

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：32692

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26740016

研究課題名(和文)白血病の原因となるMLL融合蛋白ENLのDNA二重鎖切断修復の制御機構の解析

研究課題名(英文)Function of MLL fusion partner ENL in DSB repair

研究代表者

宇井 彩子 (UI, Ayako)

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：00469967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ENLはMLLと融合し白血病の原因となる因子であり、転写伸長複合体であるSuper Elongation Complex (SEC)の因子である。本研究ではENLの新規相互作用因子として、転写抑制の機能を持つPRC1複合体のユビキチンE3ライゲースであるBMI1とRING1Bを同定した。さらに転写活性化部位の近傍でDSB (DNA二重鎖切断)が入ると、ATMによりENLがリン酸化されPRC1を転写部位にリクルートすることで、転写抑制に関与することを明らかにした。また、このATMによる転写抑制は近傍のDSB修復を促進しゲノム安定性の維持に重要である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：ENL (MLLT1), a factor of Super Elongation Complex (SEC) and fusion partner of the Mixed-Lineage-Leukemia (MLL) protein, activates transcription. Here we found that ENL interacts with BMI1/RING1B, the E3-ubiquitin-ligase of PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1). After DSB, ENL is phosphorylated by ATM at its well-conserved SQ-sites and increase its interaction with BMI1. Then, ENL recruits Polycomb at transcription sites near DSBs to repress transcription by promoting ubiquitination of H2A. Furthermore, the function of ENL is required for the recruitment of DSB repair proteins at DSB sites near transcription sites and DSB repair. These results suggest that under the control of ATM, ENL recruits PRC1 at transcriptional elongation sites to repress transcription and promotes DSB repair. This mechanism ensures a rapid and systematic transcriptional repression by DSBs to secure cellular homeostasis and genome integrity.

研究分野：分子生物学、DNA修復

キーワード：DNA修復 転写 ポリコーム ENL ATM

1. 研究開始当初の背景

クロマチンの構造変化は、細胞の発生・分化・細胞増殖に必須な転写・DNA複製・DNA修復など、蛋白質・酵素が直接DNAに働きかけるようなイベントにおいて必要である。実際に、クロマチンの構造変化を行うクロマチンリモデリング因子の欠損は、細胞の発生・分化に異常をきたすだけでなく、近年、がん細胞の多くでクロマチンリモデリング因子の変異が見つかってきており、非常に注目を浴びている。このため、クロマチンリモデリング因子の機能解析は、細胞がん化のメカニズムの解明と、がん治療につながると考えられている。

2. 研究の目的

DNA二重鎖切断(DNA double strand breaks; DSB)は細胞にとって致死的であることから、がん治療に応用されている。我々は、DSBに应答するクロマチンリモデリング因子のスクリーニングで、MLLと融合して白血病を引き起こす因子であるENL(MLLT1)を同定していた。ENLはクロマチンリモデリング因子であるSWI/SNFと相互作用すると報告されていると共に、転写促進/クロマチン構造の弛緩を促すTriithorax群と相互作用すると報告されてきた。一方で、研究代表者はENLがTriithorax群とは相反する作用を持つ、転写抑制/クロマチン構造の凝集を促すPolycomb群のPRC1とも相互作用する事を発見した。そこで、ENLのDSB修復における機能とその生物学的意義を明らかにするとともに、PRC1との機能的関連を明らかにすることを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 免疫沈降法により、ENLと

PolycombのユビキチンE3ライゲースであるBMI1/RING1Bの相互作用を明らかにした。放射線によりDSBを誘導した際の結合の変化も明らかにした。さらに、ENLのアミノ酸配列の中にATMにリン酸化されうるSQサイトを見出した。この部位に変異を導入することにより、Polycombとの相互作用が変化を検出した。

(2) 転写を簡便にライブで観察する実験系を導入した。転写部位とI-SceI部位を含むカセットをU2OSに安定的に導入し、tTA-ERを一時的にトランスフェクションすることで、転写を活性化できる。このような細胞で、ENLやPolycombをsiRNAによりノックダウンして、転写への影響を検討した。また、上記のSQ部位に変異を導入した細胞での転写への影響を検討した。

(3) ENLをsiRNAでノックダウンした際に、放射線などのDNA damageに対してどのような効果があるのかを検討した。また、上記のSQ部位に変異を導入した細胞での放射線感受性を検討した。

4. 研究成果

(1) 転写促進因子ENLの相互作用因子として、転写抑制因子Polycomb群のPRC1に含まれるBMI1/RING1BのE3ライゲースを同定した。

ENLの新規相互作用因子を免疫沈降法により検索したところ、Polycomb群のPRC1に含まれるBMI1/RING1BのE3ライゲースを同定した。大腸菌を用いた蛋白精製によるIn vitroの解析により、ENLはBMI1と直接相互作用することが明らかになった。

ENLとPRC1の、転写におけるこれらの挙動と影響を調べるために、細胞内で転写をライブで簡便に可視化できる実験系を用いた。その結果、転写活性化の際には、ENL

は転写活性化と共に転写部位に結合し、転写活性化に関与していた。一方で PRC1 は転写活性化部位にほとんど結合せず、転写活性化に関与していなかった。このことから、従来の説と同様、我々が用いた転写の系でも、ENL と PRC1 は転写活性化においては異なる機能を持つと考えられた。

(2) PRC1 は転写の近傍で DSB が起きると転写部位にリクルートしてくる。

ENL と PRC1 の転写抑制における機能的関連を明らかにするために、下記の二つの方法で転写抑制を引き起こした RNA polymerase II のリン酸化を抑制する DRB を処理することにより転写を抑制する、転写近傍で DSB を起こして転写を抑制する (DSB-induced transcriptional repression)。その結果、ENL は転写活性化と共に転写部位に結合し、**DRB** の処理においても変化なく局在し続けた。一方で、PRC1 は転写活性化と **DRB** の処理の際には転写部位にあまり結合しないが、**DRB** で転写の近傍に DSB が入ると転写部位に結合してくることが明らかになった。

(3) DSB が生じた際に、PRC1 は ENL と ATM に依存して転写部位に結合する。

次に、転写活性化部位への PRC1 の結合が、ENL に依存するのかが上記の転写の実験系を用いて検討した。その結果、ENL ノックダウン細胞では PRC1 の転写部位への結合が減少した。また、転写部位の近傍で DSB が生じた際の転写抑制に ATM が関与しているため、ATM インヒビターにより PRC1 のリクルートを観察した。その結果、ATM インヒビター処理することにより PRC1 の転写部位への結合が減少した。これらの結果から、PRC1 は DSB が生じた際に、ENL と ATM に依存して転写部位に結合することが明らかになった。

(4) DSB が起きた際に、ENL と PRC1 は、転写部位の K119/120-H2A のユビキチン化を促進し、転写抑制を引き起こす。

分化や発生においては PRC1 の RING1B/BMI1 E3 ユビキチンライゲースにより、転写部位の K119/120-H2A がユビキチン化され、転写抑制が起こることが知られている。そこで我々は、DSB が起きた際の転写部位の K119/120-H2A のユビキチン化と転写抑制に、ENL と PRC1 が関与するのかを検討した。その結果、ENL と PRC1 ノックダウン細胞では、DSB が生じた際の転写部位の K119/120-H2A のユビキチン化が減少し、転写抑制が起きないことが明らかになった。この結果から、DSB が起きた際に、ENL と PRC1 は転写部位の K119/120-H2A のユビキチン化を促進し、転写抑制を引き起こすことが明らかになった。

(5) ENL が ATM により保存された SQ-site でリン酸化されると、BMI1 との結合が増加し、PRC1 の転写部位への結合が上昇し転写抑制を引き起こす。

ENL と BMI1 のアミノ酸配列の中に、ATM によるリン酸化サイト (SQ-sites) があるかアミノ酸配列より検索した。その結果、ENL によく保存された SQ-sites (S394 と S398) が存在することが明らかになった。そこで、放射線照射により DSB を発生させてリン酸化を観察したところ、ENL は ATM によりこれらの部位がリン酸化され、それにより BMI1 との相互作用が増加するという結果が得られた。

(6) 転写抑制が起こらない ENL の変異では、DSB 部位への DNA 修復因子の結合が低下すると共に、放射線感受性が増強し、ゲノムの安定性維持に貢献する。

上記の ENL の AQ 変異細胞を用いて、ATM と ENL、Polycomb による近傍の転写抑制が

欠損した際に、DSB の修復にどのような影響が出るのかを DSB 修復タンパクである KU のリクルートを観察することにより検討した。この結果、ENL の SQ mutant では DSB 部位への DSB 修復因子である KU70 のリクルートが減少し、放射線などに感受性を示した。このことから、ATM は DSB 近傍の転写活性化部位の転写を抑制することにより、転写よりもまず DSB 修復を優先して進め、これがゲノム安定性の維持につながると考えられた。

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)

Ui A, Yasui A

Collaboration of MLLT1/ENL, Polycomb and ATM for transcription and genome integrity

Nucleus, in press, 2016, 査読あり

Ui A, Nagaura Y, Yasui A

Transcriptional elongation factor ENL phosphorylated by ATM recruits polycomb and switches off transcription for DSB repair

Molecular Cell, 58, 468-82. 2015, 査読あり

Kato K, Nakajima K, Ui A, Muto-Terao Y, Ogiwara H, Nakada S

Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice

Molecular Cell, 53, 617-630, 2014, 査読あり

Watanabe R, Ui A, Kanno S, Ogiwara H, Nagase T, Kohno T, Yasui A

SWI/SNF factors required for cellular resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability.

Cancer Res., 74, 2465-2475, 2014, 査読あり

〔学会発表〕(計 14 件)

宇井彩子

新規 Ubiquitin E3-ligase の DSB 修復を介した染色体安定機構

染色体ワークショップ (千葉県木更津氏・かずさ DNA) 2017 年 1 月 11 日

宇井彩子 (招待講演)

DSB 修復に関与する新規 Ubiquitin E3-ligase の機能解析

分子生物学会 (神奈川県横浜市・パシフィコ横浜) 2016 年 12 月 2 日

宇井彩子

Chromatin remodeling complexes belonging to ISWI and SWI/SNF families cooperatively promote DSB repair to prevent genome instability.

3R symposium (島根県松江市・ホテル一畑) 2016 年 11 月 15 日

宇井彩子

DSB 修復に関与する新規 Ubiquitin E3-ligase の機能解析

生物ゲノム安定維持の分子機構 (静岡県三島市・国立遺伝学研究所) 2016 年 10 月 24 日

宇井彩子 (招待講演)

DNA 損傷修復と転写の共役機構と染色体安定性

第 9 回 Symphony (東京都品川区・ホテルメトロポリタンエドモンド) 2016 年 9 月 18 日

宇井彩子

エストロゲン依存的なユビキチン化制御機構の解析

第 2 回 Neo Vitamin D Workshop 学術集会 (東京都品川区・TKP ガーデンシティ品川) 2016 年 8 月 26 日

宇井彩子 (招待講演)

ATMによる転写とDSB修復の制御

放射線医学総合研究所セミナー (千葉県千葉市・放射線医学総合研究所) 2015年12月18日

宇井彩子 (招待講演)

ATMは転写部位の近傍でDSBが生じると、転写促進因子のENLをリン酸化して、転写抑制因子のポリコムを呼び込み、転写を抑制する

日本分子生物学会年会 (兵庫県神戸市・ポートアイランド) 2015年12月1日

宇井彩子

ATMは転写因子をリン酸化し、制御することにより、転写を抑制し、DNA修復を促進する。
第23回DNA複製・組換え・修復ワークショップ (静岡県焼津市・焼津グランドホテル)
2015年10月19日

宇井彩子

Phosphorylation of transcriptional elongation factor ENL by ATM turns off the transcription by recruiting Polycomb for DSB repair

第74回日本癌学会 (愛知県名古屋市・名古屋国際会議場) 2015年10月8日

宇井彩子 (招待講演)

DSB修復と転写におけるヒストン修飾とクロマチンリモデリング

国立遺伝研研究会 (静岡県三島市・国立遺伝研究所) 2015年10月1日

宇井彩子、安井明 (招待講演)

ATMは転写因子PolycombとENL/MLT1に作用してDSB近傍の転写とDSB修復を制御する

国立遺伝研研究会 (静岡県三島市・) 国立遺伝学研究所) 2014年11月7日

宇井彩子 (招待講演)

DNA損傷シグナルによる、転写とクロマチン修飾の制御機構、

日本薬学会東北支部第13回生物化学若手研

究セミナー (宮城県仙台市・東北薬科大学)

2014年7月19日

宇井彩子

Mixed Lineage Leukemia (MLL)融合遺伝子ENL(MLLT1)の転写とDSB応答における新たな機能の解析

第三回DNA損傷応答ワークショップ (静岡県浜松市・浜名湖オーシャン) 2014年4月3日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宇井 彩子 (UI Ayako)

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号: 00469967