

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22510059

研究課題名（和文）ユビキチン化による DNA 修復制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of regulatory mechanisms of DNA repair by ubiquitination

研究代表者

茂木 章 (MOTEGI AKIRA)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80452332

研究成果の概要（和文）：

本研究ではユビキチンリガーゼ SHPRH 遺伝子破壊細胞株及び RNF20 遺伝子条件発現抑制株の作製・解析を行った。SHPRH は抗がん剤シスプラチンによる DNA 鎖間架橋損傷の修復に対してユビキチンリガーゼ RAD18 と協調的に作用する。また RNF20 の条件発現抑制によって相同組換え因子 RAD51 の γ 線照射部位への集積が減少したことから、RNF20 は相同組換えによる DNA 二本鎖切断修復を促進すると考えられた。

研究成果の概要（英文）：

I have studied functions of the ubiquitin ligases SHPRH and RNF20 by genetically manipulating those genes in the chicken DT40 cell line. SHPRH/RAD18 double knockout cells showed enhanced sensitivity towards the DNA-crosslinking agent cisplatin, suggesting a cooperative role of SHPRH and RAD18 in repairing DNA crosslinks. Repression of the RNF20 transgene in RNF20-disrupted cells resulted in reduced foci formation of the recombination factor RAD51 after ionizing radiation. Thus, RNF20 may facilitate repair of DNA double strand breaks by homologous recombination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学、放射線遺伝学・化学物質影響科学

キーワード：DNA 修復、複製後修復、相同組換え、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

生物は様々な DNA 損傷を修復する仕組みを複数備えている。鋳型 DNA の損傷によって複製ポリメラーゼの進行が妨げられたと

きに損傷を残したまま複製を再開させる仕組みを複製後修復(post-replication repair; PRR) という。PRR は鋳型乗り越え経路(translesion synthesis; TLS)と鋳型乗り換え経路(template

switch; TS)に大別される。また、相同組換え修復(homology-directed repair; HDR)は鋳型鎖の切断による複製停止を解除するほか、複製期以外の時期に生じた DNA 二本鎖切断を修復する(図 1)。

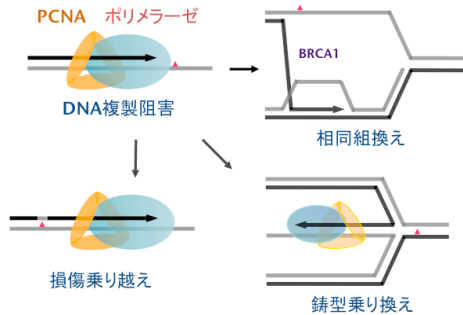


図 1. DNA 複製阻害の解除機構

これらの仕組みが正常に機能しないとがんや遺伝子疾患の原因となる DNA 変異・染色体異常を引き起こすと考えられるため、PRR/HDR の仕組みの解明はがんの発生機序を理解する上で重要である。また代表的な抗がん剤であるシスプラチンは DNA 鎖間架橋損傷を起すことで効果を発揮するが、これらの損傷も PRR/HDR によって修復される。したがって、PRR/HDR による損傷修復の理解はがんの効果的治療を考える上でも重要である。

これまでの我々および他グループの研究からユビキチンリガーゼ SHPRH 及び RNF20 が DNA 損傷応答に関与することが示唆されていたがこれら因子の作用機序の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

そこで本研究ではニワトリ B 細胞株 DT40 を用いてユビキチンリガーゼ SHPRH 及び RNF20 の遺伝子変異細胞株を作製し、その表現型解析を行うことによりこれらの PRR/HR における機能を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- 1)SHPRH 遺伝子破壊 DT40 株を作製し、その機能解析を行った。
- 2)RNF20 遺伝子破壊 DT40 株を作製し、その機能解析を行った。特に本研究によって

RNF20 遺伝子破壊細胞株は致死であることが明らかになったので、テトラサイクリンによる RNF20 発現抑制細胞株を作製し、解析を行った。

4. 研究成果

1)SHPRH 破壊 DT40 株の作製及び機能解析

トリ SHPRH 遺伝子は 1,693 アミノ酸からなるタンパク質をコードする。ヒト SHPRH と 70.9%のアミノ酸が一致し、81.2%が類似のアミノ酸であった(図 2A)。本研究では保存された SWI2/SNF2 サブドメイン I を含むエクソン 5-8 を薬剤耐性マーカーに置換した(図 2B, C)。

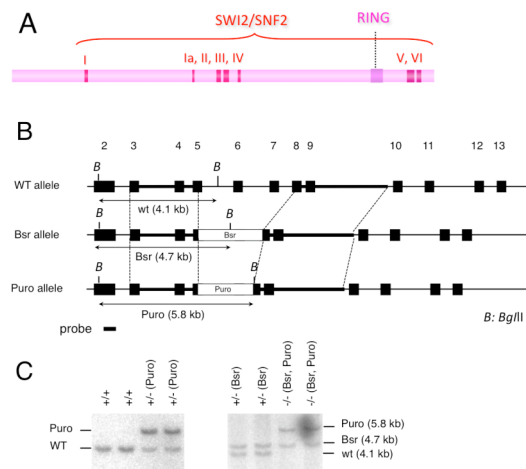


図 2. A. SHPRH タンパク質のドメイン構造
B. SHPRH 遺伝子破壊ベクターの作製
C. サザン法による SHPRH 遺伝子破壊の確認

SHPRH^{-/-}細胞は生存可能で、細胞増殖速度も野生株とほぼ同等であった。また、SHPRH 欠損株の核種 DNA 損傷剤に対する感受性を調べたところ、DNA 二本鎖切断を起す γ 線、DNA 鎖間架橋を起すシスプラチン、紫外線、トポイソメラーゼ I 阻害剤であるカンプトテシン、トポイソメラーゼ II 阻害剤であるエトポシドなどに対して顕著な感受性を示さなかった。これらの結果から SHPRH リガーゼ単独変異では各種 DNA 修復経路に大きな機能低下を起さないと考えられる。

DT40 細胞野生株は、細胞表面イムノグロブリン M(sIgM)遺伝子にフレームシフト変異を持っているため、sIgM を発現していないが、

シュードジーンを鋳型にした相同組換え(ジーンコンバージョン)によって徐々に sIgM 陽性細胞が増加してくる。SHPRH 変異株(2311 及び 2317)ではこの陽性転化が促進されていた(図 3)。またヒストン脱アセチル化酵素阻害剤トリコスタチン A(TSA)はジーンコンバージョンを促進するが、SHPRH 変異株では TSA によるジーンコンバージョンがさらに促進されていた。これらの結果は SHPRH が相同組換えと拮抗する PRR 経路において作用し、PRR の機能低下を相同組換え修復の亢進によって代償しているとの考えに一致する。

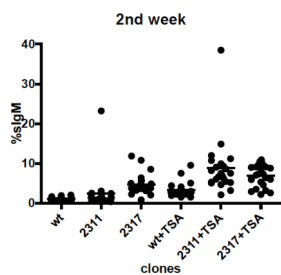


図 3. SHPRH 変異株ではジーンコンバージョンの促進が見られる。

SHPRH 変異細胞株が各種 DNA 損傷に対する顕著な感受性を示さなかったことから、SHPRH は他のユビキチンリガーと重複して PRR 経路を制御している可能性が考えられた。これまでの研究からユビキチンリガー RAD18 が PRR の垂経路 TLS を制御することが知られていたことから、SHPRH との機能的重複を検討するために SHPRH/RAD18 二重遺伝子破壊株を作製した。SHPRH/RAD18 変異株の各種 DNA 損傷に対する感受性を検討した結果、SHPRH/RAD18 変異株は DNA 鎖間架橋剤であるシスプラチンに対して RAD18 単独変異株より強い感受性を示した(図 4)。

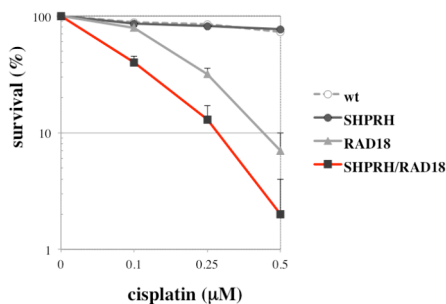


図 4. SHPRH/RAD18 二重変異株のシスプラチン感受性

感受性

この結果から、SHPRH は DNA 鎖間架橋損傷の修復において RAD18 と協調的に働くと考えられた。

これらの結果を踏まえて今後 SHPRH 変異株の表現型解析をさらに行って SHPRH ユビキチンリガーの PRR における機能をさらに明らかにしていく予定である。

2) RNF20 破壊 DT40 株の作製及び機能解析

トリ RNF20 遺伝子は 984 アミノ酸からなるタンパク質をコードし、ヒト RNF20 と 58.2% のアミノ酸が一致、72.9% が類似性を示した(図 5A)。またトリ RNF20 遺伝子は DT40 細胞で一本しかない Z 性染色体上に位置することから RNF20 遺伝子は DT40 細胞には 1 アレルしかないと考えられた。遺伝子破壊ベクターは N 末端側約半分を占める保存された Smc ドメインの一部をコードするエクソン 7-9 と 10 の一部を薬剤耐性マーカーに置換するよう設計した(図 5B)。サザン法によって 100 クローン以上のスクリーニングを行ったが、変異株が得られなかったことから RNF20 遺伝子は生存または増殖に必須である可能性が強く示唆された。

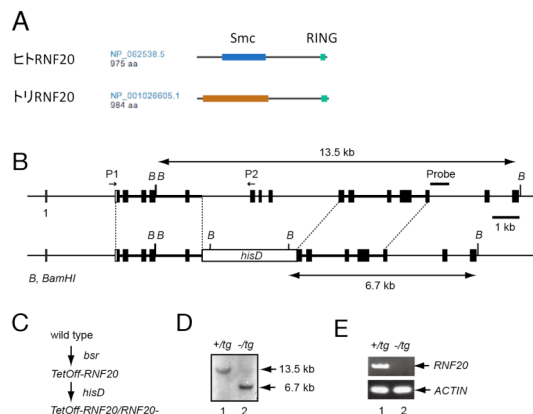


図 5. A. RNF20 タンパク質のドメイン構造 B. RNF20 遺伝子破壊ベクターの作製 C. TetOff-RNF20 細胞株の作製手順 D. サザン法による遺伝子破壊の確認 E. RT-PCR による遺伝子破壊の確認

そこでテトラサイクリンによって発現抑

制される RNF20 トランスジーンを発現する細胞株を作製し、その後には内在性の RNF20 遺伝子破壊を試みた(図 5C)。その結果、8%の効率で遺伝子破壊細胞株が得られた(図 5D, E)。RNF20+/tg 細胞株の増殖速度はドキシサイクリンの有無によって影響を受けなかったが(図 6A)、RNF20-/tg 細胞株(クローン A23)はドキシサイクリン添加によって細胞増殖がほぼ完全に抑制された(図 6B)。このことから RNF20 は細胞の増殖に必須であることが明らかとなった。

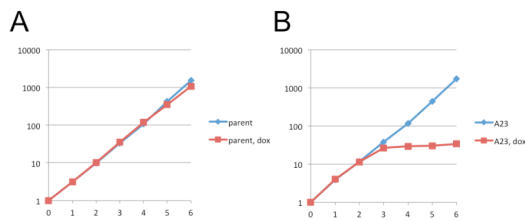


図 6. RNF20 遺伝子発現抑制細胞の増殖速度
Dox: ドキシサイクリン

RNF20 の相同組換え修復へ寄与を検討するために、RNF20 発現抑制 3 日後に 4 Gy の γ 線を照射し、1 時間後に主要な組換え修復因子である Rad51 の免疫染色を行った。RNF20-/tg 細胞株 A23 は、ドキシサイクリン処理なしの場合 γ 線照射後に野生株(クローン 2520)に比べ約半分の Rad51 フォーカスを形成したが、ドキシサイクリン処理後はその数がさらに半数以下に低下した(図 7)。

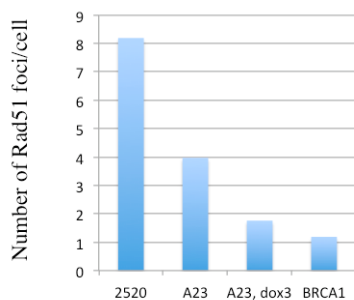


図 7. RNF20 発現抑制細胞株の Rad51 フォーカス形成能の比較

このことから RNF20 は γ 線照射により生じた DNA 二本鎖切断を相同組換えによって修復する過程を促進すると考えられた。

今後、本研究で作製した変異株の表現型解析をさらに進めることで SHPRH 及び RNF20 の

DNA 修復における働きを明らかにする予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

1. Motegi A, Takata M, Multiple genetic manipulations of DT40 cell line. Methods in Molecular Biology in press, 査読なし
2. Era S, Abe T, Arakawa H, Kobayashi S, Szakal B, Yoshikawa Y, Motegi A, Takeda S, Branzei D. The SUMO protease SENP1 is required for cohesion maintenance and mitotic arrest following spindle poison treatment. Biochem Biophys Res Commun. 426: 310-6 (2012) 査読あり
3. Germann SM, Oestergaard VH, Haas C, Salis P, Motegi A, Lisby M. Dpb11/TopBP1 plays distinct roles in DNA replication, checkpoint response and homologous recombination, DNA Repair 10:210-224 (2011) 査読あり
4. Hirota K, Sonoda E, Kawamoto T, Motegi A, Masutani C, Hanaoka F, Szuts D, Iwai S, Sale JE, Lehmann A, Takeda S. Simultaneous disruption of two DNA polymerases, Pol η and Pol ζ , in avian DT40 cells unmasks the role of Pol η in cellular response to various DNA lesions. PLoS Genet. 6: e1001151 (2010) 査読あり

[学会発表] (計 1 件)

1. 足立淳、鳴海良平、佐野聖三、久家貴寿、白水崇、松本雅記、中山敬一、茂木章、井倉毅、高田穰、朝長毅:「DNA 損傷応答ネットワークにおけるリン酸化・ユビキチン化修飾ダイナミクスのプロテオーム解析」第 33 回日本分子生物学会年会 神戸市 2010 年 12 月 7-10 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 章 (MOTEGI, AKIRA)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80452332

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし