

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K08580

研究課題名(和文) S期特異的な複製共役ヌクレオチド除去修復機構についての解析

研究課題名(英文) Analysis of S-phase specific replication coupled NER

研究代表者

丹伊田 浩行 (Niida, Hiroyuki)

浜松医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20336671

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：我々は紫外線(UV)照射後DNA損傷を修復するヌクレオチド除去修復(NER)に関わる新規細胞内因子の解析を行った。その結果ヒストンアセチルトランスフェラーゼHB01が損傷部位のヒストンH3K14をアセチル化することがISWIファミリーのクロマチンリモデリング因子をリクルートしてXPCなどのNERコア修復因子の集積を促進することを証明した。S期のHB01リン酸化はDNA複製阻害により活性化したATRにより行われNERが促進した。一方興味深いことにヒストンH3K14を脱アセチル化するヒストン脱アセチル化酵素HDAC3もXPCの損傷部位へのリクルートに働くことが明らかにされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

様々なDNA損傷に働くNER機構が破綻するとメラノーマなど遺伝子変異の多い癌の原因となる。我々の研究から細胞内でNERが正常に働くためにクロマチン構造をオープンにするヒストン修飾と反対にクロマチンをクローズするヒストン修飾両方が必要とされることが示された。この結果はDNA修復過程においてダイナミックな染色体構造の変換が能動的に起こることを意味しており細胞内のNERを理解する一助となる。NERに必要な新たな因子をモニターすることで癌の早期発見など臨床的な応用も可能となる。

研究成果の概要(英文)：We analyzed a novel intracellular factor involved in nucleotide excision repair (NER) that repairs DNA damage after ultraviolet (UV) irradiation. As a result, it was demonstrated that histone acetyltransferase HB01 acetylates histone H3K14 at the damage site to recruit chromatin remodeling factors of ISWI family and promote accumulation of NER core factors such as XPC. HB01 phosphorylation in S phase was carried out by ATR that was activated during inhibition of DNA replication. On the other hand, interestingly, it was revealed that the histone deacetylase HDAC3, which deacetylates histone H3K14, also plays a role in recruitment to the damaged site of XPC.

研究分野：DNA損傷修復

キーワード：紫外線 ヌクレオチド除去修復 ヒストン アセチル化 脱アセチル化 HB01 HDAC3

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は紫外線(UV)照射による DNA 損傷に反応する細胞内機構に関心を持ち、UV 照射後、活性化するチェックポイントのキナーゼ ATR の基質について解析を行った。ATR はアミノ酸の S/T-Q 配列を基質のコンセンサス配列としているが、この配列のリン酸化を認識する抗体を用いたスクリーニングにより HBO1 が同定された。HBO1 は DNA 複製開始時に機能するヒストンアセチルトランスフェラーゼであると報告されていたので、ATR によるリン酸化は DNA 複製過程において DNA 複製や修復を制御する働きがあるものと予想し研究を開始した。

2. 研究の目的

ATR の基質はチェックポイントや DNA 修復を発動するシグナルである場合が多いので HBO1 のリン酸化もこれらに関与しているものと思われた。リン酸化は UV 照射後に顕著に増加し、これを阻害すると HBO1 のユビキチン化分解が抑制された。またこのユビキチン化を行うユビキチンリガーゼは CRL4-DDB2 であることから HBO1 が NER に関与することが示唆された。我々はリン酸化 HBO1 が S 期に機能し NER に関与することを明らかにするため機能解析を行うことにした。

3. 研究の方法

研究の方法としてヒトのガン細胞株およびヒト初代繊維芽細胞を用いた。ヒトガン細胞株は HeLa および U2OS 細胞を siRNA, shRNA でノックダウンし研究に使用した。ヒト初代繊維芽細胞は正常および色素性乾皮症患者由来の細胞を用いた。

既知 NER 因子の損傷部位への集積は局所的紫外線照射(Local UV irradiation)を行い、それぞれに特異的抗体を用いて集積した分子を間接的に蛍光量を定量することで解析をした。また蛍光標識したリコンビナント NER 関連タンパクを細胞内に発現させ生きている細胞内における挙動をモニターした。

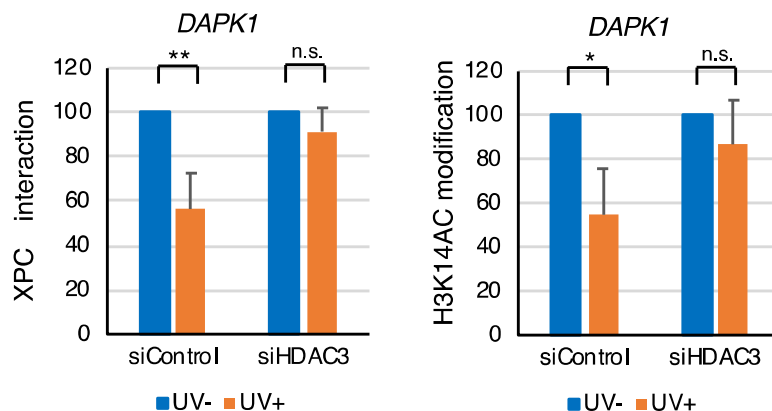
4. 研究成果

(1) HBO1 は UV や DNA 複製阻害により S50 および S53 が ATR によりリン酸化されることを明らかにした。このリン酸化は CRL4-DDB2 によるユビキチン化を誘導し UV 照射後 2 時間以降に HBO1 タンパクを分解へと導いた。HBO1 の分解はクロマチンのヒストン H3K14 のアセチル化を低下させることから HBO1 がヒトの細胞では主として H3K14 をアセチル化する酵素であることが明らかとなった。

(2) UV 照射後 CRL4-DDB2 依存的に HBO1 は分解されるものの分解されるまでの間 HBO1 は DDB2 と結合し損傷部位へ局在することを発見した。HBO1 をノックダウンすると NER の DNA 損傷に認識に働く XPC の損傷部位への集積が遅延することから HBO1 は XPC よりも上流で働き NER に必須の因子であることが示唆された。HBO1 のリン酸化は S 期において DNA 複製が阻害された時に ATR により速やかに行われるので S 期に NER を促進する働きを持つものと示唆される。HBO1 依存的に DNA 損傷部位周辺のヒストンはアセチル化されるので XPC の集積にはヒストンのアセチル化を介したものであると思われる。ヒストン H3K14 のアセチル化はヒストン H3K4 のトリメチル化(me3)を誘導することも示された。H3K4me3 は ISWI ファミリーのクロマチンリモデリング因子をリクルートすることが報告されている。我々の研究でも Local UV されたクロマチン上に ACF1-SNF2H

がリクルートされることを見出している。

NER において HBO1 によるヒストン H3K14 アセチル化が影響することがわかったため、逆に H3K14 を脱アセチル化する酵素の NER における影響を検討した。H3K14 を脱アセチル化するヒストン脱アセチル化酵素として HDAC3 が同定された。驚くことに HDAC3 もロックダウンされると XPC の損傷部位への局在に欠陥を来すことが示された。H3K14 のアセチル化に関し正負に制御する相対する酵素活性どちらも XPC の正常なリクルートに必須であることが明らかとなった。この一見矛盾する現象はヒストン H3K14 のアセチル化が時間的空間的にことなるところで必要とされるのではないかと予想した。そこで XPC が DNA ダメージのない状態の時に局在している既知の領域 (DAPK1 promoter など) を標的として ChIP assay を行い、XPC の挙動を検討すると UV 照射前に DAK1 promoter に局在していた XPC は UV 照射後に遊離し、そのときヒストン H3K14 は脱アセチル化されることを見出した (図 1)。この結果は XPC の遊離にヒストン H3K14 の脱アセチル化が必要とされ、XPC の損傷部位への供給に働くのかもしれないことを示唆する。



(図 1) DAPK1 promoter 上の XPC は UV 照射後遊離する。このとき HDAC3 依存的に promoter のヒストン H3K14 は脱アセチル化する。

参考文献

Matsunuma R, Niida H*, Ohhata T, Kitagawa K, Sakai S, Uchida C, Shiotani B, Matsumoto M, Nakayama KI, Ogura H, Shiiya N, Kitagawa M.: UV Damage-Induced Phosphorylation of HBO1 Triggers CRL4DDB2-Mediated Degradation To Regulate Cell Proliferation. *Mol Cell Biol.* 36: 394-406, 2015.

Niida H*, Matsunuma R, Horiguchi R, Uchida C, Nakazawa Y, Motegi A, Nishimoto K, Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Moriwaki S, Nishitani H, Ui A, Ogi T, Kitagawa M.: Phosphorylated HBO1 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair. *Nat Commun.* 8:16102. doi: 10.1038/ncomms16102., 2017.

Nishimoto K, Niida H*, Uchida C, Ohhata T, Kitagawa K, Motegi A, Suda T, Kitagawa M: HDAC3 is required for XPC recruitment to DNA damage sites after UV irradiation. *Mol Cancer Res.* In press. 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakanishi K, Niida H, Tabata H, Ito T, Hori Y, Hattori M, Johmura Y, Yamada C, Ueda T, Takeuchi K, Yamada K, Nagata K, Wakamatsu N, Kishi M, Pan YA, Ugawa S, Shimada S, Sanes JR, Higashi Y, Nakanishi M	4. 巻 11
2. 論文標題 Isozyme-Specific Role of SAD-A in Neuronal Migration During Development of Cerebral Cortex.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cereb Cortex	6. 最初と最後の頁 1-14
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cercor/bhy253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Niida H, Matsunuma R, Horiguchi R, Uchida C, Nakazawa Y, Motegi A, Nishimoto K, Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Moriwaki S, Nishitani H, Ui A, Ogi T, Kitagawa M.	4. 巻 8
2. 論文標題 Phosphorylated HB01 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/NCOMMS16102	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroyuki Niida
2. 発表標題 Cooperative function of HAT and HDAC facilitate nucleotide excision repair
3. 学会等名 Gordon Research Conferences 2019 Mammalian DNA Repair (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 丹伊田浩行
2. 発表標題 紫外線によるDNA損傷修復におけるヒストン修飾の意義
3. 学会等名 太陽紫外線防御研究委員会第28回シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 丹伊田浩行
2. 発表標題 DDB2依存的なHB01のリクルートはヌクレオチド除去修復に必須である
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2016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
--	---------------------------	-----------------------	----