

令和 5 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K12161

研究課題名(和文) BioIDシステムを利用したDNA修復因子SLX4の制御機構の解析

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism for recruitment of SLX4 by BioID-based identification of novel interactors

研究代表者

勝木 陽子 (Katsuki, Yoko)

九州大学・薬学研究院・助教

研究者番号：00645377

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNA修復因子SLX4はファンconi貧血の原因遺伝子産物の一つで、ユビキチン結合(UBZ4)ドメインを介してDNA損傷部位に局在することで、DNAクロスリンク修復に寄与すると考えられている。我々は先行研究で、SLX4のN末フラグメントを用いて、その局在を制御するE3リガーゼRNF168を同定した。本研究では近位依存性ビオチン標識法(BioID)を用いて、SLX4-N結合因子の探索を行った結果、いくつかのクロマチンリモデリング複合体因子が検出された。本研究の結果から、これまであまり知られていなかった、SLX4局在とICL修復へのクロマチンリモデリングの関与の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでICL修復におけるクロマチン構造変換の重要性についてはあまり研究が進んでいなかった。DNAクロスリンク(ICL)修復の分子基盤の研究においては、アフリカツメガエルを用いたCell free システムを材料とした解析が最も進んでいるが、巨大なゲノムDNAと複雑に制御されたクロマチン高次構造を持つ哺乳類の複製ストレス応答にはクロマチン構造変換が必須であることが考えられる。本研究をさらに詳細に解析することで、ヒト細胞におけるICL修復の全体像の一端を明らかにすることができると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The gene encoding DNA repair protein SLX4 is a responsible gene of Fanconi anemia, and it is thought that SLX4 contributes to DNA interstrand crosslink (ICL) repair by localizing to the damage sites via its ubiquitin binding domain UBZ4. Previously, we identified RNF168 as an E3 ubiquitin ligase participating in the recruitment of SLX4 by siRNA screen using the N-terminal half of SLX4 (SLX4-N). In this study, proximity-dependent biotin identification (BioID) was performed in order to find the interacting factors with SLX4-N, and several components of the chromatin remodeling complex were discovered. Although the requirement of chromatin remodeling for ICL repair has been little studied, this finding indicates that chromatin remodeling factors may be involved in the localization of SLX4 to ICL sites in mammalian cells.

研究分野：DNA修復

キーワード：ファンconi貧血経路 SLX4 ユビキチン化 BioID フォーカス形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類においてゲノムの損傷を修復する遺伝子の欠損は、重篤な先天性遺伝病や、遺伝性発がんの原因となる。本研究の研究対象であるファンconi貧血(FA)は、臨床的には骨格異常、再生不良性貧血、高発がん性の三主徴を呈し、細胞学的には染色体断裂とDNA架橋剤に対する高感受性が特徴である。患者の造血幹細胞でみとめられるゲノム損傷は、細胞内のアルデヒドによるDNAクロスリンク損傷(interstrand crosslink, ICL)の修復欠損に起因することが示唆されている。FAはすでに22の原因遺伝子が同定されており、これらの遺伝子群産物からなる分子経路はFA経路と呼ばれるが、FA発症の分子基盤には多くの不明点が残されている。

FAの原因遺伝子産物SLX4/FANCPは、酵母からヒトまで保存されたDNA修復因子で、構造特異的エンドヌクレアーゼ群をはじめとする様々な分子と複合体をつくるスカフォールドタンパク質である(Fekairi S et al. Cell 2009)。FA経路を介したICL修復において、SLX4はエンドヌクレアーゼXPFと複合体を形成し、DNA切断によってクロスリンク損傷を取り除く”unhooking”と呼ばれるステップで働く。そのために重要な機能ドメインのひとつが、ユビキチン結合ドメインUBZ4である(Kim Y et al. Blood 2013)。UBZ4ドメインの大部分が欠失するSLX4変異は修復異常を引き起こし、患者はFAを発症する(Kim Y et al. Nat Genet 2011, Stoepker C et al. Nat Genet 2011)。先行研究からSLX4のUBZ4ドメインは線虫やカエル、トリ、哺乳類のSLX4で保存されているが、いずれの種においても、結合するユビキチン化基質タンパク質や、そのE3ユビキチンリガーゼ等のユビキチン化経路因子は明らかにされておらず、またFAコア複合体やFANCD2など、canonicalなFA経路因子がSLX4の集積に必須であるか否かも不明であった。

代表者らはICL修復に必須のドメインが集約されているSLX4のN末アミノ酸配列(SLX4-N, 1-900 aa)を用いて、損傷部位への集積を指標にsiRNAスクリーニングを行ったところ、UBZ4依存的なSLX4の集積に必要なE3リガーゼRNF168を同定し、ICL修復におけるRNF168の機能解析を進めてきた。

2. 研究の目的

本研究では先行研究で同定したRNF168について、ICL修復におけるその機能解析を引き続き行うこととした。さらに、通常のアフィニティー精製技術による検出が困難な、不安定な相互作用の探索に有効である、近位依存性ピオチン標識法(BioID)を用いてUBZ4に結合するユビキチン化基質の同定、およびその因子のICL修復における機能解析を本研究の目的とした。これらの検討により、SLX4の集積を介してICL修復を司る、未同定のユビキチン化経路を明らかにしたいと考えた。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞染色体上における大腸菌由来*lacO*-LacR相互作用を利用したRNF168依存的なSLX4集積の検討

オランダのvan Haico博士のグループの先行研究(Luijsterburg MS et al. eLife 2017)において、大腸菌由来*lacO*リポートを導入したヒト細胞株に、*lacO*結合タンパク質LacRを融合させたRNF168を発現させると、*lacO*領域に非特異的なユビキチン化を誘導できることが報告された。同博士との共同研究により同じ系を用いて、LacR-RNF168依存的なSLX4-Nの集積を検討した。

(2) 低濃度MMC添加後におけるRNF168ノックアウト細胞のG2 arrestの解析

FA細胞では、マイトマイシンC(MMC)等ICL誘導剤の添加後、修復が遅延することでG2期

での細胞周期停止が認められる。我々は HCT116 細胞において、CRISPR-Cas9 により RNF168 ノックアウト(KO)細胞および、KO 細胞に RNF168 の発現を安定的に相補した細胞株を樹立した。RNF168KO 細胞で、FA の特徴である MMC 添加後の G2 arrest が観察されるかどうか、また RNF168 相補により G2 期停止の解除が認められるかを検討するため、フローサイトメトリーにより解析した。

(3) PLA を用いた、トリメチルソラレン存在下での UV-A 照射による ICL 損傷部位への内在性 SLX4 集積の検討

ヒト細胞において、内在性に発現している SLX4 が RNF168 依存的に ICL 損傷部位に局在するかどうか、RNF168 ノックダウン時、およびノックアウト細胞を用いて PLA(proximity ligation assay)による検討を行った。ICL は Digoxigenin(Dig)で標識したトリメチルソラレン(Dig-TMP)添加後 UV-A を照射することで誘導した。Dig-TMP は共同研究者である米国の Seidman M 博士により分与いただいた。抗 Dig 抗体と抗 SLX4 抗体を用いて、各条件で両者が近接しているかどうか PLA によるシグナルの検出を試みた。

(4) GFP-Trap および BioID を利用した SLX4-N 結合因子の探索

徳島大学先端酵素学研究所・小迫英尊博士らとの共同研究により、GFP-SLX4-N (UBZ4 野生型および変異型) 安定発現細胞を用いて、低濃度ホルムアルデヒドによる架橋後の GFP-Trap を用いた免疫沈降 質量分析を実施した。また、弱い、あるいは不安定な相互作用における結合因子の探索に有効であることが近年示されている BioID を利用した隣接因子の解析を実施した。BioID は、目的因子に大腸菌由来のピオチン化酵素を融合させ、10nm の距離で近接している分子をピオチン化することで、結合因子の探索を行う方法である。高活性型ピオチン化酵素 TurboID を融合した SLX4-N (UBZ4 野生型および変異型) をレンチウイルスを用いて細胞に安定的に導入した。ピオチン添加下において、MMC 処理後細胞を回収・溶解し、共同研究機関において Tamavidin2-Rev によりプルダウンを行い、ピオチン化タンパク質を質量分析により解析した。同定された候補因子と SLX4-N の結合について、mammalian two hybrid(M2H)法を用いて評価した。本システムでは DNA 結合ドメインに bait(候補因子)、と転写活性ドメインに prey (SLX4-N)を融合し細胞に発現させ、両者が結合すると転写因子として機能し、レポーター遺伝子であるホタル(FF)ルシフェラーゼを発現する。FF ルシフェラーゼ活性はルミノメーターを用いて検出された化学発光を測定し、ウミシイタケルシフェラーゼ活性により補正した。

4. 研究成果

(1) 代表者らが 大腸菌由来 *lacO* リポートを導入したヒト細胞株に、*lacO* 結合タンパク質 LacR を融合させた RNF168 を発現させ、マルチユビキチンを認識する抗ユビキチン抗体 FK2 で免疫染色した結果、LacR 結合領域に RNF168 依存性にユビキチン化を誘導できることが再現された。本系を用いて、SLX4-N の集積を観察した結果、SLX4-N の LacR 結合領域への集積は RNF168 および UBZ4 依存的であることが示された。

(2) CRISPR-Cas9 により作成した RNF168 ノックアウト(KO)細胞および、KO 細胞に RNF168 の発現を安定的に相補した細胞株に低濃度 MMC を添加後 48 時間の時点で細胞周期を解析した結果、RNF168KO 細胞では FA 細胞と同様に、G2 arrest が観察された。一方 RNF168cDNA 相補により RNF168 を発現した細胞では、G2 期停止の解除が認められ、RNF168 は ICL 修復において機能していることが示された。

(3) U2OS 細胞に Dig-TMP の存在下・非存在下で UV-A を照射し、抗 Dig 抗体と抗 SLX4 抗体で PLA を行ったところ、Dig-TMP 依存性にシグナルが検出されたこと、また SLX4 ノックダ

ウンでシグナルが有意に低下したことから、ICL 損傷部位への内在性 SLX4 の集積を検出するアッセイが構築できたことが示唆された。同条件を用いて、RNF168siRNA をトランスフェクションすると、SLX4 ノックダウン時と同程度まで PLA シグナルの低下が認められた。また(2)で用いた RNF168KO 細胞で野生型に比べ低下した PLA シグナルは RNF168 相補により回復したことから、内在性の SLX4 の ICL 部位への局在は RNF168 を介して制御されていることが示された。

(4) まず低濃度ホルムアルデヒドで架橋後 GFP-Trap により免疫沈降をおこない、質量分析を2回おこなった結果、候補因子を見つけることができなかった。理由として、タンパク質間架橋後損傷部位に局在している SLX4-N、その相互作用因子、もしくは両者の可溶化が十分でなかった可能性が考えられた。そこで、難溶性の高い分子もより可溶化できる溶解バッファーを用いて BioID を2回実施した結果、ユビキチン結合変異型 SLX4-N と比較して、野生型により多く結合すると考えられる候補因子として、ARID1A をふくむ SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の構成因子群が検出された(1回目; ARID1A, ARID1B, SMARCB1, SMARCC1, SMARCA4, PBRM1, 2回目; ARID1A, ARID1B)。この SWI/SNF 複合体因子のうち、ARID1A, ARID1B, SMARCC1, SMARCE1 は、先行研究でおこなった siRNA スクリーニングにおいて、SLX4-N の損傷部位への局在を正に制御する因子として同定された。そこで M2H 法を用いて、まず ARID1A と SLX4-N UBZ4 野生型、および変異型との結合をルシフェラーゼ活性により評価した。また代表者らの先行研究から、SLX4-N の ICL 損傷への局在に必要であることが示された RNF168 の既知の基質である、ヒストン H2A と SLX4-N の結合も同様に評価した。その結果、SLX4-N と H2A の結合は認めなかったが、ARID1A との結合が認められた。一方で、ARID1A と SLX4-N UBZ4 変異体との結合は、UBZ4 野生型に比べ低下していたものの、完全には抑制されなかった。以上の結果から、SLX4-N は ARID1A と結合するが、ユビキチン化基質であるか否かの判断にはさらに検討が必要であることが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Yoko Katsuki, Masako Abe, Seon Young Park, Wenwen Wu, Hiromasa Yabe, Miharu Yabe, Haico van Attikum, Shinichiro Nakada, Tomohiko Ohta, Michael M Seidman, Yonghwan Kim, Minoru Takata	4. 巻 37
2. 論文標題 RNF168 E3 ligase participates in ubiquitin signaling and recruitment of SLX4 during DNA crosslink repair Yoko Katsuki 1, Masako Abe 2, Seon Young Park 3, Wenwen Wu 4, Hiromasa Yabe 5, Miharu Yabe 5,	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 e109879
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2021.109879.	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 Okamoto Yusuke, Abe Masako, Mu Anfeng, Tempaku Yasuko, Rogers Colette B., Mochizuki Ayako L., Katsuki Yoko, Kanemaki Masato T., Takaori-Kondo Akifumi, Sobeck Alexandra, Bielinsky Anja-Katrin, Takata Minoru	4. 巻 137
2. 論文標題 SLFN11 promotes stalled fork degradation that underlies the phenotype in Fanconi anemia cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Blood	6. 最初と最後の頁 336 ~ 348
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1182/blood.2019003782	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Matsui Misaki, Sakasai Ryo, Abe Masako, Kimura Yusuke, Kajita Shoki, Torii Wakana, Katsuki Yoko, Ishiai Masamichi, Iwabuchi Kuniyoshi, Takata Minoru, Nishi Ryotaro	4. 巻 9
2. 論文標題 USP42 enhances homologous recombination repair by promoting R-loop resolution with a DNA?RNA helicase DHX9	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogenesis	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41389-020-00244-4	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8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 勝木陽子, 安倍昌子, Haico van Attikum, 中田慎一郎, 鐘巻将人, Yonghwan Kim, 矢部みはる, 矢部普正, 高田 穰.
2. 発表標題 RNF168は複製依存的DNAクロスリンク修復因子SLX4の ユビキチン化経路を介したリクルートを制御する
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝木陽子, 安倍昌子, Haico van Attikum, 中田慎一郎, 鐘巻将人, Yonghwan Kim, 矢部みはる, 矢部普正, 高田 穰.
2. 発表標題 RNF168は複製依存的DNAクロスリンク修復因子SLX4の ユビキチン化経路を介したリクルートを制御する
3. 学会等名 第38回染色体ワークショップ・第19回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 勝木陽子, 安倍昌子, Haico van Attikum, 中田慎一郎, 鐘巻将人, Yonghwan Kim, 矢部みはる, 矢部普正, 高田 穰.
2. 発表標題 ファンコニ貧血原因遺伝子SLX4のユビキチン化経路を介した損傷集積メカニズム
3. 学会等名 日本遺伝学会第92回大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 勝木陽子、安倍昌子、藤田雅俊、高田穰
2. 発表標題 複製依存的DNAクロスリンク修復因子SLX4のユビキチン化経路を介したリクルートの制御機構
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝木陽子、藤田雅俊、高田穰
2. 発表標題 家族性乳癌を抑制する分子ネットワークが制御するゲノムストレス応答機構
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 勝木陽子、安倍昌子、岡野拓真、藤井純平、白石都、西野耕平、小迫英尊、高田穰、藤田雅俊
2. 発表標題 複製とカップルしたDNA損傷修復におけるSLX4のコピキチン化経路を介した制御機構の解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yoko Katsuki
2. 発表標題 Two distinct ubiquitination pathways coordinating DNA interstrand crosslink repair in human cells
3. 学会等名 Sussex Japan Genome Stability Meeting（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Y. Katsuki, M. Abe, H. Kosako, M. Takata, M. Fujita
2. 発表標題 Elucidation of ubiquitin signaling for recruitment of SLX4 during replication-coupled DNA interstrand crosslink repair
3. 学会等名 The 19th Ataxia-Telangiectasia workshop (ATW2023Kyoto)（国際学会）
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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			
オランダ	Leiden University Medical Center			
韓国	Sookmyung Women's University			
米国	National Institutes of Health			