

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月24日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21310035

研究課題名（和文）核小体及び関連タンパク質のゲノム安定性における役割

研究課題名（英文）Role of nucleolus and related proteins for genomic stability

研究代表者

小林 純也 (KOBAYASHI JUNYA)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：30301302

研究成果の概要（和文）：本研究ではリボソーム DNA という数百のリピート配列を含むことで細胞核内でも特殊ゲノム構造をもつ核小体と、その関連タンパク質の DNA 損傷応答、ゲノム安定性に対する役割の解明を目的として遂行し、核小体タンパク質の一つ nucleolin が放射線誘導 DNA 二重鎖切断損傷の修復、及び細胞周期チェックポイント機構を制御していることを見いだした。また、核小体局在タンパク質の一つ WRN は NBS1 や PCNA, Rad18 とのインターラクションを通して、紫外線誘発 DNA 損傷発生時に活性化される損傷乗り越え DNA 合成の制御に機能することも明らかとし、核小体関連タンパク質が様々な DNA 損傷の細胞応答に機能することでゲノム安定性に寄与していることを世界に先駆けて明らかとした。

研究成果の概要（英文）：This study was carried out to clarify the roles of nucleolus, which contains multi-copy of ribosomal DNA and forms specific structure compared with other genomic DNA regions, and nucleolus-related protein for genomic stability. As a result, we found that a major nucleolar protein, nucleolin could function for DNA repair and cell cycle checkpoint following irradiation. Furthermore, nucleolus-localizing protein, WRN and its interaction with NBS1 and Rad18/PCNA could participate in the regulation of trans-lesion DNA synthesis. Therefore, nucleolus-related proteins might be important for maintenance of genomic stability against various genomic stresses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,000,000	1,800,000	7,800,000
2010年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011年度	3,100,000	930,000	4,030,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：放射線細胞生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：核小体、nucleolin、DNA 損傷、チェックポイント、DNA 修復

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 電離放射線に生物が被曝すると、細胞内のゲノム DNA に DNA 二重鎖切断 (DSBs) が生

じるが、DSBs は細胞死、癌化を招きうる重篤な損傷のため、高等真核細胞では DSBs が発生するとともに検知し、チェックポイント機

構により細胞増殖を停止するとともに、相同組換えや非同源末端再結合の二種類の修復機構で DSBs を修復する。電離放射線で直接生じた DNA 損傷に対する応答機構について、我々は研究対象としてきた放射線感受性遺伝病の原因遺伝子である NBS1 及びインタラクシオンタンパク質 H2AX が細胞周期チェックポイント中心因子 ATM キナーゼの活性化、及び相同組換え修復に機能することを明らかにした。近年、NBS1、ヒストン H2AX が DNA 損傷初期応答の中心因子として機能することが明らかとなったことから、これらが形成する DNA 損傷初期応答因子複合体の構成因子をプロテオミクス手法で同定するとことを試み、その結果、核小体タンパク質 nucleolin を構成因子の一つとして見いだした。nucleolin はリボソーム RNA の合成や様々な核小体機能の維持に関与するタンパク質として知られるが、我々の初期的な解析では放射線などで誘導される DSB 損傷応答にも関与する可能性が示唆され、核小体タンパク質がゲノム安定性の維持に機能する可能性が考えられた。

(2) 核小体は染色体上のリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA) がタンデムに数百コピー並んだクラスター領域を中心として形成される核内構造体で、その中では rDNA から転写されたリボソーム RNA とその結合蛋白質と結合したリボソームサブユニット前駆体が多数存在し、この前駆体はその後、細胞質へ運ばれ、タンパク質合成の場、リボソームとして機能する。核小体に局在する rDNA は、DNA 複製終了後にしか相同配列が近傍に存在し得ないゲノム DNA 上の大部分の遺伝子領域とは異なり、核小体という非常に小さな場に数百コピーの相同反復配列が詰め込まれていることから、rDNA に DNA 損傷が発生した時、rDNA における DNA 損傷修復、損傷応答機構が、他の大部分のゲノム領域とは異なる機構で制御されている可能性が考えられる。さらに、核小体には様々な DNA 損傷修復関連因子が集積していることが報告されていることから、核小体とその構成因子の DNA 修復・ゲノム安定性への関与が考えられている。

## 2. 研究の目的

本研究では核小体とゲノム安定性の関係を明らかにするために、(1) 主要な核小体タンパク質 nucleolin の放射線誘導 DNA 二重鎖切断損傷応答における機能の解明、(2) DNA 修復タンパク質と核小体タンパク質の相互作用のプロテオミクス法による解析、(3) 核小体構成タンパク質、及びプロテオミクス法で同定したタンパク質の DNA 修復・ゲノム安定性における役割の解明を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) nucleolin の DNA 損傷応答の機能解析

#### ① siRNA を用いた nucleolin ノックダウン細胞での DNA 損傷応答の解析

nucleolin をターゲットとした 3 種類の siRNA の混合液を用い、ヒト正常細胞 (48BR) で nucleolin の発現をノックダウンした後、チェックポイント因子の ATM 依存的なリン酸化をウエスタンブロット法で解析し、ATM 依存性チェックポイントへの寄与を解明する。DNA 二重鎖切断を人工的に誘導後、DSB 修復が起こった後に GFP を発現する、特殊なコンストラクト DNA (DRGFP, pEJ) を用い、フローサイトメーターで陽性細胞を測定することにより、相同組換え修復、非同源末端結合修復への nucleolin の寄与を明らかにする。

#### ② nucleolin 等核小体構成タンパク質の DSB 部位への集積の解析

nucleolin などの核小体タンパク質と GFP との融合タンパク質を作製し、細胞に導入後、共焦点レーザー顕微鏡の UV レーザーを細胞核内で局所的に照射し経時的に顕微鏡観察して、その損傷部位に nucleolin 等が集積するかを検討する。さらに、①で HR 活性測定に用いた DR-GFP 細胞を用い、DSB を人工的に誘導させた後、ホルマリンで架橋させたゲノム DNA/タンパク質複合体を含む細胞抽出液を作製、この抽出液に対して nucleolin 等に対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降法を行い、DNA/タンパク質複合体を回収する。回収した複合体から DNA を抽出し、DSB 形成部位近傍配列のプライマーを用いた定量 PCR 解析を行い、nucleolin 等の核小体タンパクが DSB 近傍に集積するかを解析する。

## (2) 質量分析計を用いた DNA 修復因子／核小体構成因子複合体の解析

放射線照射等で DNA 損傷を与えた細胞から核抽出液を作製し、nucleolin 等の核小体・DNA 修復関連因子に対する抗体を用いて、免疫沈降法で複合体を回収した後、電気泳動装置で複合体構成タンパク質を分離する。分離したタンパク質はトリプシンによる断片化、抽出を行い、その後、質量分析計を用いて、タンパク質同定を行う。

## (3) 核小体関連因子の DNA 修復・ゲノム安定性への寄与の解析

### ① TLS 関連 Rad18, pol $\eta$ フォーカスの検出

ヒト正常細胞、WS 患者由来細胞 (WRN 欠損)、NBS 細胞 (NBS1 欠損) に紫外線照射後、Rad18 に対する抗体を用いて免疫染色を行い、Rad18 フォーカス形成を蛍光顕微鏡で観察した。GFP-pol  $\eta$  発現 HeLa 細胞で WRN, NBS1 に対する siRNA でノックダウンした後、紫外線照射を行い、固定後、蛍光顕微鏡で観察して pol  $\eta$  フォーカス形成を観察した。

### ② SupF 法による遺伝子突然変異測定

SupF プラスミドを *in vitro* で紫外線照射した後に、正常細胞、WS 細胞、NBS 細胞等にトランスフェクションし 48 時間培養する。次に細胞から導入・複製された SupF プラスミドを回収して大腸菌にトランスフォーム導入した後、増殖し白色を呈した大腸菌コロニー数で突然変異頻度を測定する。大腸菌からプラスミドを回収し、シーケンシングにより突然変異のスペクトラムも明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) nucleolin の放射線誘導 DNA 二重鎖切断損傷応答における機能の解明

GFP 融合 nucleolin 発現細胞で nucleolin の局在変化を検討すると、通常時は核小体に局在したが、電離放射線やカンプトテシンなどの DNA 複製ストレスで核質に分散することを明らかにした。共焦点レーザー顕微鏡によるレーザー局所照射で DSB 損傷を発生させると、DSB 部位に nucleolin は蓄積したが、H2AX ノックダウン細胞では DSB 部位への蓄積が起こらなかった。クロマチン免疫沈降法で検討した場合でも、DSB 部位近傍に H2AX, Mre11

と同様に蓄積することが明らかとなり、nucleolin が DSB 損傷応答タンパク質であることが明らかとなった。次に、nucleolin ノックダウン細胞で DSB 損傷応答を検討すると、放射線照射後の ATM 依存的なタンパク質リン酸化、細胞周期チェックポイントが抑制されており、特に MDC1 に依存した経路 (H2A ユビキチン化、53BP1 フォーカス、リン酸化 ATM フォーカス) への影響が顕著であった。DSB の重要なマーカーである  $\gamma$ -H2AX フォーカスの放射線照射後の増減を検討すると、DSB 修復完了に伴う消失が、nucleolin ノックダウン細胞では消失の遅延が顕著で DSB 修復に異常があることが示唆されたが、DSB 修復の主要経路のうち、相同組換え修復 (HR) 活性がノックダウン細胞で明白に低下しており、また HR 因子である Rad51, BRCA1 の放射線によるフォーカス形成も低下していた。これらの結果から nucleolin は MDC1 依存性 DSB 損傷応答経路及び HR 修復を制御することにより、ゲノム安定性に寄与することを世界に先駆けて明らかにすることができた。

### (2) DNA 修復タンパク質と核小体タンパク質の相互作用のプロテオミクス法による解析

nucleolin に対する抗体を用いて、免疫沈降法・質量分析計を用いたプロテオミクス解析でインターアクションする因子の同定を試みた結果、DSB 初期応答因子 NBS1 及びリン酸化 H2AX ( $\gamma$ H2AX)、HR 修復の初期因子である RPA70、NHEJ 因子である KU、さらには MDC1 とも結合することが確認され、これらの結果は nucleolin ノックダウン細胞で MDC1 損傷応答、HR 修復が低下していることと一致していた。さらに NBS1 の複合体形成についても検討すると、核小体局在タンパク質である WRN (ウェルナー症候群原因遺伝子産物)、RPA70、Rad18 (ユビキチン E3 キナーゼ) と結合しており、これらの複合体も核小体、ゲノム安定性に関与する可能性が示唆された。

### (3) 核小体関連因子の DNA 修復・ゲノム安定性への寄与の解析

#### ① WRN タンパク質のゲノム安定性への寄与

早老症状を示す劣勢遺伝性疾患ウェルナー症候群の原因遺伝子産物 WRN タンパク質は、

患者細胞が様々な DNA 損傷ストレスに感受性を示すことから DNA 損傷応答に機能することが示唆されてきた。我々は NBS1 とのインターアクションを見いだしたことから、ゲノム安定性に対する役割を検討した。WRN は NBS1 と結合するだけでなく、DNA ポリメラーゼの制御因子 PCNA とも結合し、そのインターアクションが Rad18 による PCNA のユビキチン化を阻害していることが示唆された。WRN/PCNA 複合体は放射線、紫外線照射などの外因性ゲノムストレスの発生で解離し、PCNA のユビキチン化が誘導され、この複合体解離は ATM/NBS1 依存的 WRN のリン酸化/分解によるものであった。また、WRN 遺伝子を欠損した WS 細胞では損傷乗り越え DNA 合成 (TLS) の制御因子である pol  $\eta$ 、Rad18 フォーカスがゲノムストレス未誘導の状態でも形成され、pol  $\eta$  依存的遺伝子変異も増加していることを明らかにした。これらの結果から、核小体局在タンパク質 WRN は PCNA と結合して TLS 経路の無秩序な活性化を抑制することにより、ゲノム安定性に寄与することを初めて明らかにした。

#### ②NBS1/Rad18 複合体のゲノム安定への寄与

WRN とも結合が確認された NBS1 タンパク (ナイミーヘン染色体不安定性症候群原因遺伝子産物) が TLS 経路を制御する Rad18 とインターアクションすることが明らかになったので、この複合体のゲノム安定性における役割を検討した。NBS1 は以前から電離放射線照射後に DSB 発生部位でフォーカスを形成することが知られていたが、紫外線 DNA 損傷発生部位にも集結してフォーカスを形成することが観察されるとともに、NBS1 欠損細胞は紫外線にも感受性を示した。NBS1 はさらに Rad18 (DNA 損傷に依存して PCNA をユビキチン化し、TLS ポリメラーゼへの交換を制御) と紫外線 DNA 損傷依存的に直接結合し、Rad18 の損傷部位への集結を制御することによって、PCNA のユビキチン化を正に制御することを明らかにした。また、NBS1 欠損細胞と TLS ポリメラーゼである pol  $\eta$  欠損細胞では類似した遺伝子突然変異スペクトラムを示したことから、NBS1 は pol  $\eta$  と同経路で突然変異発生の抑制に寄与することが示唆された。これらの結果から、紫外線誘発 DNA 損傷発生部

位でゲノム DNA の複製フォーク進行が阻害された場合、NBS1 は Rad18 のリクルートメントを促進することにより、損傷を乗り越え DNA 合成の開始すること、そしてこの NBS1/Rad18 複合体が TLS の制御を通して、ゲノム安定性に機能することを、世界に先駆けて発見・報告することができた。

#### ③まとめ

以上 3 年間の研究から nucleolin や WRN のような核小体関連タンパク質が核小体自体の機能維持に貢献するだけでなく、ゲノム DNA 損傷の細胞応答に広く機能することにより、DNA 損傷の修復、ゲノム安定性に貢献することが明らかにした。さらに、これら核小体タンパク質と相互作用する NBS1、Rad18、PCNA など幅広くゲノム安定性維持に関与していることも明らかとした。しかし、これらのタンパク質同士の相互作用が、ゲノム安定性維持機構全般、発癌の抑制にどのように機能するか、その詳細は明らかにされていない部分が多く、今後の研究により、核小体関連タンパク質複合体のゲノム安定性機構をさらに明らかにしていく必要がある。

#### 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 12 件)

① Yanagihara H, Kobayashi J, Tateishi S, Kato A, Matsuura S, Tauchi H, Yamada K, Takezawa J, Sugasawa K, Masutani C, Hanaoka F, Weemaes CM, Mori T, Zou L, Komatsu K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol  $\eta$ -dependent translesion DNA synthesis. *Mol Cell*, **43**, 788-797, 2011. 査読有  
DOI:10.1016/j.molcel.2011.07.026

② Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Yanagihara H, Sakamoto S, Oliveira D, Shimada S, Tauchi H, Suzuki H, Tashiro S, Zou L, Komatsu K. Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol Cell*, **41**, 515-528, 2011. 査読有  
DOI:10.1016/j.molcel.2011.02.002

- ③ Mizuno N, Niitani M, Shiba H, Iwata T, Hayashi I, Kawaguchi H, Kurihara H. Proteome analysis of proteins related to aggressive periodontitis combined with neutrophil chemotaxis dysfunction. *J Clin Periodontol*, 38, 310-7, 2011. 査読有 DOI:10.1111/j.1600-051X.2010.01693.x
- ④ Kobayashi J, Kato A, Ota Y, Ohba R, Komatsu K. Bisbenzimidazole derivative, pentamidine represses DNA damage response through inhibition of histone H2A acetylation. *Mol. Cancer*, 9, 34, 2010. 査読有 DOI:10.1186/1476-4598-9-34
- ⑤ Kobayashi J, Okui M, Asaithamby A, Burma S, Chen BP, Tanimoto K, Matsuura S, Komatsu K, Chen DJ. WRN participates in translesion synthesis pathway through interaction with NBS1. *Mech Ageing Dev*, 131, 436-444, 2010. 査読有 DOI:10.1016/j.mad.2010.06.005
- ⑥ Shimura T, Kakuda S, Ochiai Y, Nakagawa H, Kuwahara Y, Takai Y, Kobayashi J, Komatsu K, Fukumoto M. Acquired radioresistance of human tumor cells by DNA-PK/AKT/GSK3beta-mediated cyclin D1 overexpression. *Oncogene*, 29, 4826-4837, 2010. 査読有 DOI:10.1038/onc.2010.238
- ⑦ Kobayashi J, Tauchi H, Chen B, Bruma S, Tashiro S, Matsuura S, Tanimoto K, Chen DJ, Komatsu K. Histone H2AX participates the DNA damage-induced ATM activation through interaction with NBS1. *Biochem Biophys Res Commun*, 380, 752-757, 2009. 査読有 DOI:10.1016/j.bbrc.2009.01.109
- ⑧ Shimada M, Sagae R, Kobayashi J, Habu T, Komatsu K. Inactivation of the Nijmegen breakage syndrome gene NBS1 leads to excess centrosome duplication via the ATR/BRCA1 pathway. *Cancer Research*, 69, 1768-1775, 2009. 査読有 DOI:10.1158/0008-5472.CAN-08-3016

[学会発表] (計 14 件)

- ① Kobayashi J(小林純也)他、Novel role of NBS1 in ubiquitination-mediated response through RNF20. 14th International

Workshop on Ataxia-Telangiectasia 2012, 2012年2月11日、New Delhi (India)

② Kobayashi J(小林純也)他、Nucleolin participates in MDC1-related DNA damage response. 14th International Congress of Radiation Research, 2011年8月30日、Warsaw (Poland)

③小林純也他、新規 H2AX 結合因子 nucleolin による ATM 依存性 DNA 損傷応答の制御 BMB2010 (日本生化学会・日本分子生物学会合同大会)、2010年12月8日、神戸

④小林純也他、クロマチン修飾を介した放射線誘導 DNA 損傷応答の制御。日本放射線影響学会第 53 回大会、2010年10月20日、京都

⑤Kobayashi J(小林純也)他、The role of novel H2AX-binding factor, nucleolin in ATM-dependent DNA damage response. The International Ataxia-Telangiectasia Workshop 2010, 2010年4月13日、Los Angeles (USA)

⑥Kobayashi J(小林純也)他、WRN functions in S phase-dependent DNA damage response through the interaction with NBS1. 2nd Asian Congress of Radiation Research. 2009年5月18日、Seoul (Korea)

[図書] (計 1 件)

- ① Dumitrescu AL, Kobayashi J, Springer (Berlin), Genetic Variants in Periodontal Health and Disease, 2009, 総ページ数 135

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小林 純也 (KOBAYASHI JUNYA)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：30301302

### (2) 研究分担者

林 幾江 (HAYASHI IKUE)

広島大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：00346503