

令和 5 年 6 月 16 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07578

研究課題名(和文) RNF168が制御する新たなRNA代謝経路とそれが寄与するがん増殖の分子機構

研究課題名(英文) A crosstalk between RNA metabolic pathway and DNA damage response involved in the mechanism of cancer growth

研究代表者

渡邊 健司 (WATANABE, Kenji)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 がん生物部・研究員

研究者番号：80404333

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷応答反応の初期段階に寄与しDNA2重鎖切断部位にごく早期に集積することが知られているMDC1が通常の細胞活動においても、スプライシング複合体を制御することによって一連のRNA転写およびスプライシング反応を恒常的に制御していることを明らかにした。またMDC1をロックダウンした骨肉腫細胞株ではRNAポリメラーゼIIの転写を抑制する薬剤に対して抗感受性を示すことが分かった。これによりDNA損傷応答機構と転写制御機構やpre-mRNAスプライシング制御機構が共通の因子であるMDC1によって制御されていることが本課題によって解明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA損傷応答反応の初期段階に寄与するMDC1が通常の細胞活動において、一連のRNA転写およびスプライシング反応を恒常的に制御していることを明らかにした。これによりDNA損傷応答機構と転写制御機構やRNA代謝経路が共通の因子であるMDC1によって制御されていることが本課題によって解明された。このことは、これらいずれの経路も活性化し薬剤抵抗性を示すことが知られている“がん幹細胞”を標的としたがんの分子標的治療開発の研究分野において、DNA損傷応答反応とRNA転写機構を標的とした効率的な治療法の開発など一定の波及効果が認めると考えられる。このようにがん研究分野での橋渡し研究が発展すると期待される。

研究成果の概要(英文)：MDC1 accumulates at the site of DNA double-strand break(DSB), which is known to contribute to the early stage of the DNA damage response and repair. It was newly revealed that MDC1 also regulates the splicing complex during normal cell activity, leading to an efficient RNA transcription elongation and splicing. Moreover, MDC1 was involved in de novo RNA synthesis at the DSB, which contributes to facilitating the homologous recombination, an essential pathway for DSB repair. It was also revealed that MDC1-depleted osteosarcoma cell lines exhibit sensitivity to agents that inhibit the transcription of RNA polymerase II. As a result, it was elucidated by this project that the DNA damage response mechanism, the transcriptional control mechanism, and the process of pre-mRNA splicing are efficiently regulated by MDC1.

研究分野：DNA損傷応答

キーワード：DNA損傷応答 転写機構 がん

1. 研究開始当初の背景

染色体上の DNA は、外因性および内因性の損傷に常にさらされている。損傷した DNA は癌などの致命的な疾患につながる可能性があるため細胞内に備わった DNA 損傷応答機構によってそのシグナルが細胞全体に拡散され、DNA 損傷の程度に応じ細胞周期の停止、転写・翻訳の停止、DNA 修復が行われ、細胞機能が回復されるか、そうでなければ細胞老化または細胞死が選択される。例えば、細胞が電離放射線に曝された直後に DNA 二重鎖切断 (DSB) のごく近傍のクロマチン上でヒストン H2AX がユビキチン化されることが知られている。このヒストン修飾はタンパク質を分解に導くユビキチン化ではなく、リジン 63 を介したポリユビキチン化によって DSB 依存的に修飾されることが分かっている。このユビキチンによるデノボヒストン修飾は、RNF8 と RNF168 2つのユビキチンリガーゼ (E3 リガーゼ) が触媒することによって DSB 周囲のクロマチン上のヒストン H2AX に広がりこのユビキチン化がさらに DNA 修復や細胞周期を停止する実際の役割を担うタンパク質を DSB 周囲に呼び込む“シグナルカスケード”となっていることが知られている。これらの E3 リガーゼのノックアウトマウス由来の細胞が DSB を引き起こす薬剤や放射線照射に対して野生型細胞より高感受性であることから、これらの E3 リガーゼが細胞内に DSB が生じた際に重要な機能を担っていることからわかっている。H2AX をノックダウンした細胞において DSB 周囲のユビキチン化シグナルは完全に消失しないことより、これらの E3 リガーゼのクロマチン上での基質が H2AX 以外に存在することが考えられている。しかしながら現在までヒストンを除いてそれらの基質はほとんど知られていない。申請者は RNF168 のクロマチン上でのヒストン以外の基質を特定するためのスクリーニングによって新たな RNF168 の基質として RNA polymerase II (pol II) と複合体を形成し転写及びスプライシングや翻訳開始といった一連の RNA 代謝経路に関与していることが知られている基質候補タンパク質を同定した。先行研究において RNF8 と RNF168 が DNA 二重鎖損傷後におけるヒストンのポリユビキチン化を介して一時的に転写を抑制することは知られている (Shanbhag NM et al, *Cell* 2010)。しかし DNA 損傷時以外において、これらの E3 リガーゼが恒常的に一連の RNA 代謝経路を制御しているという報告はほとんどない。今課題において、これら DNA 損傷応答に関与する E3 リガーゼが DNA の損傷存在下や通常状態において、どのように RNA 代謝経路の制御を行ない、その破綻ががんの増殖進展へ寄与しているかを検討することである。

2. 研究の目的

これまで RNF168 の機能は DNA 二重鎖切断における損傷応答反応についてのみ報告されてきた。本研究で DNA 損傷時のみならず、通常の細胞活動においてこれら DNA 損傷応答反応に寄与するユビキチン E3 リガーゼが一連の RNA 代謝経路を恒常的に制御していることを明らかにしようとするのが今課題の目的である。また、DNA 損傷応答機構と転写制御機構や RNA 代謝経路が共通の因子である E3 リガーゼ、RNF168 によって制御されていることが本課題によって解明されることになる。このことは、これらいずれの経路も活性化し薬剤抵抗性を示すことが知られている“がん幹細胞”を標的としたがんの分子標的治療開発の研究分野において、RNF168 を標的とした効率的な治療法の開発など一定の波及効果が認めると考えられる。このようにがん治療研究分野での基礎研究からがん治療への橋渡し研究が発展すると期待される。

3. 研究の方法

クロマチン上で DNA 損傷応答反応に寄与する E3 リガーゼである RNF168 の基質を同定する目的で RNF168 をノックダウンした骨肉腫細胞株 (U2-OS) において SILAC (Stable isotope labeling with amino acids in cell culture)法を用いて網羅的にユビキチン化されたペプチドの増減を量的に質量分析で解析した。その結果に基づいて、基質候補である転写及びスプライシングに関与することが知られているタンパク質についてその機能とユビキチン化修飾による機能制御について検討する。これら基質候補タンパク質と E3 リガーゼの結合が X 線照射や抗がん剤などの DNA 損傷依存的に増加するかを検討する。がん細胞内で RNF168 のノックダウンにおいて転写やスプライシング反応の効率など RNA 転写機能に影響が認められるかについて検討する。また基質候補タンパク質において、RNF168 によってユビキチン化されるリジン残基を同定し、そのユビキチン化変異体タンパク質を恒常的に発現するがん細胞株を作成する。これら変異ユビキチン化変異体をもたらす転写開始、転写伸長反応における機能異常を明らかにする。

4. 研究成果

RNF8、RNF168 の新たな基質としての RNA の転写及びスプライシング因子の発見

E3 リガーゼである RNF8、RNF168 の基質候補として RNA の転写及びスプライシングに関与することが知られているいくつかのタンパク質が SILAC によるスクリーニングにより見いだすことができた。その個々のタンパク質について実際これら E3 リガーゼの基質であるかどうか検討を行った。図 1 に示すように RNA の転写及びスプライシングに関与することが知られているタンパク質 NONO 及び PLRG1 についてその検討を行った。NONO に関しては RNF8、RNF168 いずれも細胞内で NONO のユビキチン化に関与していることが示唆された(図 1 左)。PLRG1 に関しては野生型の RNF168 を発現させた細胞では効率よくポリユビキチン化されることが観察された。しかし RNF168 のユビキチン化反応に重要なドメインである RING ドメインを欠く変異体(RNF168 Δ RING)では PLRG1 のポリユビキチン化を促進することができなかった(図 1 右)。以上の結果より DNA 二重鎖切断における損傷応答に寄与する E3 リガーゼの新たな基質として転写及びスプライシングに関与するタンパク PLRG1 及び NONO を同定することができた。

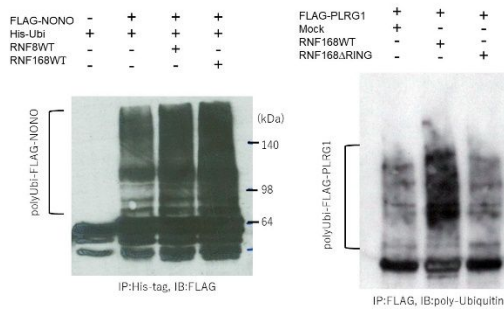


図 1 RNF8 及び RNF168 の新規の基質としてスプライシング因子 NONO、PLRG1 の同定

DNA 損傷によらないユビキチン E3 リガーゼと転写及びスプライシング因子との恒常的な結合
上記のこれら E3 リガーゼと基質の結合が DNA 損傷、特に DSB 依存的に増加するかを検討した。これら E3 リガーゼの基質である PLRG1 は DNA 損傷を誘導する前より恒常的に結合していることが分かった。DNA の二重鎖切断が誘導された場合でもこれらの結合に明らかな増加を認めなかった(図 2)。

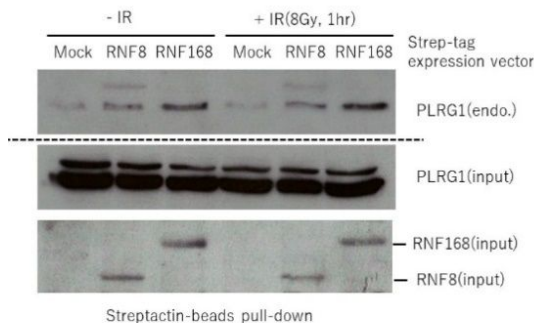


図 2 RNF8 及び RNF168 と基質である PLRG1 との DNA 損傷非依存的な結合

これらの結果より DNA 損傷応答に関与する E3 リガーゼである RNF8 及び RNF168 は転写及びスプライシング因子と恒常的に結合しており、転写、スプライシング機能を通常状態においてもユビキチン化によって制御している可能性が示唆された。

DNA 損傷応答タンパクと転写及びスプライシング因子による DNA 損傷非依存的な転写スプライシング機能の制御

DNA 損傷応答に関与する E3 リガーゼと転写を制御するタンパク質の相互作用を見る際に損傷応答反応に重要な役割を担う MDC1 タンパク質に着目した。このタンパク質は DSB が細胞内に生じると DNA 二重鎖切断部位に集積し、細胞内シグナル伝搬や DNA 切断部位への DNA 修復タンパク質集積の足場としての役割を担っていることが知られている。また、MDC1 は SILAC を用いたスクリーニングでも E3 リガーゼの基質候補であることが今回分かった。この MDC1 がスプライシング因子である PLRG1 と細胞内で結合していることを新たに見出した。また PLRG1 以外のスプライシング複合体を構成するタンパク質である PRPF8、CDC5L や pol II とも MDC1 が結合していることを見出した。これらスプライシング複合体を構成するタンパク質は MDC1 をノックダウンすることによって複合体構成因子がスプライソソームから解離することを見出した。しかし予想に反して、この複合体構成因子がスプライソソーム内に留まるためには RNF168 のユビキチン化は必要ではなかった。MDC1 をノックダウンすることにより外因性の DNA 損傷を誘導しない場合において pol II の伸長反応とスプライシング効率が低下することが分かった。

MDC1 による DNA 損傷部位での de novo RNA 転写制御

DNA 二重鎖切断損傷部位では新たな RNA 合成が DNA 切断断端部で一過性に行われることにより DNA の相同組み換え修復機構を促進することが報告されている。この DNA 二重鎖切断損傷部位での新規の RNA 合成に MDC 1 タンパク質が必要であることを明らかにした。

MDC1 をノックダウンした骨肉腫細胞株では CDK7 阻害剤に高感受性を示す

CDK7 阻害剤である THZ1 は RNA ポリメラーゼ II の CTD のリン酸化を阻害し転写抑制作用があることが知られている。今回 MDC1 をノックダウンした骨肉腫細胞株では THZ1 に、より高感受性になることが分かった。実際乳がんや肺がんの臨床検体では MDC1 タンパク質の発現が低くなっていることが知られており THZ1 がこれらのがん治療戦略として有効であるかもしれないことが示唆された。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Pappas George, Munk Sebastian Howen Nesgaard, Watanabe Kenji, Thomas Quentin, G?l Zita, Gram Helena Hagner, Lee MyungHee, G?mez-Cabello Daniel, Kanellis Dimitris Christos, Olivares-Chauvet Pedro, Larsen Dorthe Helena, Gregersen Lea Haarup, Maya-Mendoza Apolinar, Galanos Panagiotis, Bartek Jiri	4. 巻 42
2. 論文標題 MDC1 maintains active elongation complexes of RNA polymerase II	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 111979 ~ 111979
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.111979	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 該当する

1. 著者名 Matsumori Haruka, Watanabe Kenji, Tachiwana Hiroaki, Fujita Tomoko, Ito Yuma, Tokunaga Makio, Sakata-Sogawa Kumiko, Osakada Hiroko, Haraguchi Tokuko, Awazu Akinori, Ochiai Hiroshi, Sakata Yuka, Ochiai Koji, Toki Tsutomu, Ito Etsuro, Goldberg Ilya G, Tokunaga Kazuaki, Nakao Mitsuyoshi, Saitoh Noriko	4. 巻 5
2. 論文標題 Ribosomal protein L5 facilitates rDNA-bundled condensate and nucleolar assembly	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 e202101045
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.26508/lsa.202101045	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 該当する

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------