

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 4 月 10 日現在

機関番号：22604

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2012

課題番号：22687001

 研究課題名（和文） プロテオミクスと遺伝学の融合によるクロマチン-DNA修復の
クロストークの解明

 研究課題名（英文） Analysis of DNA repair pathway by the combination of proteomics and
genetic approach

研究代表者

廣田 耕志 (HIROTA KOUJI)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：00342840

研究成果の概要（和文）：

本研究では、遺伝学手法とプロテオミクス手法を SILAC と呼ばれる方法で融合させた新しいアプローチを用いた。この方法で、網羅的蛋白質比較を野生型細胞—変異型細胞間で行い、これまで未知であったユビキチン化経路の全貌を解明した。本研究成果は、高齢化が進む今日にあって集中的研究が必要とされるがん治療分野で大きく役立つ知見である。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we analyzed ubiquitylation signal pathway in DNA repair using the combination of proteomics and genetic approach. Our data figure out novel ubiquitin signal pathway, which is useful seeds targets for cancer chemotherapy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,000,000	2,100,000	9,100,000
2011年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
2012年度	6,300,000	1,890,000	8,190,000
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA修復、DNA損傷応答、クロマチン、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の翻訳後修飾の一つ、ユビキチン化はDNA損傷応答に中心的役割を果たす事が知られている。しかし、ユビキチン化シグナル経路は未解明でありどのようなメカニズムでDNA修復を促進しているのかわかっていない。我々は、系統的に蛋白質ユビキチン化酵素の遺伝子破壊を行い、それぞれの酵素はDNA損傷のタイプ（UVによるキズ、放射線による断裂などなど）ごとに、各酵素は共同して機能したり、独立に機能したり様々な働き方をし

ている事を見つけている（論文投稿中）。昨今の研究で、ユビキチン化シグナル経路によるクロマチン構造制御により、DNA修復が促進されているという仮説が提唱されている。この仮説では、ユビキチン化経路によって、クロマチンを構成するヒストン蛋白質がユビキチン化修飾され、DNA修復因子が働ける環境を形成する事で修復反応を促進していると考えられている。一方、DNA修復に関与する蛋白質が直接にユビキチン化を受け、

クロマチンへ動員されるように制御されている例も多数知られている。しかし、ユビキチン化酵素は多数同定され、そのゲノム安定維持における機能が解明される一方、各酵素の基質分子が未解明である故に、ユビキチン化経路は未解明のままであった。

2. 研究の目的

ゲノムの安定維持機構における、ユビキチン化シグナル経路とクロマチン-DNA修復のクロストークを探索する目的で、次世代質量分析SILAC法をもちい、遺伝学とプロテオミクスを融合させた。本研究では、この新しいアプローチで、DNA損傷時にユビキチン化シグナル経路によってクロマチンへ動員される蛋白質群の網羅的に探索した。

3. 研究の方法

本研究では、プロテオミクスアプローチSILACを用いてユビキチン化シグナル経路の解明を行った。ユビキチン化したペプチドをジグリシルリジン抗体 (clone GX41) を用いて濃縮した。濃縮したタンパク質複合体を質量分析により網羅的に同定した。このとき、遺伝学手法を導入したのである。すなわち、野生型と変異体をSILACにより標識し分けることで、同定したタンパク質が、野生型または変異体のどちらに由来するかを見分けることが出来るのである。本研究では、**UBC13, RNF4, RNF8, RNF168, RNF168, RAD18, BRCA1** の7種のユビキチン化酵素の標的経路因子の探索を行い、ユビキチン化シグナル経路タンパク質の網羅的解明を行った。

4. 研究成果

本研究結果で、上記の7種のユビキチン化酵素の基質蛋白質のテーブルを描き出す事に

成功した。各タンパク質が実際にユビキチンのターゲットとなっているのか検討し、本研究手法が正しい結果を導く事も確認できた。RNF4 に関して、決定した基質蛋白質と *RNF4* の遺伝子破壊を行ったり、遺伝学的関係を調べたりし、ゲノムの安定維持に必須の機構である事も見つけている (Hirota et al. 論文投稿中, 2012 学会発表)。

UBC13, RAD18, RNF8, の酵素に関して、各遺伝子破壊細胞の表現型の比較から、それぞれの酵素はDNA損傷のタイプなどの作用する状況によっては、協調的に働く事もあるし、相補的關係となる事もあり、複雑である事を見いだしている。単離した基質蛋白質が大きくオーバーラップしない事から、それぞれが独自に働きうるという、我々の仮説は本研究で行った質量分析により支持された (Kobayashi et al. 論文投稿中)。

ユビキチン化経路はDNA修復の重要な経路であり、その経路の中身が本研究で理解できた意義は大きい。近年DNA修復酵素阻害型の抗がん治療薬が注目を集めている。本研究で見いだした、ユビキチン化経路の構成因子群にはその阻害ががん細胞の増殖阻害を引き起こすなどの、抗がん効果を発揮する可能性が高く、臨床応用に資する知見である。今後薬品スクリーニングのためのプラットフォームを作り、社会還元に向けて研究を継続します。

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 15 件)

(1) Mutant cells defective in DNA repair pathways provide a sensitive high-throughput assay for genotoxicity. T. J. Evans, K. N. Yamamoto, K. Hirota and S.

Takeda, *DNA repair* **9**, 1292-1298 (2010).

(2) Simultaneous disruption of two DNA polymerases, Poleta and Polzeta, in Avian DT40 cells unmasks the role of Poleta in cellular response to various DNA lesions. **K. Hirota**, E. Sonoda, T. Kawamoto, A. Motegi, C. Masutani, F. Hanaoka, D. Szuts, S. Iwai, J. E. Sale, A. Lehmann and S. Takeda, *PLoS genetics* **6**, (2010).

(3) DNA polymerases nu and theta are required for efficient immunoglobulin V gene diversification in chicken. M. Kohzaki, K. Nishihara, **K. Hirota**, E. Sonoda, M. Yoshimura, S. Ekino, J. E. Butler, M. Watanabe, T. D. Halazonetis and S. Takeda, *The Journal of cell biology* **189**, 1117-1127 (2010).

(4) Human replicative DNA polymerase delta can bypass T-T (6-4) ultraviolet photoproducts on template strands. T. Narita, T. Tsurimoto, J. Yamamoto, K. Nishihara, K. Ogawa, E. Ohashi, T. Evans, S. Iwai, S. Takeda and **K. Hirota**, *Genes Cells* **15**, 1228-1239 (2010).

(5) The roles of stress-activated Sty1 and Gcn2 kinases and of the protooncprotein homologue Int6/eIF3e in responses to endogenous oxidative stress during histidine starvation. N. Nemoto, T. Udagawa, T. Ohira, L. Jiang, **K. Hirota**, C. R. Wilkinson, J. Bahler, N. Jones, K. Ohta, R. C. Wek and K. Asano, *Journal of molecular biology* **404**, 183-201 (2010).

(6) GEMIN2 promotes accumulation of RAD51 at double-strand breaks in homologous recombination. Y. Takizawa, Y. Qing, M. Takaku, T. Ishida, Y. Morozumi, T. Tsujita, T. Kogame, **K. Hirota**, M. Takahashi, T. Shibata, H. Kurumizaka and S. Takeda, *Nucleic acids research*, (2010).

(7) KIAA1018/FAN1 nuclease protects cells against genomic instability induced by interstrand cross-linking agents. K. Yoshikiyo, K. Kratz, **K. Hirota**, K. Nishihara, M. Takata, H. Kurumizaka, S. Horimoto, S. Takeda and J. Jiricny, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21553-21557 (2010).

(8) The USP1/UAF1 Complex Promotes Double-Strand Break Repair through Homologous Recombination. J. Murai, K. Yang, D. Dejsuphong, **K. Hirota**, S. Takeda and A. D. D'Andrea, *Molecular and cellular biology* **31**, 2462-2469 (2011).

(9) The Epistatic Relationship between BRCA2 and the Other RAD51 Mediators in Homologous Recombination. Y. Qing, M. Yamazoe, **K. Hirota**, D. Dejsuphong, W. Sakai, K. N. Yamamoto, D. K. Bishop, X. Wu and S. Takeda, *PLoS genetics* **7**, e1002148 (2011).

(10) Characterization of environmental chemicals with potential for DNA damage using isogenic DNA repair-deficient chicken DT40 cell lines. K. N. Yamamoto, **K. Hirota**, K. Kono, S. Takeda, S. Sakamuru,

M. Xia, R. Huang, C. P. Austin, K. L. Witt and R. R. Tice, *Environmental and molecular mutagenesis* (2011).

(11) Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. K. N. Yamamoto, S. Kobayashi, M. Tsuda, H. Kurumizaka, M. Takata, K. Kono, J. Jiricny, S. Takeda and **K. Hirota**, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 6492-6496 (2011).

(12) Purification of the human SMN-GEMIN2 complex and assessment of its stimulation of RAD51-mediated DNA recombination reactions. Tskaku M., Tsujita T., Horikoshi N., Takizawa Y., Qing Y., **Hirota K.**, Ikura T., Takeda S., *Kurumizaka H. *Biochemistry* **32**, 6797-6805 (2011).

(13) A Central Coupler for Recombination Initiation Linking Chromosome Architecture to S Phase Checkpoint. Miyoshi T, Ito M, Kugou K, Yamada S, Furuichi M, Oda A, Yamada T, **Hirota K.** Masai H, Ohta K. *Mol. Cell* **47** (5)722-733 (2012)

(14) Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto K.N, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, **Hirota K.** *PLOS ONE* (2013)

(15) Structure-specific endonucleases Xpf and Mus81 play overlapping but essential

roles in DNA repair by homologous recombination. Kikuchi, K, Narita, T., Van, P.T., Iijima, J., **Hirota, K.**, Keka, I.S., Mohiuddin, Okawa, K., Hori, T., Fukagawa, T., Essers, J., Kanaar, R., Whitby, M.C., Sugawara, K., Taniguchi, Y., Kitagawa, K., and Takeda, S. *Cancer Research*, 2013.

[学会発表] (計 3 件)

(1) 第 69 回日本癌学会学術総会 (大阪)

2010年9月22日 **廣田耕志**

‘DNA ポリメラーゼ δ による AP 部位の損傷乗越え’ (招待講演)

(2) 第 34 回日本分子生物学会 (横浜) 2011年12月15日

The involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. (**Kouji Hirota** at al.) (招待講演)

(3) 第 35 回日本分子生物学会 (博多) 2012年12月14日

SUMO-targetted Ubiquitin Ligase RNF4 Guards Genome Stability by suppressing error-prone Homologous Recombination (**Kouji Hirota** at al.) (招待講演)

[図書] 計 3 件)

(1) 基礎の基礎 細胞工学 (2010 年) 29-(1)14-20 **廣田耕志**、武田俊一

(2) シスプラチン耐性の分子機構 医学の歩み (2011) 239(4) 302-304 **廣田耕志**、武田俊一

(3) 血液内科領域における抗腫瘍薬の作用機序・副作用に基づく使い分け シスプラチン

耐性の分子機構 月刊血液内科 (2012)
65(4)498-503 笹沼博之、廣田耕志、武田俊

一

[その他]

ホームページ等

プレスリリース発表 2013 4/4

DNA が切れていないのに発生する染色体断裂
の発見ーヒトの被爆線量を測定する手法に
異議ありー

http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2013/130404_1.htm

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 耕志 (Hirota Kouji)

首都大学東京・大学院理工学研究科・教授

研究者番号：00342840

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし