方で、放射線やトポイソメラーゼ阻害剤による DNA 切断では、切断端に化学修飾やタンパク質が付加した「Dirty DSB」(図中の赤色)が発生する。この場合、UBC13 が切断端付近の基質をユビキチン化する。本研究により基質分子の一つが H2A であることを明らかにした。ユビキチン化された基質は、RAP80 のユビキチン鎖認識ドメイン(UIM)により認識され、RAP80 と相互作用する BRCA1 が呼び寄せられる。RAP80 や BRCA1 欠損細胞では、切断端にある付加体を除去するヌクレアーゼである MRE11 が結合できなくなることから、UBC13 依存的なユビキチン化経路が BRCA1 をリクルートし、BRCA1 依存的に MRE11 がリクルートされることがわかった。本モデル図は、iScience 誌に掲載された図を一部改変した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計18件（うち査読付論文 18件 / うち国際共著 10件 / うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Moribe Fumiya, Nishikori Momoko, Takashima Tsuyoshi, Taniyama Daiki, Onishi Nobuyuki, Arima Hiroshi, Sasanuma Hiroyuki, Akagawa Remi, Elloumi Fathi, Takeda Shunichi, Pommier Yves, Morii Eiichi, Takaori-Kondo Akifumi, Murai Junko	4. 巻 16
2. 論文標題 Epigenetic suppression of SLFN11 in germinal center B-cells during B-cell development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0237554-0237554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0237554	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 Rahman Md Maminur, Mohiuddin Mohiuddin, Shamima Keka Islam, Yamada Kousei, Tsuda Masataka, Sasanuma Hiroyuki, Andreani Jessica, Guerois Raphael, Borde Valerie, Charbonnier Jean-Baptiste, Takeda Shunichi	4. 巻 295
2. 論文標題 Genetic evidence for the involvement of mismatch repair proteins, PMS2 and MLH3, in a late step of homologous recombination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 17460 ~ 17475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013521	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 Takeishi Ayuna, Kogashi Hiroyuki, Odagiri Mizuki, Sasanuma Hiroyuki, Takeda Shunichi, Yasui Manabu, Honma Masamitsu, Suzuki Tetsuya, Kamiya Hiroyuki, Sugasawa Kaoru, Ura Kiyoe, Sassa Akira	4. 巻 15
2. 論文標題 Tyrosyl-DNA phosphodiesterases are involved in mutagenic events at a ribonucleotide embedded into DNA in human cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0244790-0244790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0244790	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 Sasanuma Hiroyuki, Yamada Shintaro, Tsuda Masataka, Takeda Shunichi	4. 巻 93
2. 論文標題 Restoration of ligatable "clean" double-strand break ends is the rate-limiting step in the rejoining of ionizing-radiation-induced DNA breakage	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 DNA Repair	6. 最初と最後の頁 102913 ~ 102913
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.dnarep.2020.102913	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 Nakano Toshiaki, Shoulkamy Mahmoud I., Tsuda Masataka, Sasanuma Hiroyuki, Hirota Kouji, Takata Minoru, Masunaga Shin-ichiro, Takeda Shunichi, Ide Hiroshi, Bessho Tadayoshi, Tano Keizo	4. 巻 15
2. 論文標題 Participation of TDP1 in the repair of formaldehyde-induced DNA-protein cross-links in chicken DT40 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0234859-0234859
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0234859	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 Saha Liton Kumar, Wakasugi Mitsuo, Akter Salma, Prasad Rajendra, Wilson Samuel H., Shimizu Naoto, Sasanuma Hiroyuki, Huang Shar-yin Naomi, Agama Keli, Pommier Yves, Matsunaga Tsukasa, Hirota Kouji, Iwai Shigenori, Nakazawa Yuka, Ogi Tomoo, Takeda Shunichi	4. 巻 117
2. 論文標題 Topoisomerase I-driven repair of UV-induced damage in NER-deficient cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 14412-14420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1920165117	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 Akagawa Remi, Trinh Hai Thanh, Saha Liton Kumar, Tsuda Masataka, Hirota Kouji, Yamada Shintaro, Shibata Atsushi, Kanemaki Masato T., Nakada Shinichiro, Takeda Shunichi, Sasanuma Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts from DNA Double-Strand Breaks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101027 ~ 101027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101027	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 Al Mahmud Md. Rasef, Ishii Kenichiro, Bernal Lozano Cristina, Delgado Sainz Irene, Toi Masakazu, Akamatsu Shusuke, Fukumoto Manabu, Watanabe Masatoshi, Takeda Shunichi, Cortes-Ledesma Felipe, Sasanuma Hiroyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 450 ~ 465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12770	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 Akagawa Remi, Trinh Hai Thanh, Saha Liton Kumar, Tsuda Masataka, Hirota Kouji, Yamada Shintaro, Shibata Atsushi, Kanemaki Masato T., Nakada Shinichiro, Takeda Shunichi, Sasanuma Hiroyuki	4. 巻 23
2. 論文標題 UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts from DNA Double-Strand Breaks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101027 ~ 101027
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101027	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 Al Mahmud Md. Rasel, Ishii Kenichiro, Bernal Lozano Cristina, Delgado Sainz Irene, Toi Masakazu, Akamatsu Shusuke, Fukumoto Manabu, Watanabe Masatoshi, Takeda Shunichi, Cortes Ledesma Felipe, Sasanuma Hiroyuki	4. 巻 25
2. 論文標題 TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 450 ~ 465
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12770	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 Ibrahim Mahmoud Abdelghany, Yasui Manabu, Saha Liton Kumar, Sasanuma Hiroyuki, Honma Masamitsu, Takeda Shunichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Enhancing the sensitivity of the thymidine kinase assay by using DNA repair deficient human TK6 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental and Molecular Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 602 ~ 610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/em.22371	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 Akagawa R, Trinh HT, Saha LK, Tsuda M, Hirota K, Yamada S, Shibata A, Kanemaki MT, Nakada S, Takeda S, Sasanuma H.	4. 巻 31
2. 論文標題 UBC13-Mediated Ubiquitin Signaling Promotes Removal of Blocking Adducts From DNA Double-Strand Breaks	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101027	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 -

1. 著者名 Al Mahmud MR, Ishii K, Bernal-Lozano C, Delgado-Sainz I, Toi M, Akamatsu S, Fukumoto M, Watanabe M, Takeda S, Cortes-Ledesma F, Sasanuma H	4. 巻 in press
2. 論文標題 TDP2 suppresses genomic instability induced by androgens in the epithelial cells of prostate glands.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12770	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 Ibrahim MA, Yasui M, Saha LK, Sasanuma H, Honma M, Takeda S	4. 巻 in press
2. 論文標題 Enhancing the sensitivity of the thymidine kinase assay by using DNA repair-deficient human TK6 cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environmental and Molecular Mutagenesis	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/em.22371	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 -

1. 著者名 Itou J, Takahashi R, Sasanuma H, Tsuda M, Morimoto S, Matsumoto Y, Ishii T, Sato F, Takeda S, Toi M	4. 巻 23
2. 論文標題 Estrogen Induces Mammary Ductal Dysplasia via the Upregulation of Myc Expression in a DNA-Repair-Deficient Condition	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 100821 ~ 100821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.100821	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 -

1. 著者名 Morimoto S, Tsuda M, Bunch H, Sasanuma H, Austin C, Takeda S	4. 巻 10
2. 論文標題 Type II DNA Topoisomerases Cause Spontaneous Double-Strand Breaks in Genomic DNA	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 868 ~ 868
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes10110868	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 Sassa A, Tada H, Takeishi A, Harada K, Suzuki M, Tsuda M, Sasanuma H, Takeda S, Sugasawa K, Yasui M, Honma M, Ura K	4. 巻 9
2. 論文標題 Processing of a single ribonucleotide embedded into DNA by human nucleotide excision repair and DNA polymerase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13910
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50421-8	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 -

1. 著者名 Gothe HJ, Bouwman BAM, Gusmao EG, Piccinno R, Petrosino G, Sayols S, Drechsel O, Minneker V, Josipovic N, Mizi A, Nielsen CF, Wagner EM, Takeda S, Sasanuma H, et al	4. 巻 75
2. 論文標題 Spatial Chromosome Folding and Active Transcription Drive DNA Fragility and Formation of Oncogenic MLL Translocations	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 267 ~ 283.e12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molcel.2019.05.015	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

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 笹沼博之
2. 発表標題 難治性DNA損傷とその修復の分子機構
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹沼博之
2. 発表標題 難治性DNA損傷がもたらす疾患発症の分子機構
3. 学会等名 難病のプロテオ医学2020 『Cell Growth, Replication Stress and Genomic Instability in Cancer』 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroyuki Sasanuma
2. 発表標題 A novel role of BRCA1 in the repair of estrogen-induced pathological topoisomerase II-DNA complex
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 笹沼博之
2. 発表標題 DNA二重鎖切断末端の付加体の除去はいかにして行われるか？
3. 学会等名 核酸代謝鶴岡カンファレンス（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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