

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06070

研究課題名(和文) 脱ユビキチン化酵素USP10が制御するDNA損傷応答機構の解析

研究課題名(英文) Deubiquitylase USP10 facilitates DNA damage response.

研究代表者

宇谷 公一 (UTANI, Koichi)

金沢医科大学・医学部・助教

研究者番号：60583143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：USP10をノックアウト(KO)マウスは、骨髄造血幹細胞が消失することに起因する重度の貧血により1年以内に死亡する。本研究では、USP10-KO細胞ではゲノム不安定性を呈し、それがDNA損傷修復機構に異常があることを明らかにした。すなわち、USP10-KO細胞では正確性の高い組み替え修復能が抑制されており、一方、正確性の低い末端結合修復を司るDNA-PKcsの脱リン酸化酵素であるPPP6C、またはDNA-PKcsの抑制により、上記したDNA修復異常が解消されることを見出した。以上の結果は、USP10はDNA-PKcsの脱リン酸化を制御することで修復経路選択に寄与する可能性を示唆していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、USP10が末端結合修復を抑制し、正確性の高い組み替え修復機構選択を促進することを示した。組み替え修復機構の破綻による造血幹細胞の消失はファンコーニ貧血原因遺伝子群で見られ、間接的ではあるがUSP10-KOの表現型はこの機構と同様であると推察される。そしてDNA-PKcsのリン酸化部位の変異体マウスもまたUSP10欠失マウスと酷似した表現型を呈するが、USP10同様に自発的に発現する。この点は、擬似ウイルス感染などによる外部刺激を必要とするファンコーニ貧血遺伝子とは異なる。故に本研究結果は未解明であるファンコーニ遺伝子群の造血幹細胞消失の機序を理解するために重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：Previous study showed Ubiquitin Specific Peptidase 10 (USP10) knockout mouse leads to severe bone marrow failure because of hematopoietic stem cell (HSC) death. In this study, we found genomic instability in USP10-KO MEF cells by testing micronuclei formation, gH2AX foci formation and comet assay. Pulse chase experiment monitoring gH2AX foci suggested that USP10-KO cells failed to repair DNA damage. It is consistent with higher sensitivity to DNA damage inducible reagents in USP10-KO MEF. We also found USP10-KO MEF reduced Homologous Recombination (HR) efficiency. In consistent with this, we observed significant increase the number of chromosome bridges due to the improper DNA end ligation. We further found the DNA-PKcs and a phosphatase of DNA-PKcs PPP6C rescued the USP10-KO dependent DNA damage repair defect as described above. Those results suggest that USP10 facilitates PPP6C to repress DNA-PKcs dependent DNA repair to gain accurate repair HR pathway.

研究分野：分子細胞遺伝学

キーワード：DNA修復 ゲノム安定性 造血幹細胞維持 脱ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

当研究室の樋口らは、蛋白質からユビキチンを切断する脱ユビキチン化酵素である Ubiquitin Specific Protease 10 (USP10) が、ストレスによって誘導される活性酸素 (ROS) の産生を抑制する制御分子であること、さらに、USP10 のノックアウト (KO) マウスは造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell: HSC) が維持されないことに起因する骨髓造血不全をともなう重度の貧血に陥ることを明らかにした。USP10 は RNA 結合蛋白である G3BP と複合体を形成し、ストレス顆粒に局在し、酸化ストレスによって発生する活性酸素 (ROS) から、細胞障害を最小限に食い止める役割を果たしている。ストレス応答反応の異常が HSC の消失につながることは、数多くの先行研究により示されており (K Ito et al., Nature 2004, F Liu et al., Blood 2010, M Mortensen et al., JEM 2011)、USP10-KO マウスの表現型も、この事実と合致する。しかし予想に反し、HSC の ROS 量には WT と KO 間で差はなく、ROS 制御以外の USP10 の機能が HSC 維持に重要であることが示唆された。

2. 研究の目的

我々の予備実験により、USP10-KO 細胞では、DNA 損傷応答 (DNA damage response; DDR) 過程に異常をきたし、染色体不安定性を呈していることが示唆された。これまで USP10 の基質として、TP53 を主とした、DDR に関わる分子が報告されていることから、USP10 の機能と DNA 損傷修復との関連が示唆されている。しかしいずれの USP10 による脱ユビキチン化標的蛋白質から上記マウス表現型を説明することはできない。そこで、本研究では、USP10-KO によって生じる DDR 過程の異常個所を特定することで、DNA ダメージ蓄積の分子メカニズムを解明し、HSC の消失、癌発生や老化との関連について検討する。

3. 研究の方法

ゲノム不安の評価には変異原性の評価に用いられる微少核の形成頻度を用いた。DNA 損傷を評価するためには、 γ H2AX foci 形成頻度を用いた。また、H2AX のリン酸化に関わる分子のノックダウン、阻害する実験では comet assay 法を併用した。組み換え修復 (Homologous Recombination, HR) を評価するためには Sister Chromatid Exchange (SCE) assay を用いた。DNA 損傷誘導のためには、Zeocin (Zeo)、Etoposide (ETP)、Chamtothecin (CPT)、Neocarzinostatin (NCS)、Mytomycin C (MMC)、および Irradiation (IR) を用いた。特に非同源性末端結合 Non-Homologous End Joining (NHEJ) を評価するためには ETP と Ligase IV 阻害剤である SCR7 を用いた。DNA 損傷誘導後の細胞死、細胞生存率を評価するためには、トリパンブルー染色法、clonogenic assay、MTS cell proliferation assay を用いた。

4. 研究成果

予備実験として、USP10-KO Mouse Embryonic Fibroblast (MEF) を用いて、DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand breaks; DSBs) に対する応答を検討した。その結果、USP10-KO MEF では通常培養条件下においても、DSBs の指標とされる γ foci 形成数、および変異原性の評価に用いられる微少核の形成頻度が増加していることを見出した。すなわち、通常培養条件下においても、USP10-KO 細胞では DSBs に起因する染色体不安定化がより頻繁に起きることが示唆された。次に、DSBs 誘導剤である Zeocin にて KO および WT MEF を処理し、時間経過に伴う γ H2AX foci 形成数を比較した。その結果、WT 細胞では DSBs 修復後、速やかに γ H2AX foci が消失するのに対し、USP10-KO 細胞では γ H2AX foci 形成が残っており、DNA 損傷修復が遷延化していた。一方で、USP10-KO 細胞へ、USP10 もしくは RNA 結合領域を除いた USP10 発現ベクターを戻すと上記 DNA 損傷修復異常は解消された。しかし脱ユビキチン活性を失う C418A 変異 USP10 では回復が見られなかった。以上の結果は、USP10 の脱ユビキチン化酵素活性は DDR における DNA 修復過程に関与しており、USP10-KO 細胞では DSBs が効率良く修復されず、ゲノム

不安定性が引き起こされることを強く示唆していた。また shRNA による USP10 ノックダウンを行ったヒトがん細胞 HCT116、MCF7、ヒト正常線維芽細胞 WI38 でも同様の DNA 損傷修復異常が確認された。

USP10-KO 細胞では Chromosome Bridge が頻発していることを見出した。これは、DNA 損傷部位が末端結合により正しく修復されず、二動原体染色体が形成されていることを示唆していた。そのような不正確な末端結合を行わないための保証として細胞は HR 経路を使用することが知られている。そこで、HR 経路を評価するため zeocin または CPT により誘導される DNA 損傷時の SCE assay を行った。その結果 USP10-KO MEF、USP10-KD HCT116 および USP10-KD MCF7 では SCE 頻度が低いことを見出した。これは USP10 が欠乏した状況では、HR 経路活性が減弱していることを示唆していた。また、NHEJ を誘導する ETP でも、SCE の増加が見られたが、USP10 依存的制御は見られなかった。

次に、DNA 損傷に対する感受性試験を行った。IR 照射後コロニー形成能は USP10-KO で有意に低下していた。また MTS assay で細胞増殖能を評価すると USP10-KO MEF 細胞では ETP を含めた各種 DNA 損傷誘導剤に対して感受性を示した。ETP では DNA 損傷修復に差は見られていないが、これは不正確な損傷修復の結果生じる Chromosome bridge 増加、微小核の増加を回避できずゲノム不均等分配による遺伝物質損失、増加を引き起こすため細胞にとって前者は致命的であり、後者は癌化の危険性がある。

同様の表現型を示す HR 経路の異常は主としてファンコーニ貧血原因遺伝子 (FA) に多い。FA 細胞は DNA クロスリンク超感受性を示すが、USP10-KO での MMC 感受性は有意ではあるが、FA ほどの感受性は見られない。一方、NHEJ 制御を司る DNA-PK の ABCED クラスターリン酸化部位変異マウスは USP10 と酷似した表現型を示すことが知られている。このリン酸化は NHEJ と HR の切り替えに寄与することが報告されている。そこで、USP10 は DNA-PK のリン酸化修飾制御に関わると仮説を立てた。まず、USP10-KO MEF の DNA-PK をノックダウンし、DNA 損傷応答試験および SCE assay を行った。その結果、上記した異常は全て解消された。別の NHEJ 重要ファクターである 53BP1 のノックダウンでも解消傾向を見出したが、自発的 DNA 損傷量が大幅に増加していた。NHEJ 経路最終段階の Ligase IV の阻害は効果がなかった。すなわち、USP10 は修復経路の選択段階で DNA-PK リン酸化制御を行い、HR 経路へ誘導することを示唆していた。

USP10 相互作用を BioGrid データベースから探索し、DNA-PK と間接的に相互作用する因子として、SAPS1, SAPS2, SAPS3 に着目した。これらは DNA-PK の ABCDE クラスターの脱リン酸化を行う PPP6C のアクセサリ蛋白質である。IP と細胞内局在を IF で SAPS1 と USP10 が確かに相互作用することを確認した。そこで PPP6C のノックダウンを行い、DNA 損傷応答試験と SCE assay を行うと、DNA-PK KD と同様に異常が解消された。このことは USP10 が PPP6C による DNA-PK の脱リン酸化活性を制御していることを示唆していた。

以上の結果から、USP10 は DNA-PK の脱リン酸化を間接的に制御することで NHEJ と HR の正常な選択に必要な分子であることを見出した。FA 遺伝子を欠損したマウスは、poly I:C 等の刺激なしには骨髄不全を発症しない (Walter D et al, Nature 2015)。しかし、USP10-KO マウスや DNA-PK 3A 変異体マウスは、そのような刺激を必要としない。このことは後者の場合、ストレスが自発的に発生していることを示唆している。故に USP10 による DNA-PK 制御はなぜ追加刺激を必要としないのかを明らかにすることは、FA 発症機序を理解する上でも重要である。また、USP10 は DNA 損傷部位に蓄積は見られず、核周辺部へ局在している。核膜周辺では核内プロテアソームがアンカーされていることが知られており、核内の蛋白質品質管理との関連が疑われる。今後、USP10 の脱ユビキチン化蛋白質をこれらの観点から明らかにすることが表現型の理解を深めるために必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宇谷公一、逆井良、岩淵邦芳、樋口雅也
2. 発表標題 脱コピキチン化酵素USP10によるDNA損傷応答制御
3. 学会等名 日本癌学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	樋口 雅也 (HIGUCHI Masaya) (50334678)	金沢医科大学・医学部・教授 (33303)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------