

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82502

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26281026

研究課題名(和文) 非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾を介したゲノム障害応答の制御機構解明

研究課題名(英文) Mechanism of genomic DNA damage response mediated by acetylation of non-histone proteins

研究代表者

安田 武嗣 (YASUDA, Takeshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・主任研究員(定常)

研究者番号：60332269

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、試験管内でp300とCBPによってアセチル化される複数の非ヒストンタンパク質を発見した。これらの中で、ヒトの相同組換え(HR)に関わるRAD52は、DNA二重鎖切断(DSB)部位で、p300/CBPによりアセチル化された。RAD52の13箇所のアセチル化部位を同定した。アセチル化されないRAD52は、最初はDSB部位に集まるが、途中でDSB部位から離れた。また、RAD52がアセチル化されないと、RAD51がDSB部位から途中で解離し、HRが阻害された。さらに、RAD52のアセチル化がATMシグナルとリンクしていた。このように、RAD52のアセチル化がHRに重要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：We newly identified several non-histone proteins involved in DNA damage response, which are acetylated by p300 and CBP histone acetyltransferases in vitro. Among the identified acetylated proteins, we showed that p300/CBP acetylate RAD52, a human homologous recombination (HR) DNA repair protein, at DNA double strand break (DSB) sites. We identified 13 acetylation sites in RAD52. We revealed that non-acetylated RAD52 initially accumulates at DSB sites, but dissociates prematurely from them. In the absence of RAD52 acetylation, RAD51, which plays a central role in HR, also dissociates prematurely from DSB sites, and hence HR is impaired. Furthermore, we demonstrated that the acetylation of RAD52 is linked to ATM signaling. Our findings clarify the importance of RAD52 acetylation in HR.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷応答 アセチル化 脱アセチル化 DNA相同組換え RAD52 p300 CBP RAD51

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ヒストンアセチル化酵素 (HAT) によるヒストンタンパク質のアセチル化修飾は、遺伝子発現の制御などに重要であることが知られている。DNA 損傷応答においても、ヒストンのアセチル化修飾によるクロマチンの構造変換が、DNA 修復に重要であることが明らかになりつつある。一方、DNA 修復タンパク質などの非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾の重要性は、他のタンパク質修飾程には、まだ十分には解明されていなかった。そこで、我々は、DNA 損傷応答に関わる非ヒストンタンパク質の中で、精製した p300 および CBP の HAT によって *in vitro* でアセチル修飾を受けるタンパク質を探索した。その結果、新規のアセチル化修飾を受けるタンパク質を複数発見していた。

### 2. 研究の目的

本研究では、我々が新たに同定したタンパク質のアセチル化修飾の役割を明らかにすることが目的である。特に、ヒト RAD52 タンパク質のアセチル化修飾の役割を明らかにすることによって、DNA 二重鎖切断 (DSB) 修復における非ヒストンタンパク質の重要性を解明することが本研究の目的である。

### 3. 研究の方法

#### (1) タンパク質のアセチル化部位同定

*In vitro* の HAT アッセイによりアセチル化させたタンパク質を用いて、質量分析によりアセチル化部位を同定する。

#### (2) アセチル化部位変異遺伝子の作製

同定したアセチル化修飾を受けるリジンを、アセチル化修飾されないがリジンと同様の正電化を持つアルギニンに置換した変異体を作製する。また、アセチル化類似変異体として利用されているグルタミンに置換した変異体についても作製する。

#### (3) アセチル化部位変異体発現細胞の作製

Tet リプレッサーが安定に発現する HEK293 細胞などのヒト培養細胞を用いて、テトラサイクリンにより、FLAG や HA タグなどが付加した野生型やアセチル化部位変異型の遺伝子の発現が誘導する Tet-on 細胞を作製する。また、ヒトの幹細胞を用いた実験では、レンチウイルスを使って、安定発現細胞を作製する。さらに、CRISPR-Cas9 の技術を用いて、内在性のプロモーターにより目的遺伝子が発現するノックイン細胞を作製する。

#### (4) 組換えタンパク質の精製

大腸菌を用いた遺伝子発現系により、野生型とアセチル化部位変異型の組換えタン

パク質を発現させて、カラムクロマトグラフィにより精製する。また、p300 や CBP については、バキュロウイルスを用いた発現系により精製する。

#### (5) 細胞内のアセチル化修飾の解析

アセチル化部位を含むペプチドを用いて、特異的なアセチル化抗体を作製する。アセチル化リジン抗体と、作製した特異的なアセチル化抗体を用いて、ウェスタンブロットあるいは細胞染色により、細胞内でのアセチル化修飾を調べる。

#### (6) 細胞内でのアセチル化変異の影響解析

変異体が安定に発現する様々なヒト培養細胞を用いて、タンパク質の細胞内局在、DNA 修復などの DNA 損傷応答、細胞死などに対して、変異の影響を解析する。

#### (7) タンパク質活性に対する生化学的解析

野生型と変異型の精製タンパク質を用いて、変異によるタンパク質活性への影響を調べる。また、*in vitro* でアセチル化させたタンパク質と非修飾のタンパク質の活性を生化学的に比較することにより、アセチル化修飾による活性への影響を調べる。

#### (8) 脱アセチル化酵素の探索

脱アセチル化 (HDAC) 酵素の組換えタンパク質を用いて、*in vitro* の HDAC アッセイにより、脱アセチル化に関わる酵素を探索する。同定された HDAC が、細胞内での脱アセチル化に関わっているのかについて、siRNA によるノックダウンを用いて調べる。

#### (10) タンパク質間相互作用の解析

精製タンパク質を用いたタンパク質間相互作用の解析について、プルダウンアッセイを行う。また、細胞内タンパク質相互作用の検出には、DSP の架橋剤を用いた *in vivo* クロスリンクを行う。さらに、酵母 two-hybrid 法による  $\beta$  ガラクトシダーゼ活性の測定によりタンパク質間相互作用を定量する。

### 4. 研究成果

#### (1) *In vitro* におけるヒト RAD52 のアセチル化

ヒト RAD52 タンパク質は、*in vitro* で p300 および CBP と特異的に相互作用することにより、これらの HAT によってアセチル化修飾を受けた。質量分析の結果、全部で 13 箇所のアセチル化修飾を受けるリジンを同定した。C 末端側の 3 箇所のアセチル化部位は、核移行シグナル (NLS) 配列の中に存在していた。RAD52 の 11 箇所のアセチル化部位をアルギニンに置換した 11xR 変異体の精製タンパク質は、野生型と同程度の 1 本鎖 DNA 結合活性を示していたことから、複数のアセチル化部位をアルギニンに置換

しても、生化学活性に大きな影響は無いと考えられた。

#### (2) *In vivo*におけるヒト RAD52 のアセチル化

ヒト RAD52 のアセチル化は、細胞内では、DSB により誘導されることが明らかになった。8Gy のガンマ線照射 1 時間後に、細胞内の DSB 部位で、RAD52 のアセチル化が検出された。しかし、照射 6 時間後では、RAD52 のアセチル化が消失していた。したがって、RAD52 は、DSB 部位で一時的にアセチル化が誘導されるが、その後は、脱アセチル化されることがわかった。

DSB 部位で、RAD52 と p300/CBP が共局在していた。また、*in vivo* クロスリンクの実験により、細胞内での RAD52 と p300 及び CBP との特異的相互作用が確認できた。さらに、p300/CBP をノックダウンすると、DSB により誘導される RAD52 のアセチル化が阻害された。以上の結果から、細胞内で、p300/CBP により RAD52 がアセチル化されることが証明できた。

#### (3) DNA や RPA との結合による RAD52 アセチル化修飾の抑制

*In vitro* の HAT アッセイにより、DNA との結合が RAD52 のアセチル化にどのような影響を与えるのかを調べた。その結果、特に DNA 結合に関わる N 末側のドメインが、DNA との結合により、アセチル化修飾が阻害された。C 末側は 1 本鎖 DNA 結合タンパク質複合体の RPA との相互作用に関わる。RAD52 の C 末側半分のアセチル化は、RPA の添加により阻害された。このことから、RPA との相互作用により、C 末側のアセチル化修飾がマスクされると考えられた。

#### (4) SIRT2 と SIRT3 による RAD52 の脱アセチル化

DNA との結合により RAD52 のアセチル化が阻害されるという実験結果を応用して、RAD52 の HDAC を探索する実験を行なった。まず、*in vitro* の RAD52 の HAT アッセイを行なった後、反応溶液に 1 本鎖 DNA を添加することによりアセチル化反応を抑制し、次に、この反応液を分けて、あらゆる HDAC 酵素による HDAC アッセイを行なった。その結果、*in vitro* では、HDAC3、SIRT2、SIRT3 が、RAD52 を脱アセチル化した。次に、これら 3 種類の HDAC の中で、放射線照射後に DSB 部位に集積するものを調べた結果、SIRT2 と SIRT3 だけが DSB 部位に集積した。そこで、siRNA で SIRT2 あるいは SIRT3 をノックダウンして、細胞内での RAD52 の脱アセチル化への影響を調べた結果、これらのノックダウンにより DSB 部位での RAD52 の脱アセチル化が阻害された。したがって、SIRT2 と SIRT3 が、DSB 部位での RAD52 の脱アセチル化に関わることが明らかになった。

#### (5) DSB による ATM の活性化に依存した RAD52 のアセチル化誘導

DSB によるリン酸化を介したシグナル伝達において、ATM キナーゼが中心的な役割を担っている。ATM を阻害すると、RAD52 のアセチル化も阻害され、RAD52 のアセチル化誘導は、ATM の活性化が引き金になっていることが明らかになった。この理由は、ATM が阻害されると、RAD52、p300/CBP、SIRT2、SIRT3 の DSB 部位への集積が阻害されるためであった。

#### (6) RAD52 のアセチル化は、DSB 部位への正常な局在に関わる

RAD52 の NLS を含む 13 箇所のリジンをアルギニンに置換した 13xR 変異体は、核に以降することができず、中心体に集積した。そこで、NLS の 3 箇所のリジン以外の 10 箇所をアルギニンに置換した 10xR 変異体の影響を調べた。10xR 変異体は、放射線照射直後は DSB 部位に集積するが、修復途中で DSB 部位から離れた。同様に、RAD52 の N 末端側に NLS を付加した野生型と 13xR のタンパク質の局在を調べた結果、NLS が付加した 13xR 変異体は核に移行したが、10xR と同様に DSB 部位への正常な局在を示さなかった。

#### (6) RAD52 のアセチル化は、RAD51 の DSB 部位への正常な局在に必要

RAD52 が DSB に集積した後、DNA 相同組換え (HR) において中心的な役割を担う RAD51 タンパク質の DSB への局在が観察される。RAD52 の非アセチル化変異体発現細胞では、RAD51 も、照射後、一時的に DSB 部位に集積していたが、修復途中で DSB 部位から解離していた。一方、RAD52 よりも前の段階で DSB に集積して、1 本鎖 DNA に結合する RPA については、RAD52 のアセチル化が DSB への局在に影響を与えなかった。また、HR に関わる BRCA1 についても、RAD52 のアセチル化が局在に関わっていなかった。

#### (7) RAD52 のアセチル化は、HR に必要

ヒトの HR において、これまで RAD51 の DSB 部位への集積には、主に BRCA2 が関わることがわかっていた。ヒトの RAD52 は、HR にあまり重要でないか、サブ経路で関わっていると報告されていた。一方、通常の細胞の増殖においては、BRCA2 と RAD52 は合成致死になることが報告されていた。そこで、RAD52 の 10xR 変異体発現細胞において、BRCA2 の発現抑制による細胞増殖への影響を調べた。RAD52 の野生型タンパク質発現細胞では、BRCA2 をノックダウンしても、細胞増殖に影響は現れなかったが、RAD52 の 10xR 変異体発現細胞では、BRCA2 の発現抑制により、細胞増殖が抑制された。

DNAの架橋による損傷修復には、HRが必要である。RAD52の10xR変異体発現細胞は、野生型発現細胞よりも、架橋剤であるシスプラチンにより感受性を示したことから、RAD52のアセチル化がHRに関わることが示唆された。実際、いくつかの細胞実験により、RAD52の10xR変異体の発現により、HRが阻害されることを確認した。

(7) アセチル化によるRAD52の活性制御  
アセチル化より、RAD52の活性がどのように変化するのか調べた。その結果、RAD52はアセチル化することにより、1本鎖DNAに対する結合活性が上昇した。また、酵母two-hybrid法による解析の結果、10箇所グルタミン置換した10xQ変異により、RAD52同士の相互作用、および、RAD52とRAD51またはRPAの各サブユニットとの相互作用が上昇した。

(8) RAD52のアセチル化を介したHR修復の分子機構

我々の詳細な解析結果から、RAD52のアセチル化を介した新たなDSB修復機構が明らかになった。RAD52やp300/CBPは、DSB誘導により、ATM依存的にDSB部位に集まり、そこで相互作用してRAD52のアセチル化が誘導される(図1)。DNAやRPAとの相互作用によりRAD52のアセチル化は抑制され、DSB部位に集積したSIRT2とSIRT3によって、脱アセチル化される(図2)。RAD52のアセチル化は、DNAとの結合やHRに関わるRAD51やRPAとの相互作用の制御に必要である。RAD52がアセチル化されない場合は、RAD52と1本鎖DNAやRPA、RAD51との相互作用が上昇しないために、DSB部位から修復途中でRAD52とRAD51が解離してしまい、それによりHRが阻害される。今回の研究成果により、ヒトのHRにおいてRAD52のアセチル化修飾の重要性を初めて明らかにした。また、本研究から、BRCA2の変異が原因である乳ガンなどの治療において、RAD52のアセチル化修飾の阻害が、ガン細胞の増殖抑制に有効であると示唆された。

(9) 今後の展望

本研究では、RAD52以外のアセチル化修飾を受けるタンパク質についても、アセチル化修飾部位の変異がタンパク質の活性に影響を与える結果が得られてきている。また、本研究の過程で、ヒストンシャペロンでのBCNTがアセチル化されることを新たに発見した。さらに、本研究の過程で、当初は予想していなかった、RAD52のアセチル化が引き金となる重要な現象を発見している。このように、本研究をさらに継続して発展させることにより、DNA損傷によって誘導される様々な現象について、非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾の重要性が解明できると期待される。

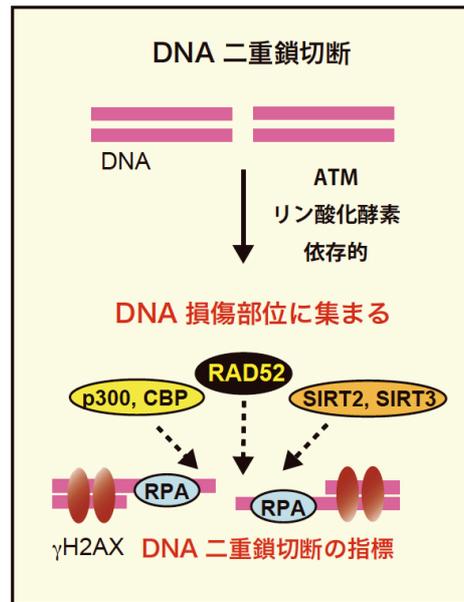


図1. ATMに依存したヒトRAD52のアセチル化修飾

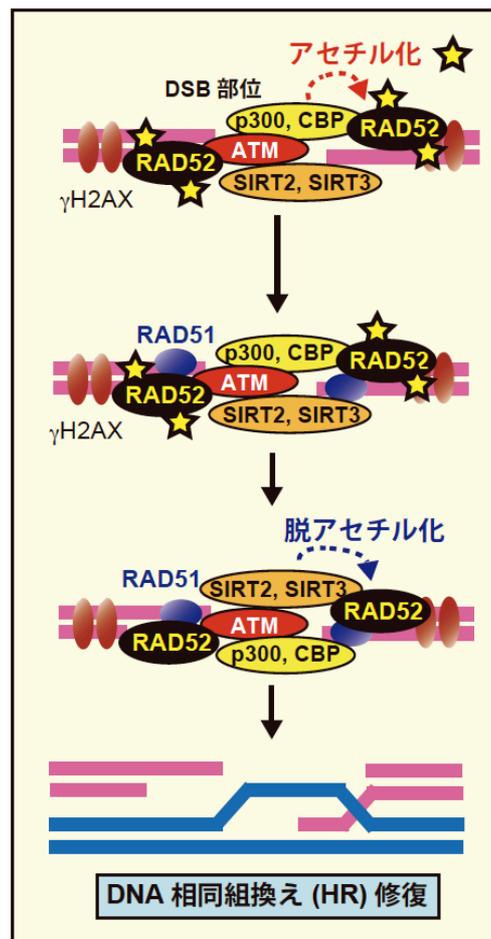


図2. ヒトRAD52のアセチル化を介したDNA相同組換え修復機構

## 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 17 件)

- ① Saotome M, Saito K, Yasuda T, Ohtomo H, Sugiyama S, Nishimura Y, Kurumizaka H, Kagawa W (2018) Structural Basis of Homology-Directed DNA Repair Mediated by RAD52. *iScience* 3: 50-62, DOI:10.1016/j.isci.2018.04.005, 査読有り
- ② Yasuda T, Kagawa W, Ogi T, Kato TA, Suzuki T, Dohmae N, Takizawa K, Nakazawa Y, Genet MD, Saotome M, Hama M, Konishi T, Nakajima NI, Hazawa M, Tomita M, Koike M, Noshiro K, Tomiyama K, Obara C, Gotoh T, Ui A, Fujimori A, Nakayama F, Hanaoka F, Sugasawa K, Okayasu R, Jeggo PA, Tajima K (2018) Novel function of HATs and HDACs in homologous recombination through acetylation of human RAD52 at double-strand break sites. *PLoS Genet* 14: e1007277, DOI:10.1371/journal.pgen.1007277, 査読有り
- ③ Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugasawa K (2017) Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. *Genes Cells* 22: 310-327, DOI: 10.1111/gtc.12479, 査読有り
- ④ Iwashita S, Suzuki T, Yasuda T, Nakashima K, Sakamoto T, Kohno T, Takahashi I, Kobayashi T, Ohno-Iwashita Y, Imajoh-Ohmi S, Song SY, Dohmae N (2015) Mammalian Bcnt/Cfdp1, a potential epigenetic factor characterized by an acidic stretch in the disordered N-terminal and Ser250 phosphorylation in the conserved C-terminal regions. *Biosci Rep* 35, DOI: 10.1042/BSR20150111, 査読有り
- ⑤ Matsumoto S, Fischer ES, Yasuda T, Dohmae N, Iwai S, Mori T, Nishi R, Yoshino K, Sakai W, Hanaoka F, Thoma NH, Sugasawa K (2015) Functional regulation of the DNA damage-recognition factor DDB2 by ubiquitination and interaction with xeroderma pigmentosum group C protein. *Nucleic Acids Res* 43:

1700-13, DOI: 10.1093/nar/gkv038, 査読有り

- ⑥ Matsuzaki-Horibuchi S, Yasuda T, Sakaguchi N, Yamaguchi Y, Akashi M (2015) Cell-permeable intrinsic cellular inhibitors of apoptosis protect and rescue intestinal epithelial cells from radiation-induced cell death. *J Radiat Res* 56: 100-13, DOI: 10.1093/jrr/rru094, 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

- ① 安田武嗣、滝澤和也、田嶋克史 (2017) ヒト RAD52 の脱アセチル化酵素 SIRT2/SIRT3 は DNA 相同組換え修復に関わる, 日本放射線影響学会第 60 回大会
- ② 安田武嗣 (2016) 非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾を介した DNA 損傷応答, 2016 年度国立遺伝学研究所 研究集会「生物ゲノム安定維持の分子機構」
- ③ 安田武嗣, 香川 亘, 荻朋男, 齋藤 健吾, 加藤 宝光, 鈴木 健祐, 堂前 直, 滝澤 和也, 早乙女 (中邑) 愛, 中沢 由華, Matthew D. Genet, 宇井 彩子, 花岡 文雄, 菅澤 薫, 岡安 隆一, Penny A. Jeggo, 胡桃坂 仁志, 田嶋 克史 (2015) ヒト RAD52 のアセチル化を介した相同組換えにおけるアセチル化および脱アセチル化酵素の新規機能の解明, 第 38 回 日本分子生物学会年会
- ④ 安田武嗣, 香川 亘, 齋藤 健吾, 荻朋男, 花岡 文雄, 菅澤 薫, 胡桃坂 仁志, 田嶋 克史 (2014) ヒト RAD52 タンパク質のアセチル化制御, 第 37 回日本分子生物学会

[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]

ホームページ等

プレスリリース

<http://www.qst.go.jp/information/itemid034-004042.html>

Press Release

<http://www.qst.go.jp/ENG/topics/itemid054-004075.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 武嗣 (YASUDA Takeshi)

国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・主任研究員（定常）  
研究者番号：60332269

(2) 研究分担者

荻 朋男 (OGI Tomoo)  
名古屋大学・環境医学研究所・教授  
研究者番号：80508317

(3) 研究分担者

小原 千寿香 (OBARA Chizuka)  
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構・放射線医学総合研究所 放射線障害治療研究部・主任研究員（任常）  
研究者番号：90415977

(4) 研究分担者

増本 博司 (MASUMOTO Hiroshi)  
長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・講師  
研究者番号：80423151