

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26740018

研究課題名(和文) 遺伝学とプロテオーム解析を組み合わせたDNA損傷応答の新規制御機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a novel regulatory mechanism of DNA damage repair using the combination of proteomics and genetics approach

研究代表者

笹沼 博之 (Sasanuma, Hiroyuki)

京都大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00531691

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)：CRISPR/Cas9ゲノム編集技術を使って、3FLAG-BRCA1を発現するニワトリDT40細胞、ヒトTK6細胞を作り、DNA損傷修復に重要な因子であるBRCA1の相互作用因子の同定を行った。その結果、BRCA1蛋白質はDNA損傷応答に関わる因子だけでなく転写や染色体分配に関わる多くの因子と相互作用することが明らかになった。その中には、今までBRCA1と相互作用するという報告がない因子も含まれている。研究期間中に新規遺伝子の同定まで至ったという点で、当初の目的は達成されたと考えている。現在、CRISPRゲノム編集技術を使って変異細胞を作製し、その新奇遺伝子の機能解析を実施している。

研究成果の概要(英文)：During the period, I have already established the protocol of mass-spectrometry analysis using DT40 and human Tk6 B cell lines. Initially, I introduced 3flag tag at N-terminal region at first exon of BRCA1 using CRISPR/Cas9 genome editing. After pulling down 3FLAG-BRCA1 from whole cell extract, I analyzed the interactors of BRCA1, which plays a important role in DNA damage repair. I successfully identified many facotrs involved in transcription and chromosome segregation. Additionally, I identified the several novel proteins interacting with BRCA1. To investigate the function of novel BRCA1-interactors in DNA metabolism (DNA repair, replication, recombination), I continue generating the mutants of BRCA1 interactors identified here using human B cell line by genome editing technology. It is thought that the aim of this project was achieved.

研究分野：DNA損傷修復

キーワード：DNA損傷 プロテオミクス ゲノム編集 相同組換え DNA二重鎖切断修復

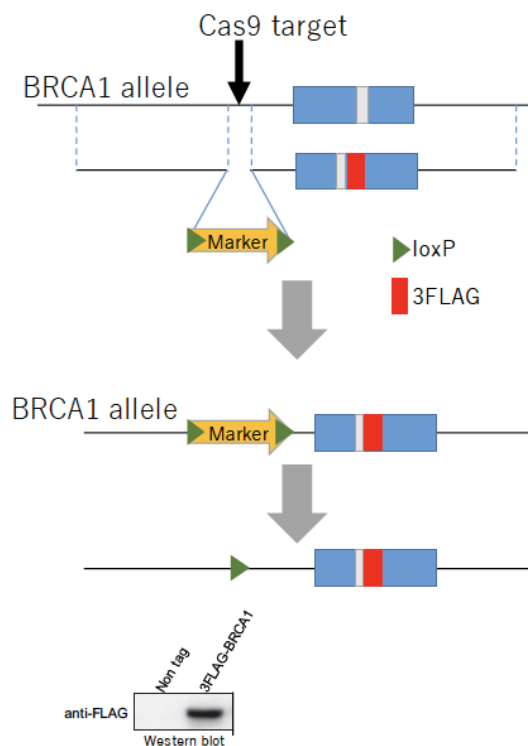
### 1. 研究開始当初の背景

当研究室では、ニワトリ DT40 細胞を用いた遺伝学的な解析を 20 年にわたり行ってきた。単離した多くの変異細胞を使って、動物細胞における DNA 損傷修復応答に関係するメカニズムが明らかにしてきた。しかし近年、リン酸化制御のみならず、ヒストン修飾といったエピジェネティックな制御が DNA 損傷修復に関与していることが明らかになってきているため、遺伝学を中心とした解析では十分ではないと考えていた。さらに BRCA1 蛋白質は相互作用因子の機能的な種類が多いため、どの因子が DNA 損傷応答に関わる因子かを見極めることが難しい。そこで本研究課題では、当研究室にある遺伝学的手法を用いて、1、DNA 損傷の種類によって BRCA1 相互作用因子がどう変化するか、2、いろいろな遺伝子破壊細胞において BRCA1 相互作用因子がどう変化するかを調べることを提案した。この変化を捉えることで DNA 損傷応答性の BRCA1 複合体の全容を明らかにできると考えた。

### 2. 研究の目的

DNA 損傷応答は、DNA 二重鎖切断修復だけでも百以上もの因子が介在する複雑な反応である。その分子メカニズムの一端を解明するために、当研究室にある遺伝学的な解析と質量分析を用いたプロテオミクスを融合させて DNA 損傷応答のメカニズムの解明を目指した。具体的には、DNA 損傷応答の中心因子である BRCA1 蛋白質に着目し、DNA 損傷の種類に応答した BRCA1 相互作用因子を網羅的に調べる。

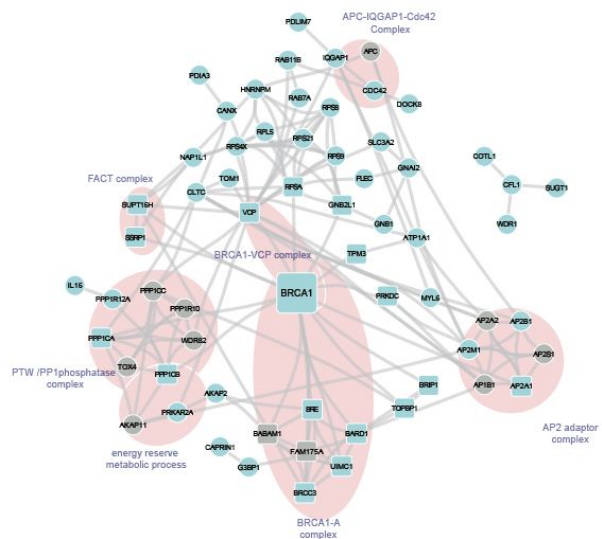
### 3. 研究の方法



DNA 損傷の中でも DNA 二重鎖切断は鋳型鎖を失うという意味でもっとも重篤な損傷である。この DNA 二重鎖切断は、非相同末端結合(NHEJ)か相同組換え(HR)反応により修復される。本研究課題では、DNA 二重鎖切断修復の中心に位置する BRCA1 蛋白質分子に着目し、NHEJ と HR の使い分けに BRCA1 がどう関わるかを解析した。相同組換えを誘導する薬剤としてカンプトテシン、NHEJ を誘導する薬剤としてエトポシドを細胞に暴露した。本研究では、過剰発現による相互作用因子のアーティファクトを避けるために、研究開始後、すぐにニワトリ DT40 細胞の BRCA1 遺伝子の最初のメチオニンに相当する ATG 直下に 3xFLAG 配列をノックインした細胞の作製をおこなった(左下図)。3FLAG-BRCA1 蛋白質の発現を確認した後、約  $3 \times 10^9$  細胞(約 3 リッター)から細胞抽出液を調整し、anti-Flag 抗体により免疫沈降実験を実施した。

### 4. 研究成果

カンプトテシン処理後とエトポシド処理後の BRCA1 と相互作用する因子を質量分析によって同定したところ、相互作用因子にほとんど差がないが、同じ因子でも分析機に読まれたペプチド数に大きな差があるものが存在した。そうした因子をピックアップしたところ、カンプトテシンでは Mre11, CtIP, BRCA2 や Rad51 といった相同組換え因子が選ばれていた。面白いことにエトポシド処理によって活性化されているはずの NHEJ 経路に関する因子(例えば Ku や Lig4 など)はカンプトテシン、エトポシド何に対しても全く同定されなかった。この結果から、BRCA1 がたくさんの相同組換え因子と強く結合することによって修復経路が HR 経路に向かうことが予想される。おそらく BRCA1 は HR 経路のコーディネーターとして機能していると考えられる。研究計画の後半では、TALEN, CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術を用いて、ヒト細胞で 3FLAG-BRCA1 を発現する細胞を作製し、同様にカン



プトテシンとエトポシド処理によって変化する相互作用因子の同定を実施した。幾つかの新規遺伝子に関しては CRISPR により遺伝子改変細胞を作製して機能解析を継続中である。研究期間終了時に得られた結果を全ページ右下に示す。N 末端側に 3FLAG 配列をノックインしたヒト細胞を用いて 3FLAG-BRCA1 を免疫沈降したのち、質量分析によって同定できた相互作用因子を薄青色でマッピングしたものである(灰色は今回の解析で同定できなかった因子)。既知の因子のほとんどが同定できている。ピンクは既知の BRCA1 複合体を示している。HR の素過程に關与する因子 (Rad51 や Mre11) はニワトリ細胞とヒト細胞で同定された一方で、ニワトリ細胞のみあるいはヒト細胞のみで検出された因子があった。さらに今まで BRCA1 相互作用因子として報告がない新規因子も見つかった。今後、これらの因子の DNA 損傷応答における機能を明らかにしていく必要がある。

#### 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)

1. Shunichi Takeda, Nguyen Ngoc Hoa, and Hiroyuki Sasanuma, H. The role Mre11-Rad50-Nbs1 complex in double-strand-break repair - Myth and Facts, **Journal of Radiation Research**, *in press*, 2016
2. Marchand C, Abdelmalak M, Kankanala J, Huang SY, Kiselev E, Fesen K, Kurahashi K, Sasanuma H, Takeda S, Aihara H, Wang Z, Pommier Y, (2016) Deazaflavin Inhibitors of Tyrosyl-DNA Phosphodiesterase 2 (TDP2) Specific for the Human Enzyme and Active against Cellular TDP2, *ACS Chem Bio.*, *in press*
3. Mohiuddin, Kobayashi S, Keka IS, Guilbaud G, Sale J, Narita T, Abdel-Aziz HI, Wang X, Ogawa S, Sasanuma H, Chiu R, Oestergaard VH, Lisby M, Takeda S. (2016), The role of HERC2 and RNF8 ubiquitin E3 ligases in the promotion of translesion DNA synthesis in the chicken DT40 cell line., *DNA Repair (Amst)*, doi:10.1016/j.dnarep.2016.02.002
4. Hoa NN\*, Akagawa R, Yamasaki T, Hirota K, Sasa K, Natsume T, Kobayashi J, Sakuma T, Yamamoto T, Komatsu K, Kanemaki MT, Pommier Y, Takeda S, Sasanuma H\*\* (責任著者). (2015) Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11 to the initial step of double-strand break repair by homologous DNA recombination in the chicken DT40 and human TK6 cell line. *Genes to Cells* (in press).
5. Keka IS\*, Mohiuddin, Maede Y, Rahman MM, Sakuma T, Honma M, Yamamoto T, Takeda S, Sasanuma H\*\* (責任著者). (2015) Smarcal1 promotes double-strand-break repair by nonhomologous end-joining. *Nucleic Acids Res.*, 43 (13): 6359-72.
6. Hoa NN\*, Kobayashi J, Omura M, et al, Sasanuma H\*\* (責任著者). (2015) BRCA1 and CtIP are Both Required to Recruit Dna2 at Double-Strand Breaks in Homologous Recombination., *Plos One.*, 10(4)e0124495
7. Gothwal KS\*, Patel JN, Colletti MM, Sasanuma H, Shinohara M, Hochwagen A, and Shinohara A\*\*. (2015) The Paf1 Complex Shapes the Landscape of Double-strand Breaks along Meiotic Chromosomes in *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* (in press)

8. Tada K\*, Kobayashi M\*\*, Takiuchi Y, Iwai F, Sakamoto T, Nagata K, Shinohara M, Io K, Hishizawa M, Shindo K, Kadowaki N, Hirota K, Yamamoto J, Iwai S, Sasanuma H(18 番目), Takeda S and Takaori-Kondo A\*\*, (2015) Abacavir, an anti-HIV-1 drug, targets TDP1 deficient adult T-cell leukemia., *Science Advances*, 1(3)e1400203.

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Keka IS, Mohiuddin, Takeda S, Sasanuma H, Chromatin remodeling factor, Smarcal1, is involved Double-Strand Break Repair by NHEJ, IIAS research conference, chromatin decoding, 5/12-15, Nara
2. Hoa NN, Kobayashi J, Omura M, Tsuda M, Hirota K, Komatsu K, Takeda S, Sasanuma H: “Collaboration between the CtIP and Dna2 nucleases is required to create 3' single-stranded ends at double-strand breaks in homologous recombination” Fusion Conferences, Functional Polymeric Materials, Fiesta Americana Condesa, Cancun, Mexico, 2/10-14, 2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://rg4.rg.med.kyoto-u.ac.jp/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹沼 博之 (SASANUMA, Hiroyuki)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00531691