

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：22604

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25281021

研究課題名(和文) プロテオミクスと遺伝学の融合によるゲノム恒常性維持マシナリーの解明

研究課題名(英文) Analysis of genome maintenance system 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・理工学研究科・教授

研究者番号：00342840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：環境中の化学物質や放射線などによるDNAの損傷は、ゲノム不安定化の原因となる。ゲノムの不安定化は発ガンや遺伝的影響の要因となり、ゲノム安定維持機構の解明が急がれる。我々は、クロマチン制御-DNA修復の連携によるゲノムの安定維持機構を、「ゲノム恒常性維持マシナリー」と定義しその解明を行なった。これまで、遺伝学アプローチによりゲノム恒常性維持マシナリーの各因子の機能解明を行ってきたが、個別のタンパク質の研究では、全貌を俯瞰するような知見を得ることは不可能であった。本研究ではSILACという手法を用いプロテオミクスと遺伝学手法を融合させ、ゲノム恒常性維持マシナリーの全貌解明を目指し研究を推進した。

研究成果の概要(英文)：DNA damages caused by environmental genotoxic agents and ionizing radiations induce genome instability. Genome instability is a cause of cancer and cellular senescence, and thus understanding of the genome maintenance system is important issue. Here we defined genome maintenance system including chromatin regulation and DNA repair as 'Genome maintenance machinery' and studied this by the use of genetic approach and proteomics approach. To this end, we applied SILAC technique to DT40 DNA repair mutant panel. Our comprehensive approach revealed the relationship among signal pathway, repair factor and chromatin modifications. In this report, we explain about the identification of ubiquitination target proteins of RNF4 ubiquitin ligase.

研究分野：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

(Kobayashi et al 2015 *Oncogene*)。

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

我々はこれまでに系統的にユビキチン化を担う酵素遺伝子を破壊し、変異体ライブラリーを作成した。これら変異体ごとに異なる遺伝毒性物質への感受性パターンを示すことから、それぞれの酵素がお互いに補いながらも異なる経路の調節を行っている様子が浮かび上がってきている。われわれの得意とする遺伝学比較によって、プロテオーム像の比較を行うために、図1に示すSILAC(Stable Isotope Labeling of Cells)を、申請者はDT40細胞用に最適化した。

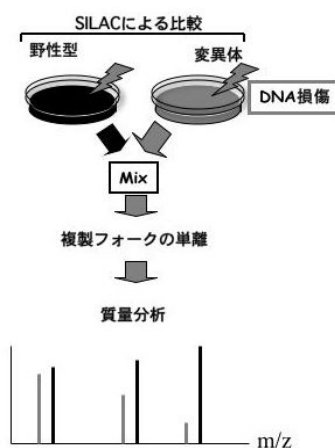


図1 SILACアプローチによる、ゲノム安定性の変異体(例; PCNAのユビキチン化部位の変異や、ユビキチン化酵素の変異)と野生型間のタンパク質比較の方法。細

胞培養を安定同位体でラベルする。(左;野生型)と(右;変異体)を質量数の異なるアイソトープでそれぞれラベルする。両細胞をミックスして、複製フォークタンパク質や組換え中間体を単離し、質量分析を行う。アイソトープの質量差分、質量分析のピークの位置 m/z はシフトして現れるので(下の図)、野生型と変異体の区別が出来る。精製の前に比較する2種の細胞をミックスするので、精製過程で生じる誤差を考慮する必要がない。さらに、DT40細胞はきわめて形質が安定で同一の遺伝的バックグラウンドの比較が出来るのでSILAC研究に最適である。

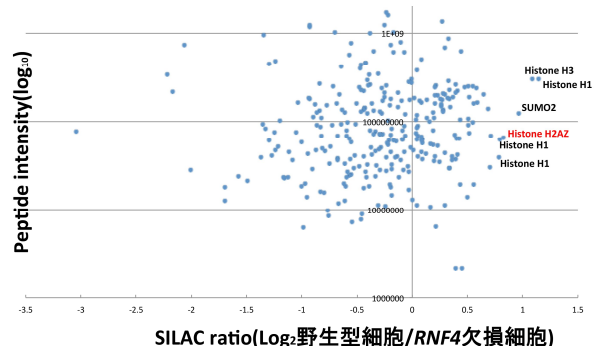
申請者は、研究期間中に、特に断裂防止や染色体の維持、チェックポイント活性化などDNA修復のみならず多様なゲノムの安定維持に必須の役割をRNF4ユビキチン化酵素が果たすことを報告した(Hirota et al. 2014 *Genes Cells*)。本研究では、上記のような、プロテオームの包括的比較研究を行ったため、膨大なデータが得られているが、本申請書にはその一例としてRNF4の基質タンパク質の同定について記載する。

3. 研究の方法

本研究では、図1に説明した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。野生型とRNF4欠損変異体におけるユビキチン化タンパク質の包括的比較を行うことで、RNF4の標的に迫るストラテジーで研究を行った。ユビキチン化したペプチドをジグリシリルジジン抗体(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。同定では、申請者が独自に整備したニワトリデータベース(質量分析用のトランスクリプトームデータに由来するデータベース)を用いて、MaxQuant(<http://www.biochem.mpg.de/227318/MaxQuant>)ソフトウェアによるパイオインフォマティクス解析を行った。

4. 研究成果

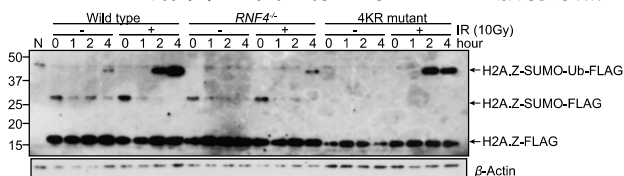
本研究結果で、下記のRNF4ユビキチン化酵素の基質蛋白質のテーブルを描き出す事に成功した。



Ubiquitylated peptide	SILAC ratio (Wild type/RNF4 ^{-/-})	Histone Variant
KPAGPSVTEITK(g)AVSASK	1.1435	Histone H1, Histone H1.01, Histone H1.03, Histone H1.10, Histone h1.11L, Histone H1.11R
SAPATGGVK(g)KPHR	1.0840	Histone H3.2-like
ATIAGGGVIPHHK(g)SIIGK	0.8281	Histone H2A.Z(H2AFZ), Histone H2A.Z(H2AFV)
SIVSK(g)GTIVQTK	0.7894	Histone H1, Histone H1.01, Histone H1.03, Histone H1.10, Histone h1.11L, Histone H1.11R
IGIK(g)SIVSK	0.7834	Histone H1, Histone H1.01, Histone H1.03, Histone H1.10, Histone h1.11L, Histone H1.11R

RNF4 の標的候補の HistoneH2AZ は、ヒストン H2A のバリエーションタンパク質であり、転写や組換えといった、染色体上での酵素反応の調節に重要な働きを持つことが示唆されている。そこで、H2AZ の細胞内での振る舞いを野生型と RNF4 欠損細胞とで比較した。RNF4 欠損細胞において、SUMO 化した H2AZ タンパク質が増加していた。RNF4 は SUMO 化したタンパク質の分解を行うためにポリユビキチン化することが知られているので、RNF4 欠損細胞ではユビキチン化が不良となった結果、SUMO 化タンパク質が増加したと仮説した。仮説の検証のため、野生型と RNF4 欠損細胞に 10Gy の放射線を照射し、その後の H2AZ の状態をモニターした。このとき、プロテアソームでのユビキチン化タンパク質を抑制するために MG132 を培地に添加して実験を行った。

その結果、上図の様に野生型では放射線照



射後 2 時間以降に顕著なユビキチン化が見出されたが、RNF4 欠損細胞ではこのユビキチン化が不良となっていることが分かった。RNF4 ユビキチン化によるタンパク質の分解制御が、上記研究で明らかとなったが、その生理的意義を調べるために、H2AZ の過剰発現を行ったところ、RNF4 欠損細胞と同様の、放射線誘導性の染色体断裂が多発する表現型が確認できた。このことから、RNF4 はヒストンバリエーションの H2AZ の SUMO-Ub 修飾による分解によって、タンパク質の時空間的な量的制御を行うことで、染色体断裂を防止していることが明らかとなった（投稿準備中）。

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する。

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）

〔雑誌論文〕(計 19 件)

1. Takemata N, Oda A, Yamada T, Galipon J, Miyoshi T, Suzuki Y, Sugano S, Hoffman CS, Hirota K, Ohta K. Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription. *Nucleic Acids Res.* 2016 Mar 3. pii: gkw142. [Epub ahead of print]
2. Tada K, Kobayashi M, Takiuchi Y, Iwai F, Sakamoto T, Nagata K, Shinohara M, Io K, Shirakawa K, Hishizawa M, Shindo K, Kadowaki N, Hirota K, Yamamoto J, Iwai S, Sasanuma H, Takeda S, Takaori-Kondo A. Abacavir, an anti-HIV-1 drug, targets TDP1-deficient adult T cell leukemia. *Sci Adv.* 2015 Apr 24;1(3):e1400203.
3. 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. Relative contribution of four nucleases, CtIP, Dna2, Exo1 and Mre11, to the initial step of DNA double-strand break repair by homologous recombination in both the chicken DT40 and human TK6 cell lines. *Genes Cells.* 2015 20, 1059-1076
4. Ooka M, Takazawa H, Takeda S, and Hirota K. Cytotoxic and genotoxic profiles of benzo[a]pyrene and N-nitrosodimethylamine demonstrated using DNA repair deficient DT40 cells with metabolic activation. *Chemosphere*
5. Shimizu N, Ooka M, Takagi T, Takeda S, Hirota K. Distinct DNA damage spectra induced by ionizing radiation in normoxic and hypoxic cells. *Radiation Res.* 183,442-8
6. Kobayashi K, Fujii T, Asada R, Ooka M, and Hirota K. Development of a targeted flip-in system in avian DT40 cells. *PLoS One* 10, e0122006.(2015).
7. Hirota K, Yoshikiyo K, Guilbaud G, Tsurimoto T, Murai J, Tsuda M, Phillips L, Narita T, Nishihara K, Kobayashi K, Yamada K, Nakamura J, Pommier Y, Lehmann A, Sale J, and Takeda S. The POLD3 subunit of DNA

- polymerase can promote translesion synthesis independently of DNA polymerase (2015) *Nucleic Acids Res* 43(3):1671-83. (査読あり)
8. Kobayashi S, Kasaishi Y, Nakada S, Takagi T, Era S, Motegi A, Chiu R.K., Takeda S, and Hirota K. Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end joining. (2015) *Oncogene* (査読あり)
 9. Asada R, Takemata N, Hoffman C.S., Ohta K, and Hirota K. Antagonistic controls of chromatin and mRNA start site selection by Tup family corepressors and the CCAAT-binding factor. 2015 *Mol Cell Biol* 35(5):847-55. (査読あり)
 10. Yamamoto K.N., Hirota K., Takeda S, and Haeno H. Evolution of pre-existing versus acquired resistance to platinum drugs and PARP inhibitors in BRCA-associated cancers. (2014). *PLoS One* 9, e105724. (査読あり)
 11. Taoka M, Ishikawa D, Nobe Y, Ishikawa H, Yamauchi Y, Terukina G, Nakayama H, Hirota K., Takahashi N, and Isobe T. RNA cytidine acetyltransferase of small-subunit ribosomal RNA: identification of acetylation sites and the responsible acetyltransferase in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. (2014) *PLoS One* 9, e112156. (査読あり)
 12. Saito Y, Takeda J, Adachi K, Nobe Y, Kobayashi J, Hirota K., Oliveira D.V., Taoka M, and Isobe T. RNase MRP cleaves pre-tRNAs^{er}-Met in the tRNA maturation pathway. (2014) *PLoS One* 9, e112488. (査読あり)
 13. Hirota K., Tsuda M, Murai J, Takagi T, Keka I.S., Narita T, Fujita M, Sasanuma H, Kobayashi J, and Takeda S. SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 plays a critical role in preventing chromosome loss. (2014) *Genes Cells* 19, 743-754. (査読あり)
 14. Sabouri S, Kobayashi M, Begum NA, Xu J, Hirota K., Honjo T. C-terminal region of activation-induced cytidine deaminase (AID) is required for efficient class switch recombination and gene conversion. (2014) *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(6):2253-8 (査読あり)
 15. Al Abo M, Dejsuphong D, Hirota K., Yonetani Y, Yamazoe M, Kurumizaka H, Takeda S. Compensatory functions and interdependency of the DNA-binding domain of BRCA2 with the BRCA1-PALB2-BRCA2 complex. (2014) *Cancer Research* 74(3):797-807. (査読あり)
 16. Mohiuddin, I. S. Keka, T. J. Evans, K. Hirota H. Shimizu K. Kono S. Takeda *S. Hirano A novel genotoxicity assay of carbon nanotubes using functional macrophage receptor with collagenous structure (MARCO)-expressing chicken B lymphocytes. (2014) *Arch Toxicol*. 88(1):145-60. (査読あり)
 17. 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. Structure-specific endonucleases Xpf and Mus81 play overlapping but essential roles in DNA repair by homologous recombination. (2013) *Cancer Research* Jul 15;73(14):4362-4371. (査読あり)
 18. Y Saito, J Takeda, M. Okada, J. Kobayashi, A. Kato, K. Hirota, M. Taoka, T. Matsumoto, K. Komatsu and *T. Isobe. The proteasome factor Bag101 binds to Rad22 and suppresses homologous recombination. (2013) *Sci Rep* 3, 2022. (査読あり)
 19. Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto K.N, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, *Hirota K. Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks (2013) *PLOS ONE* (査読あり)
- [学会発表](計 28 件)
1. SUMO-Targeted Ubiquitin Ligase RNF4 required for genome maintenance regulates stability of the histone variant H2A.Z Kouji Hirota International symposium on chromatin structure, dynamics and function Awaji Yemebutai (2015) 08.23-26 (兵庫県・淡路市)

2. The regulation of Schizosaccharomyces Pombe *fbp1* gene transcription through local higher order genome structure by transcription regulators Ryuta Asada and Kouji Hirota International Symposium Chromatin Structure, Dynamics and Function Awaji Yemebutai (2015) 08.23-26(兵庫県・淡路市)
3. The regulation of Schizosaccharomyces pombe *fbp1* gene transcription through local DNA looping structure by transcription regulators Ryuta Asada and Kouji Hirota Pombe 2015, (2015) June 21-26 Kobe (兵庫県・神戸市)
4. 分裂酵母 *fbp1* の転写抑制時のクロマチン再構築機構の解明 梅田 未来、廣田 耕志 バイオコンファレンス 2015 (2015)11.06 首都大学東京 (東京都・八王子市)
5. DNA 修復経路欠損細胞を用いたタバコに含まれる化学物質の遺伝毒性評価 大岡正人 高沢浩則 武田俊一 廣田 耕志 バイオコンファレンス (2015).11.06 首都大学東京(東京都・八王子市)
6. 分裂酵母 *fbp1* の転写抑制時のクロマチン再構築機構の解明 梅田 未来、廣田 耕志 日本分子生物学会年会 (2015).12.01 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
7. 酸素の有無による電離放射線照射時の DNA 損傷の種類解析 大岡正人 清水直登 高木季代 武田俊一 廣田 耕志 日本分子生物学会年会 (2015).12.03 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
8. 分裂酵母 *fbp1* 遺伝子の転写活性化における Gcn5HAT とクロマチンリモデリング因子 Snf21 および Snf22 の機能の解析 足立朗 廣田 耕志 日本分子生物学会年会 (2015).12.04 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
9. 分裂酵母 *fbp1* におけるゲノム高次構造変化による遺伝子発現精密制御機構の解明 浅田隆大、廣田 耕志 日本分子生物学会年会 (2015).12.03 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
10. Capability of proofreading-exonuclease -deficient replicative DNA polymerase to perform translesion DNA synthesis Kouji Hirota, Masataka tsuda, Mohiudin, Toshiki Tsurimoto, Zvi Livneh, Shigenori Iwai, Julian Sale, Shunichi Takeda, 日本分子生物学会年会 2015.12.01 神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)
11. PAR 結合蛋白質 ALC1/CHDL1 と XRCC1 による単鎖切断修復 廣田 耕志、安井明、荻朋男、原田浩、中村純、Yves Pommier、武田俊一 染色体ワークショップ (2016). 01.12 (宮城県・松島町)
12. RNF4 による H2A.Z を介した染色体制御機構の解明 高木 季代、廣田 耕志 染色体ワークショップ (2016). 01.12 (宮城県・松島町)
13. 分裂酵母 *fbp1* におけるゲノム高次構造変化による遺伝子発現精密制御機構の解明 浅田隆大、廣田 耕志 染色体ワークショップ (2016). 01.12 (宮城県・松島町)
14. SUMO 化蛋白質を認識する RING 型ユビキチンリガーゼ RNF4 による、スピンドルアセンブリチェックポイント(SAC)活性維持と染色体ロスの防止 廣田 耕志、高木季代、津田雅貴、村井純子、Keka Islam、成田岳雄、藤田真梨、笹沼博之、小林純也、武田俊一 SUMO 研究会 (2016).01.22 大阪関西学院大 (大阪府・大阪市)
15. 分裂酵母 *fbp1* におけるクロマチン構造変化を利用した遺伝子発現制御機構の解明 酵母遺伝学 Forum (2014) 9月 1日 浅田隆大、廣田 耕志 (東京都・文京区)
16. SUMO 化タンパク質を認識する RING 型ユビキチンリガーゼ RNF4 による、スピンドルアセンブリチェックポイント(SAC)の活性維持と染色体ロスの防止 分子生物学会 (2014)11月 26日 廣田 耕志 (神奈川県・横浜市)
17. Tup family corepressor と CCAAT-binding factor によるクロマチン構造変化の拮抗的な制御が mRNA 転写開始点を決定する 分子生物学会 (2014) 11月 26日 浅田隆大、廣田 耕志 (神奈川県・横浜市)
18. SUMO ターゲットユビキチンリガーゼ (STubL)、RNF111 は複製ストレスシグナルに重要な役割を果たす 分子生物

- 学会 (2014) 11 月 27 日 廣田耕志
(神奈川県・横浜市)
19. 損傷乗り越え PrimPol と損傷乗り越え
ポリメラーゼ Pol / の関係 分子生
物学会 (2014) 11 月 27 日 小林香、
廣田耕志 (神奈川県・横浜市)
 20. 複製ポリメラーゼ POLD3/p66 サブユ
ニットはポリメラーゼ 経路と独立に
損傷乗り越えに寄与する 染色体ワーク
ショップ (2014)12 月 15 日 廣田耕志
(広島県・廿日市)
 21. 分裂酵母 *fbp1* におけるクロマチン構
造・ゲノム高次構造変化による遺伝子発
現制御機構の解明 染色体ワークショッ
プ (2014)12 月 15 日 浅田隆大、廣田
耕志 (広島県・廿日市)
 22. RNF4 は染色体ロスを防止する 染色体
ワークショップ (2014)12 月 15 日 高
木季代、廣田耕志 (広島県・廿日市)
 23. 損傷乗り越えにおける PrimPol と損傷
乗り越えポリメラーゼ Pol / の関係
染色体ワークショップ (2014) 12 月
15 日 小林香、廣田耕志(広島県・廿日
市)
 24. ニワトリ B リンパ球 DT40 細胞を用いた
遺伝毒物学手法による有害化学物質の
検出法の開発と、その応用による抗がん
シース化合物のスクリーニング MMS 研
究会 2013 年 5 月 31 日 廣田耕志
(招待講演)(長野県・諏訪郡・下諏訪
町)
 25. 遺伝子シナジーを作用原理とする抗が
ん治療薬品の探索 Biotech 2013 (お台
場) (2013)年 5 月 8 日 廣田耕志 (東
京都・江東区)
 26. クロマチンリモデリング因子 ALC1 は
PARP 経路による酸化ダメージ DNA 損傷
トレランスに必須の役割を果たす 遺
伝研研究会 (2013) 9 月 20 日 廣田耕
志 (静岡県・三島市)
 27. 染色体断裂はいつも DNA 2 重鎖切断が
原因とは限らない(招待講演)日本癌学
会 (2013) 10 月 4 日 廣田耕志 (神奈
川県・横浜市)
 28. クロマチンリモデリング因子 ALC1 は
PARP 経路による酸化 DNA 損傷トレラン
スに必須の役割を果たす 第 36 回日

本分子生物学会 (2013) 1 2 月 16 日
廣田耕志 (招待講演)(兵庫県・神戸
市)

〔図書〕(計 2 件)

1. DNA 損傷修復の概念提起からメカニズ
ム解明へ 廣田耕志 武田俊一 医学
の歩み (2015) 255, p857-859
2. 酵母 SRG1, mIonRNA による遺伝子発現制
御 浅田隆大 廣田耕志 実験医学増
刊 (2015) 33, p3272-3273

〔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
プレスリリース発表 2015 2/3
http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research/research_results/2014/150202_2.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣田 耕志 (Hirota Kouji)

研究者番号 : 00342840

首都大学東京 理工学研究科(分子物質化学
専攻) ・教授