

平成21年 5月 22日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007～2008

課題番号：19810007

研究課題名(和文) ユビキチン化によるDNA複製停止解除の制御機構の解明

研究課題名(英文) Ubiquitin-dependent regulation of DNA replication arrest

研究代表者

茂木 章 (MOTEGI AKIRA)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80452332

研究成果の概要：

本研究では、ヒトユビキチンリガーゼHLTFが、出芽酵母Rad5の機能的ホモログであり、PCNAのポリユビキチン化を介して、複製ポリメラーゼの停止解除を促進することを明らかにした(PNAS 2008 論文発表)。また、DNA二本鎖切断の修復の際にUBC13と共役して働くユビキチンリガーゼの一つRNF8の遺伝子破壊DT40株を作製し、その表現型解析を行った。これにより、RNF8が相同組み替え修復を促進することを明らかにした(Keystone Symposia 2009 学会発表)。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,320,000	0	1,320,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：組換え修復、複製後修復、ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

染色体の転座・欠失などの「染色体再編成：gross chromosomal rearrangements (GCRs)」はヒト癌で非常に頻りに観察され、癌の根源的原因である。多くのGCRはDNAの複製時に発生する。すなわち、酸化DNA損傷やシスプラチンによる損傷部位で複製ポリメラーゼが停止した時に、停止部位で稀にDNA断裂が起き、その結果、染色体転座・欠失が起こる。従って、複製停止の解除機構の理解は、効率的な癌の予防・治療を考える上で重要である。

出芽酵母では、DNA複製停止は「Rad18依存的乗り越え修復」、「Rad5依存的乗り越え修復」

および、「組み替え依存的修復」によって解除される。Rad18及びRad5はユビキチンリガーゼであり、それぞれ、DNAポリメラーゼに付随する複製促進因子である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) のリシン164 (K164) をモノユビキチン化、ポリユビキチン化することで、DNA複製停止の解除を促進する。

研究代表者は、永らく不明であったヒトRad5オーソログ SHPRH, HLTF (ユビキチンリガーゼ) を発見した (Motegi et al, 2006)。また、研究代表者が2007年5月に移籍した京大グループは、Rad5と共役して働く

なると考えられる。

研究代表者は、Myung 研究室所属時に SHPRH 欠損マウスを作成した。また、共同研究として HLTf 欠損マウスを作成した。これら欠損マウスより作製した MEF 細胞では、MMS 処理後の PCNA のポリユビキチン化、細胞生存率の低下、及び染色体断裂率の上昇が見られた (Motegi, et al, PNAS 2008)。

2) Ubc13 と共役して働くユビキチンリガーゼ RNF8 の遺伝子破壊 DT40 細胞株の作製と機能解析

「Rad18 依存的乗り越え修復」および「Rad5 依存的乗り換え修復」によって解除されない複製フォークブロックは、相同組換えによって修復される。京大グループは、脊椎動物 Ubc13 が、相同組換え修復において重要な役割を持つことを明らかにした。また、これまでの研究から、相同組換え修復において UBC13 と共役して働くユビキチンリガーゼの一つとして RNF8、基質の一つとしてヒストン H2AX が示唆された。そこで本研究では、RNF8 遺伝子破壊 DT40 株を作製した (図 5A, B)。

図 5A 遺伝子破壊ベクターの作製

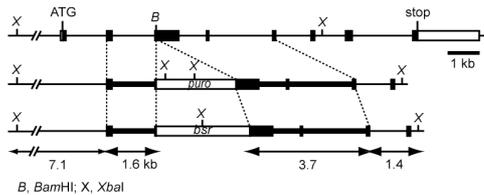
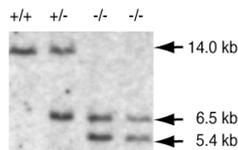
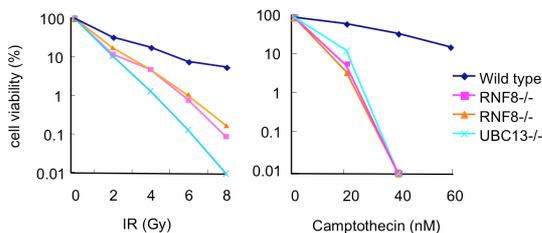


図 5B サザン法による遺伝子破壊の確認

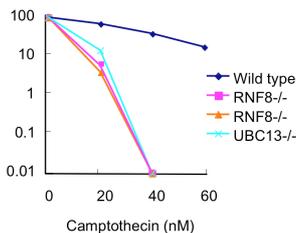


RNF8 遺伝子は DT40 細胞の生存に必須ではなく、細胞の増殖速度も野生株とほぼ同様であった。はじめに、RNF8 の DNA 損傷応答における機能を知るために RNF8 欠損細胞の各種 DNA 損傷に対する感受性を調べた。その結果、RNF8 欠損細胞は、DNA の二本鎖切断を引き起こす γ 線に対して中等度の感受性の亢進を示し、また、トポイソメラーゼ

図 6A



6B

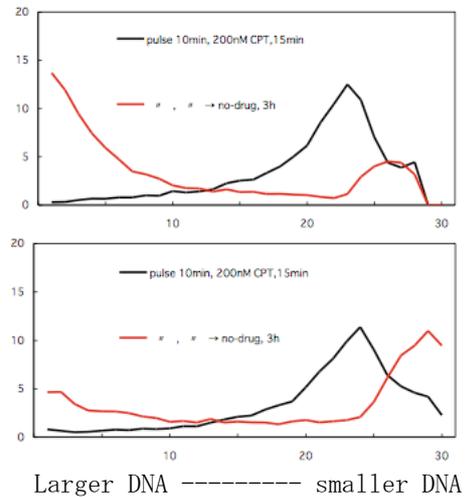


I 阻害剤であるカンプトテシンに対して強い感受性を示した (図 6A, B)。

γ 線は、直接 DNA 二本鎖切断を引き起こし、 γ 線による切断は、非相同末端結合、および相同組換えによって修復される。これに対してカンプトテシンは、複製依存的に DNA 二本鎖切断を引き起こし、主に相同組換えによって修復される。従って、RNF8 は、主に相同組換えによる DNA 二本鎖切断の修復に貢献していることが強く示唆される。

新生 DNA 鎖をアルカリ条件下でスクロース濃度勾配によって分離することで、複製に伴う新生 DNA 鎖の切断の修復効率を測定することができる。RNF8 欠損細胞では、カンプトテシンで処理後の新生 DNA 鎖の切断の修復効率が低下していることが観察された (図 7)。

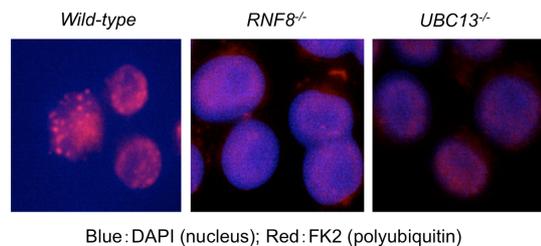
図 7 (上図、野生株; 下図、RNF8 欠損株)



更に、 γ 線照射部位にポリユビキチン化が集積することが知られているが、RNF8 欠損細胞では、このポリユビキチン化の集積が顕著に減少していた (図 8)。

今後、更に RNF8 欠損細胞の表現型解析を行うことにより、RNF8 の相同組換え修復への関与を明らかにする予定である。

図 8



Blue: DAPI (nucleus); Red: FK2 (polyubiquitin)

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 6 件)

Akira Motegi, Yasuhiro Murakawa, and Shunichi Takeda, Roles of proteasome in DNA repair: impacts of proteasome inhibitors on cancer therapy. *Cancer lett.* (2008) in press 総説・査読あり

Akira Motegi, Hung-jiun Liaw, Kyoo-Young Lee, Henk P. Roest, Alex Maas, Xiaoli Wu, Helen Moinova, Sanford D. Markowitz, Hao Ding, Jan H. J. Hoeijmakers, and Kyungjae Myung, Lysine 63-linked polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105:12411-12416 (2008) 査読あり

Soma Banerjee, Stephanie Smith, Ji-Hyun Oum, Hung-Jiun Liaw, Ji-Young Hwang, Nilabja Sikdar, Akira Motegi, Sang Eun Lee, and Kyungjae Myung, Mph1 promotes gross chromosomal rearrangement through partial inhibition of homologous recombination. *J. Cell Biol.* 181:1083-1093 (2008) 査読あり

茂木 章 武田俊一、抗がん剤で考えるDNA組み換えの制御機構、タンパク質・核酸・酵素別冊 54 (4):450-458 (2009) 査読なし

茂木 章 村川泰裕 武田俊一、ユビキチン化による DNA 修復の制御機構、実験医学別冊 26 (2):62-70 (2008) 査読なし

茂木 章 村川泰裕 武田俊一、ユビキチン化による DNA 修復の制御機構、細胞工学 26 (11):1290-1295 (2007) 査読なし

〔学会発表〕(計 9 件)

Saho Era, Yohei Kasaishi, Shunichi Takeda, and Akira Motegi, Functional analysis of the ubiquitin ligase RNF8 in DNA repair Keystone Symposia (Genome Instability and Repair), March 1-6th, 2009, Taos, NM, USA

Akira Motegi, Hung-jiun Liaw, Kyoo-Young Lee, Henk P. Roest, Alex Maas, Xiaoli Wu, Helen Moinova, Sanford D. Markowitz, Hao Ding, Jan H. J. Hoeijmakers, and Kyungjae Myung, Lysine 63-linked polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks, Gordon Research Conference (Mammalian DNA Repair),

Februray 8-13th, 2009, Ventura, CA, USA

Hung-jiun Liaw, Akira Motegi, Kyoo-Young Lee, Henk P. Roest, Alex Maas, Xiaoli Wu, Helen Moinova, Sanford D. Markowitz, Hao Ding, Jan H. J. Hoeijmakers, and Kyungjae Myung, Human ubiquitin ligases HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks, Gordon Research Conference (Mammalian DNA Repair), Februray 8-13th, 2009, Ventura, CA, USA

Junko Iijima, Akira Motegi, Toru Fukushima, Yoshihito Taniguchi, and Shunichi Takeda, Chicken Rap80 promotes repair of topoisomerase II poison-induced DNA damage, Gordon Research Conference (Mammalian DNA Repair), Februray 8-13th, 2009, Ventura, CA, USA

Akira Motegi, Hung-jiun Liaw, Kyoo-Young Lee, Henk P. Roest, Alex Maas, Xiaoli Wu, Helen Moinova, Sanford D. Markowitz, Hao Ding, Jan H. J. Hoeijmakers, Shunichi Takeda, and Kyungjae Myung, Lysine 63-linked polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen by HLTF and SHPRH prevents genomic instability from stalled replication forks, The 6th International 3R Symposium 2008, October 27-30th, 2008, Tsumagoi, Japan

Akira Motegi, Hung-jiun Liaw, Raman Sood, Helen Moinova, Sanford D. Markowitz, Pu Paul Liu, Kyungjae Myung, and Shunichi Takeda, Human SHPRH and HLTF suppress genomic instability through the lysine-63-linked polyubiquitination of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008, April 22-26th, 2008 Otsu, Japan

Xin Wang, Akira Motegi, and Shunichi Takeda, Human PTIP Is Implicated in a Late Step of Homologous Recombination-mediated Double Strand Breaks (DSBs) Repair The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2008, April 22-26th, 2008 Otsu, Japan

Hungjiun Liaw, Akira Motegi, Kyoo-Young Lee, and Kyungjae Myung, Human post-replication repair pathway by the Rad5 homolog SHPRH in the suppression of genomic instability, Keystone Symposia

(Genome Instability and Repair), February
10-15th, 2008 Santa Fe, NM, USA

Akira Motegi, Hungjiun Liaw, Kyoo-Young
Lee, Shunichi Takeda, and Kyungjae Myung,
Human SHPRH and HLTf suppress genome
instability through PCNA
polyubiquitination, 2007 Annual Meeting
of Molecular Biology Society of Japan
(Symposium), December 11-15th, 2007
Yokohama, Japan

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

茂木 章 (MOTEGI AKIRA)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：80452332

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし