

令和 5 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04269

研究課題名（和文）DNA2本鎖切断修復制御の中核となるユビキチン依存的DNA損傷応答の解明

研究課題名（英文）Elucidation of Ubiquitin-Dependent DNA Damage Response as the Core Mechanism for Double-Strand Break Repair

研究代表者

中田 慎一郎（Shinichiro, Nakada）

大阪大学・高等共創研究院・教授

研究者番号：70548528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,300,000円

研究成果の概要（和文）：DNA2本鎖切断（DSB）は、放射線被曝などによって引き起こされるDNA損傷である。適切にDNA修復を受けないと致死的な障害となる。ユビキチン依存的な経路は、DSBの検出と修復をつなぐ重要なシグナル伝達経路である。本研究では、本経路で機能する新規遺伝子Xを発見した。遺伝子Xの発現を抑制すると、ユビキチン依存的な経路の下流でDSB修復経路選択に関与する遺伝子53BP1（非相同末端結合誘導因子）がDSB部位に過剰に集積し、一方で、BRCA1（相同組換え誘導因子）の集積は減少した。さらに、相同組換え過程のシグナリングは弱まり、相同組換えの効率も低下することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DSBは通常の細胞代謝では起こりにくいものの、わずかな残存が致死となることや、遺伝子変異やゲノム構造異常を誘導する、非常に危険なDNA損傷である。細胞内ではDNA一本鎖切断が多発し、これが複製を経てDSBに変換され、相同組換えにより修復される。相同組換えに関わる遺伝子はゲノムの恒常性維持に必須であり、新規遺伝子の発見の意義は高い。また、遺伝子Xの発現抑制は、抗腫瘍薬として利用されているPARP1阻害剤への感受性を増強するというデータも得られている。本研究の発見は、DNA損傷を利用した抗がん戦略としての発展的な利用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：DNA double-strand breaks (DSBs) are DNA damages caused by events such as exposure to radiation. Failure to properly repair DNA can result in lethal damage. The ubiquitin-dependent pathway is an important signaling pathway that connects DSB detection and repair. In this study, we discovered a novel gene X that functions in this pathway. When the expression of gene X is suppressed, 53BP1 (non-homologous end joining inducer), which is involved in DSB repair pathway choice downstream of the ubiquitin-dependent pathway, excessively accumulates at the DSB site, while the accumulation of BRCA1 (homologous recombination inducer) decreases. Furthermore, the signaling of the homologous recombination process weakens, and the efficiency of homologous recombination also decreases, as demonstrated by these results.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA2本鎖切断 相同組換え DNA損傷 PARP阻害剤 DNA修復選択

1. 研究開始当初の背景

放射線照射により発生する DNA2 本鎖損傷 (DNA double strand break : DSB) は致命的な DNA 損傷である。核内に発生した DSB は速やかに検出され、その情報が伝達され、修復される。この一連のシグナリングは DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) と呼ばれる。

ユビキチン化はリン酸化と並び、DDR を司る中心的な翻訳後修飾である。E3 ユビキチンリガーゼ RNF8 および RNF168 による DDR の発見 (報告者: Science 2007, Cell 2009) 以降、ユビキチン依存的 DDR の役割や分子機構が世界中で精力的に研究されてきた。多くの研究成果は、(1) RNF8・RNF168 依存的に DSB にリクルートされるタンパク複合体が、相同組換え修復 (Homologous Recombination: HR) のファーストステップである DNA end resection を抑制し、非同末端結合 (Non Homologous End Joining: NHEJ) を促進する機構、そして (2) HR 開始のために DNA end resection 抑制を解除する機構に集約される。つまり、RNF8-RNF168 依存的 DDR は DSB 修復制御における中核である。

ここ約 10 年間に様々な研究成果が発表されてきたにもかかわらず、RNF8-RNF168 依存的な DDR には、いくつかの根本的な謎が未解明のまま残されており、分子機構の一部は「予想」や「論議中」の段階にとどまっている。このため、ユビキチン化依存的 DDR の全体像を把握することが困難になっている。

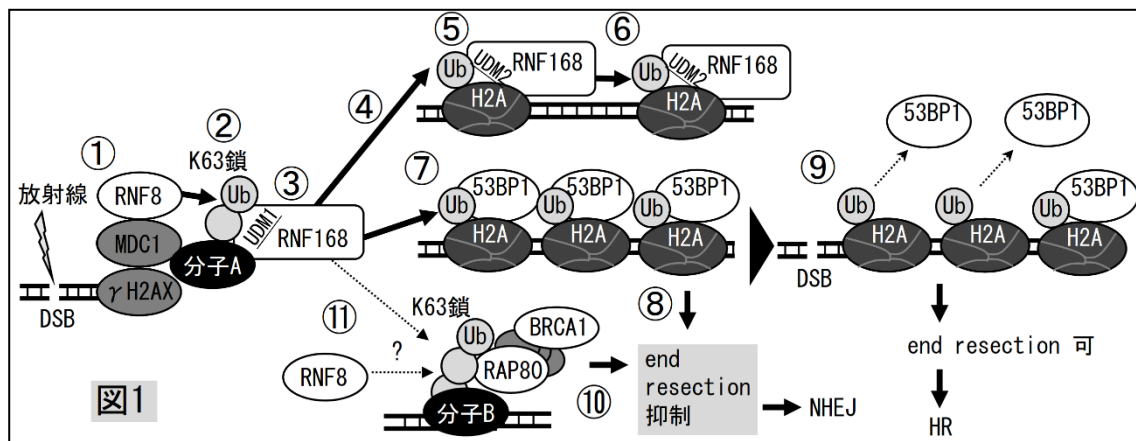
2. 研究の目的

本研究では、既存研究における未解明事項の解明に取り組むことで、RNF8-RNF168 依存的 DDR の真のシグナリング機構を解明することが目的であった。また、これを介して、DSB 修復がどのように制御されるかについて、より詳細な知見を得ることを目的としていた。

3. 研究の方法

当初計画していた研究手法；

研究開始時における RNF8-RNF168 依存的 DDR のうち根幹部分のシグナル・DNA 修復制御のモデルは以下のものであった (図 1)。



ユビキチン依存的 DDR は、DSB 近傍に集積したリン酸化 MDC1 への RNF8 の結合により開始する (①)。RNF8 はリジン 63 (K63) 結合型ユビキチン鎖 (K63 ユビキチン鎖) を「分子 A」に連結する (②)。K63 ユビキチン鎖とは、ユビキチン分子の K63 に別のユビキチン分子が共有結合して鎖状となったものである。有名な K48 ユビキチン鎖と異なり、タンパク分解を誘導しない。K63 ユビキチン化された分子 A には RNF168 が結合する (③)。結合には、2 つあるユビキチン結合モジュール UDM のうち K63 ユビキチン鎖に特異的結合能を持つ UDM1 を用いる。続いて RNF168 はヒストン H2A の K15 をユビキチン化 (H2A-K15Ub) する (④)。そして、別の RNF168 分子が H2A-K15Ub に結合する (⑤)。この結合には、K63 ユビキチン鎖に特異性が低い UDM2 を用いる。H2A-K15Ub に結合した RNF168 は、別のヒストン H2A をユビキチン化する (⑥)。⑤⑥の繰り返しにより、RNF168 は H2A-K15Ub 領域を広げる。拡大した H2A-K15Ub 領域には 53BP1 が結合する (⑦)。一部の 53BP1 は Shieldin 複合体を形成し、DSB を DNA end resection から保護する (⑧)。HR 開始時には、53BP1 は DSB に隣接した領域からは排除され、end resection が行われる (⑨)。RAP80

は「分子 B」上の K63 ユビキチン鎖に結合し (⑩)、本来 DNA end resection 促進に働く BRCA1 を DSB 断端から隔離して end resection を抑制する。分子 B の K63 ユビキチン化は RNF8・RNF168 に依存性である。

このモデルにおいて、例えば図 1③~⑥では、UDM1 により RNF168 の初期の DSB 局在が (③)、UDM2 により拡大した H2A-K15Ub 領域への結合が行われる (⑥) とされている。しかし、実際には UDM1 欠損 RNF168 は DSB に局在し、UDM2 欠損 RNF168 は DSB に局在しない。このような矛盾点を申請者らの知見、UDM2 に K63 ユビキチン鎖特異的結合能があること (Nat Commun 2018) などを手がかりとして、解消できるのではないかと考えた。

私たちの目指すところは、これらの経路において未解明の部分や関与する分子を明確にすることである。しかし、この経路は遺伝子のノックダウンや、発現ベクターを用いた遺伝子変異体の機能解析といった一般的な研究手法に対する障壁が存在する。具体的には、③、④、および⑩の経路が問題となる。これまでの我々の研究では、RNF168 が DNA 損傷部位に過剰に集積すると、本来必須であるはずの経路がバイパスされてしまうことが明らかになっている。また、RNF8→RNF168→RNF8/RNF168 といったようにシグナルの順番が循環すること、さらに、RNF8 や RNF168 の局在に関わる分子が複数存在することも示唆されている。さらに、DSB が存在する領域毎に DNA 修復経路の選択が異なり、解析結果が様々な現象が混在した状態として得られてしまう。これらのことが、解析を難しくしている。そこで、我々は宇井らが以前発表 (Ui et al Mol Cell 2015) した TRE-TetR システム (U2OS 細胞のゲノムに TRE をタイル上に並べた領域に TetR を融合したタンパクをテザリングするシステム) を利用し、DNA 損傷が存在しない状態で RNF8 や RNF168 を特定ゲノム領域に集積させ、これにより発生する応答から DNA 損傷応答の詳細を解明しよう考えた。一過性発現系では良好な結果が得られた。しかし、一過性過剰発現の影響が発生しない RNF8 安定発現系を樹立することができなかつたため、前述の障壁を打ち破る研究を展開することが困難となった。

そこで、実験手法を変更し、ユビキチン依存性 DNA 損傷応答経路の下流で機能する分子を予想し、その機能を研究することで上流に遡る手法をとることとした。Bio Grid (<https://thebiogrid.org>) より、RNF8 に結合することが報告されているが、まだ RNF8 経路での機能が未解析な因子を 27 因子抽出した (図 2、結合する遺伝子をカラーで示した。ただし、遺伝子名は示していない)。

抽出した因子の中から、文献検索において、DNA 損傷応答やユビキチン経路に関与することが示唆されており、かつ、その DSB 応答における機能が未解明となっている遺伝子を 9 つを抽出した。それらの遺伝子を、siRNA を用いてノックダウンし、DNA 損傷応答因子の局在変化や DNA 修復に与える影響を解析した。

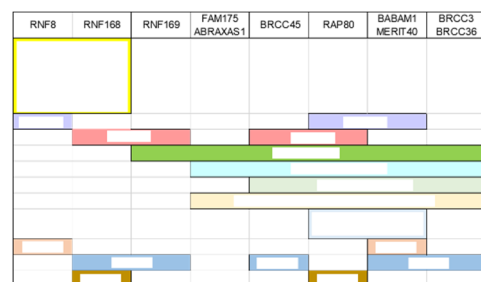


図2. RNF8-RNF168経路に関する遺伝子

4. 研究成果

1) 一過性発現による RNF8 テザリング実験系の検証

特定のクロマチンに RNF8 をテザリングさせるために、TetR と蛍光物質 Cherry のついたプラスミドを作成した。このようなプラスミドを、TRE サイトを約 200 コピーほどゲノムに持つ細胞にトランスフェクションした。約半日~1 日後、プラスミドの遺伝子が発現を確認した後に、固定を行い、そのクロマチン部位に結合するタンパク質、あるいはヒストン修飾因子などを免疫染色で検出した。その結果、下記の図 3 のように RNF8 経路のシグナルに関わる因子 (RAP80、BRCA1、RNF168 等) が RNF8 をテザリングした領域に集積した (赤のドットと緑のドットが一致する)。RNF8 の E3 ユビキチンリガーゼ活性を欠失させた C403S の場合には、RAP80 や RNF168 の集積は認められなかった。DSB 発生時に RNF8 は FHA ドメインを用いてリン酸化 MDC1 に結合する。FHA ドメインの変異体 R42A

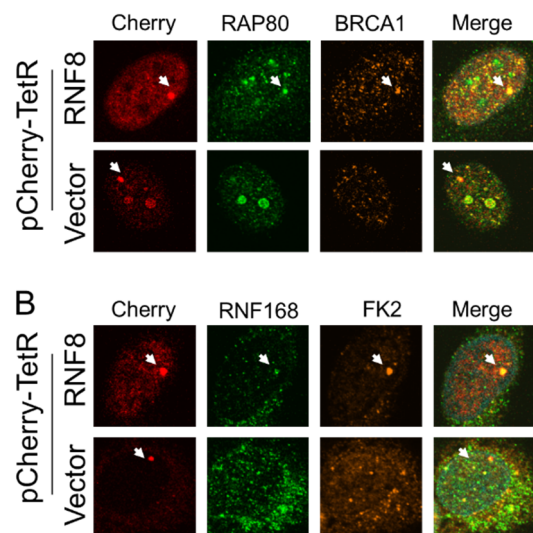


図3. RNF8のテザリング実験の結果

は MDC1 に結合できないが、RNF8^{R42A} をテザリングしても、RAP80 や RNF168 の集積は観察された。これら実験より、DSB を発生させなくても、RNF8 をテザリングさせるだけでユビキチン依存性経路を活性化できることが示された。RNF168 のテザリングもおこなった。さらに細胞周期を同調（相同組換えは S 機構期から G2 期にのみ機能すると考えられるため、細胞周期毎の解析が重要な意味を持つ）、した上で、さらに解析を進め、細胞周期により変動のある因子と影響を受けない因子を明らかにした。

2) RNF8 恒常発現テザリング実験系。

一過性発現系が機能することが実証できたため、次に Cherry の後に RNF8 を融合させたプラスミドを安定発現細胞の作成を試みた。RNF8-RNF168 経路は過剰発現による非特異的応答が認められることがわかっており、この実験系の樹立は必須であった。条件を変更しつつ、複数の実験者が繰り返し、安定発現細胞株の樹立を試みたものの、最終的に樹立には至らなかった。この系の樹立が今後の実験系の根本となるため、テザリングシステムの利用を断念し、根本的な実験方法の見直しを行った。このため 2) の方法は断念した。

3) データベースからの候補遺伝子の抽出と相同組換え活性の測定

研究の方法で記載した方法により、候補遺伝子を選定した。相同組換え (HR) 頻度測定のス

タンドである DR-GFP アッセイにより、HR 頻度を測定した。DR-GFP 細胞に各遺伝子に特異的な siRNA を個々に導入した後、制限酵素 I-sceI 発現ベクターを導入し、HR により GFP 陽性となった細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて解析した。siRNA の導入により HR 活性が低下した遺伝子は複数存在した (図 4)。本研究では、遺伝子 X (仮称) に着目し、研究を進めることとした。

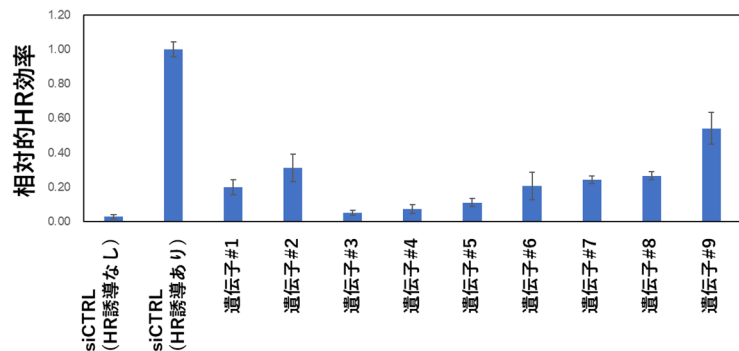


図4. DR-GFP assayによるHR活性の測定

4) 遺伝子 X が HR および NHEJ に与える影響

遺伝子 X に対する siRNA の種類を増やし、遺伝子 X ノックダウン時の DSB 修復における HR および NHEJ 使用頻度を解析した。利用した siRNA すべてで HR は低下、NHEJ は上昇することが示され、遺伝子 X は HR 促進、NHEJ 抑制に機能する遺伝子であることが示唆された。

5) 遺伝子 X が BRCA1 および 53BP1 の DSB 集積に与える影響

BRCA1 および 53BP1 の DNA 損傷部位への局在に関して、遺伝子 X のノックダウンにより発生する影響を検証した。BRCA1 および 53BP1 は RNF8-RNF168 に

依存的に DNA 損傷部位に局在する因子として知られている。遺伝子 X をノックダウンした細胞では、BRCA1 の DSB への局在は減弱した。一方、53BP1 の DSB への局在は増強した (図 5)。53BP1 は HR 抑制因子として知られており、DR-GFP アッセイと相容れる結果となった。

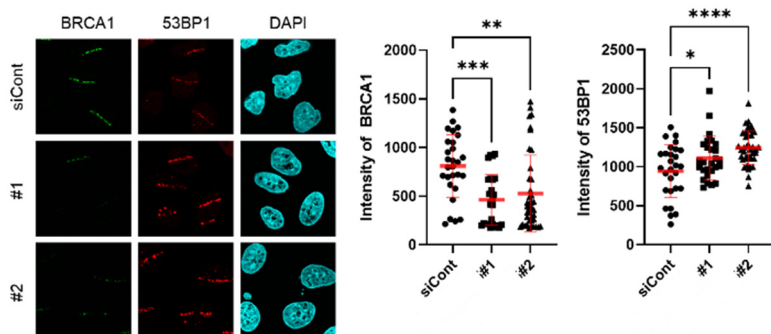


図5. BRCA1と53BP1のDSB結合に対する影響

6) 遺伝子 X の DNA end resection、PARP 阻害剤感受性への影響

これらの結果から、遺伝子 X は 53BP1 の DSB 部位への局在を抑制することで、HR を促進すると予想した。53BP1 の HR 抑制機構の一つは、HR に必須である DNA end resection (DNA 断端において、3' 端の 1 本鎖 DNA を露出させる機構) の抑制である。そこで、遺伝子 X のノックダウンが与える、DNA end resection への影響を解析した。その結果、遺伝子 X ノックダウン細胞では、RPA リン酸化が減弱していることが示された。RPA は end resection により露出した 1 本鎖 DNA に結合し、その後リン酸化を受ける。このことから、遺伝子 X のノックダウンにより DNA end resection が抑制されることが示唆された (図 6)。さらに、遺伝子 X 発現抑制細胞は PARP 阻害剤であるオラパリブへの暴露により生存率が低下した。

以上の結果より、遺伝子 X は 53BP1 の DSB への局在を抑制することにより、DNA end resection を促進し、HR による DNA 修復を起しやすくしていると考えられた。

本研究は、論文として未発表であるため、遺伝子名、その遺伝子の特徴などを明示することができない。しかし、遺伝子 X が持つ機能を勘案すると DSB 応答におけるユビキチン化依存性経路に機能する可能性は非常に高いと考えられる。推定される標的分子との結合やその標的分子に発生する翻訳後修飾に対する遺伝子 X の直接・間接的影響を解析することにより、ユビキチン依存的 DSB 経路による DNA 修復制御の詳細が明らかにできると期待できる。

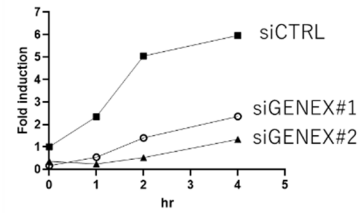


図6. DNA end resectionに対する影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件）

| |
|---------------------------------|
| 1. 発表者名 中田慎一郎、富田亜希子 |
| 2. 発表標題 マルチプルニックによる相同染色体間組換え |
| 3. 学会等名 日本分子生物学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Shinichiro Nakada, Akiko Tomita, Hiroyuki Sasanuma, Tomoo Ogi |
| 2. 発表標題 Multiple nicks-induced interhomolog homologous recombination corrects heterozygous mutations without DNA double-strand breaks and exogenous DNA |
| 3. 学会等名 日本放射線影響学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Shinichiro Nakada, Akiko Tomita, Hiroyuki Sasanuma, Tomoo Ogi |
| 2. 発表標題 Gene correction by nicks-induced interhomolog recombination and genomic deletion induced by multiple nicks |
| 3. 学会等名 日本ゲノム編集学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2022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 |
|-------|-----------------------------------|---------------------------------|----|
| 研究分担者 | 宇井 彩子 (Ui Ayako) (00469967) | 東北大学・加齢医学研究所・准教授 (11301) | |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|