

## 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11日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770172

研究課題名（和文） 9-1-1/TopBP1 相互作用を基盤とする DNA 損傷応答初期過程の解析

研究課題名（英文） Analysis of the early steps of DNA damage response through 9-1-1/TopBP1 interaction

## 研究代表者

大橋 英治 (OHASHI EIJI)

九州大学・理学研究院・助教

研究者番号：90378951

研究成果の概要(和文)：Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) 複合体は DNA 損傷センサーとして働き、TopBP1 と結合してそのシグナルを下流へ伝達する。本研究では、9-1-1 と TopBP1 の結合はそれらの DNA 損傷部位への移動には影響せず、損傷部位への移動後のシグナル伝達に関わること、その結合能が細胞の損傷応答能と相関することが分かった。また、9-1-1 には潜在的な DNA 結合能があり、他の因子との結合によりこの DNA 結合能が調節されることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：The Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) complex, a DNA damage sensor interacts with TopBP1 to activate a signaling pathway. In this study, we found that 9-1-1/TopBP1 interaction plays an important role in the signal transduction after their localization to the sites of DNA damage without affecting their localization upon DNA damage. The binding ability of Rad9 to TopBP1 was strongly correlated with the activity of DNA damage response in human cells. Finally, our *in vitro* results suggest that 9-1-1 has a potential to interact with DNA and the binding ability may be regulated by the interaction with other factors.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：DNA 損傷応答、チェックポイント、蛋白質間相互作用、細胞内局在、試験管内再構築

## 1. 研究開始当初の背景

## (1) ATR-Chk1 経路について

様々な DNA 損傷に対して応答する主要なチェックポイント経路として、ほ乳類では ATR-Chk1 経路が知られている。DNA が損傷を受けて、一本鎖 DNA が露出すると、その領域

に一本鎖結合タンパク質である RPA 複合体が結合する。このような状況下で、チェックポイントクランプとして知られる Rad9-Hus1-Rad1 (9-1-1) 複合体は Rad17-RFC 複合体により損傷部位にロードされる。また、ATR-ATRIP 複合体は ATRIP-RPA 間の相互作用

を通してクロマチン上にリクルートされる。TopBP1 は互いに独立に損傷近傍に呼び込まれたこれらの2つの複合体の両方と結合して、DNA 損傷応答に於いて主要な役割を果たすキナーゼである ATR を活性化する。

#### (2) 9-1-1 と TopBP1 の結合について

2007年には、Rad9 のC末端 tail に存在する 387 番目のセリン(S387)のリン酸化が TopBP1 との結合に必須であり、続いて起こる ATR および Chk1 の活性化の前提条件となることが報告された。我々はユビキタスなリン酸化酵素、カゼインキナーゼ 2(CK2)が 9-1-1 複合体と相互作用して、Rad9 の S341 および S387 をリン酸化することを明らかにし、さらに CK2 によってこれら両残基をリン酸化させることで、9-1-1/TopBP1 間のリン酸化依存的結合を *in vitro* で再構築することに成功していた。この過程で報告されていた S387 に加え、S341 のリン酸化も TopBP1 との完全な結合に必要なことが分かった。しかし、その制御メカニズムや、損傷認識過程に於ける役割は不明であった。

### 2. 研究の目的

本研究では CK2 による Rad9 のリン酸化依存的な 9-1-1 と TopBP1 間の相互作用を基盤にして、精製タンパク質による DNA 損傷認識機構および細胞内動態の解析を行い、DNA 損傷から ATR-Chk1 経路の活性化に至る分子メカニズムの解明を最終目的とした。そのために、まず TopBP1 との結合変異型 Rad9 発現株を用いた感受性試験や細胞内での蛋白質局在観察など様々な解析を行い、9-1-1 と TopBP1 の結合の細胞内での意義を探った。さらに精製した 9-1-1 や TopBP1 の DNA 結合を解析した。

### 3. 研究の方法

#### (1) Rad9 発現株を用いた感受性試験

Rad9 の野生型(WT)、CK2 の標的である S341、S387 のそれぞれまたは両方をアラニンに置換した変異体(それぞれ S341A, S387A, 2A)を FLAG タグ融合型で発現するプラスミドを HeLa 細胞に導入してそれぞれの安定発現株を樹立した。また、Rad9 の siRNA に抵抗性の Rad9 発現株も同様に作製した。細胞の薬剤感受性試験には細胞中の代謝酵素の活性を測定する試薬を用いた。

#### (2) クロマチン分画と免疫沈降による結合実験

クロマチン分画は、HeLa 細胞または前述の Rad9 発現株を用い、界面活性剤で処理した後、遠心分離する標準的な方法 (*Genes & Dev.* **16**:198-208, 2002) で行った。9-1-1 と TopBP1 の結合実験には FLAG タグ融合 Rad9 発

現 HeLa 細胞株を用い、抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降した。

#### (3) 局所的紫外線照射法による Rad9 および TopBP1 の細胞内局在解析

細胞に microporefilter を通して紫外線照射することにより、局所的に細胞に DNA 損傷を与えた。代表的な紫外線損傷である CPD(cyclobutane pyrimidine dimer)を抗体により可視化して、Rad9 や TopBP1 がこの損傷部位に共局在するかどうか調べた(図1)。

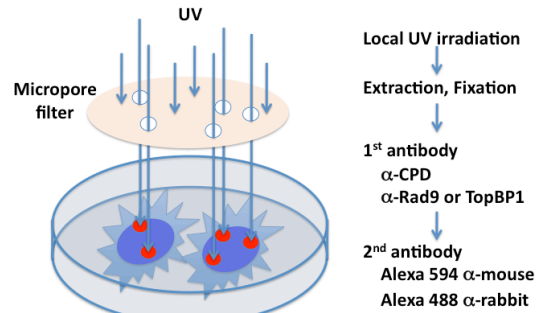


図1. 局所的紫外線照射法

Micropore filterの上から細胞に紫外線を照射し、抗CPD抗体を用いてUV損傷を、抗Rad9、抗TopBP1抗体を用いて各蛋白質を可視化した。

#### (4) 精製タンパクを用いた DNA 結合実験

野生型 9-1-1 および Rad9 の C 末端を欠失した 9-1-1 ΔC や TopBP1、Rad17-RFC を精製して、ゲルシフト法により一本鎖及び二本鎖 DNA に結合するかどうか調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 変異型 Rad9 発現株の DNA 損傷感受性と Rad9-TopBP1 結合の関係

まず、WT, S341A, S387A, 2A のそれぞれを 10 倍程度過剰発現する株のシリーズを用いて紫外線やアルキル化剤 (Methylmethane sulfonate, MMS) に対する感受性を調べたところ、2A 発現株でのみ明らかな感受性が認められ、両方のセリン残基が細胞内での損傷応答に重要な役割を果たすことが明らかとなった。この結果は *in vitro* の結果と合わせて 2010 年に *Genes to Cells* 誌に報告した(発表論文 4)。 *in vitro* での 9-1-1 と TopBP1 の結合実験では、S387A の場合 TopBP1 との結合が 70%程度、S341A では 20%程度減少し、2A ではほとんど結合しなかったが、感受性試験の結果がこの *in vitro* の結果を完全には再現しているとは言い難い。感受性試験の系は変異 Rad9 の過剰発現による dominant negative な効果を期待したもので、発現量の程度や内在性の Rad9 の影響を無視できない。そこで、我々は新たに siRNA 抵抗性の Rad9 を発現させたシリーズを用いて内在性の Rad9 をノックダウンした上で同様の実験を行った(図2)。Rad9 をノックダウンすると紫外線や MMS に対して高感受性となったが、内在性の Rad9 と同程度の発現が認められる

株では S341A や WT の場合には生存の回復が見られた。一方、S387A や 2A の場合にはこのような回復は認められなかった。また、高発現株の場合には前述の過剰発現の結果と同様の結果が得られた。これらの結果から S387A では S341 を介した TopBP1 の結合が残存するために過剰発現株ではアルキル化剤や紫外線に対して抵抗性を獲得するが、内在性と同程度の発現株の場合では、チェックポイント応答を活性化するには不十分であり、感受性を示すと考えられる。また過剰発現株では 2A 発現株が S387A 発現株より高感受性であることから S341 も細胞内での損傷応答に重要であることが理解できる。同様にこれらの株で損傷応答が起こっているか ATR の基質である Chk1 (S345) のリン酸化状態を調べたが、リン酸化の程度と生存とが一致していた。このようにして、細胞内での Rad9 と TopBP1 の結合能が細胞の損傷応答能と相関関係があることを示した (投稿準備中)。

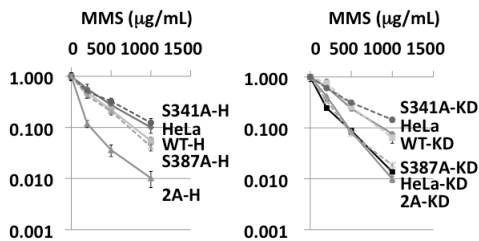


図2. Rad9発現株のアルキル化剤(MMS)感受性  
左は過剰発現株(+), 右は内在性と同程度の発現株で内在性Rad9をノックダウンした(-KD)

## (2) 9-1-1 と TopBP1 のクロマチン結合と Rad9-TopBP1 間の結合との関係

前述の通り、9-1-1 は TopBP1 と結合し、この結合が細胞に損傷応答能を与えることが明らかとなったが、この結合の具体的な意味は依然として不明である。そこで、まずこの結合が損傷に応じて変化するかどうか調べた。これらの結合に必要な Rad9 の S341 および S387 のリン酸化を調べたところ、損傷の有無に依らずに常に起こることが明らかになったが、これと一致して 9-1-1 と TopBP1 の結合も損傷の有無に関係なく観察された。また、クロマチン分画法と免疫沈降法を組み合わせを行い、これらの結合が主にクロマチン画分で起こっている事を明らかにした (図3)。

次に、これら蛋白質の細胞内局在における 9-1-1/TopBP1 間の結合の重要性を調べた。まず、クロマチン分画法を用いて Rad9 および TopBP1 の細胞内局在を紫外線照射の有無で調べた。Rad9 は損傷に応じてクロマチンへの局在が増加するが、siRNA を用いて TopBP1 をノックダウンすると、この損傷依存的な Rad9 のクロマチン局在が減少した。そこで、この損傷依存的な Rad9 のクロマチン局在に Rad9

と TopBP1 の相互作用が必要かどうか Rad9 の TopBP1 結合欠損変異体 (2A) を用いて同様の実験を行ったが、Rad9 の野生型と 2A 変異体とで顕著な差は認められなかった。すなわち、Rad9 の損傷依存的なクロマチンへの局在には TopBP1 の存在は必要だが、Rad9 の S341 および S387 のリン酸化を介した直接的な相互作用は必要ではない事が明らかとなった。

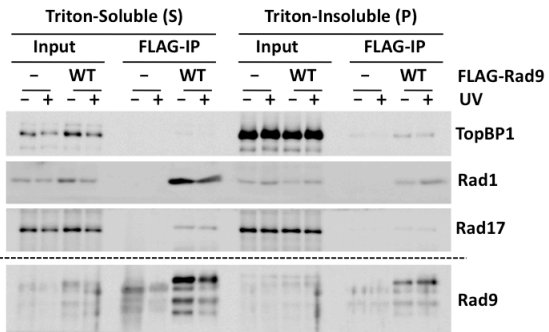


図3. クロマチン画分でのRad9-TopBP1間の結合  
FLAG-Rad9発現株をTriton可溶画分と不溶画分に分画した後、それぞれで免疫沈降を行った。

## (3) Rad9 と TopBP1 の紫外線損傷部位への局在と Rad9-TopBP1 間の結合との関係

局所的紫外線照射法により、損傷部位へのこれらの局在を調べたところ、Rad9 の局在は野生型と 2A 変異体とで差は認められなかったが、この Rad9-2A 変異体発現株では TopBP1 の損傷部位への局在が遅延した (図4)。

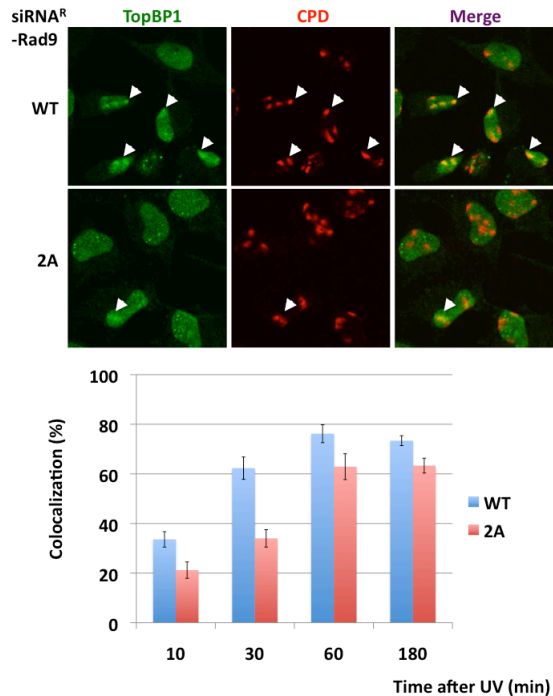


図4. TopBP1の紫外線損傷部位への局在  
Rad9の2A変異体発現株でTopBP1の紫外線損傷部位(CPD)への局在が遅延した。

しかしながら、この株の紫外線感受性は野生型に比べ顕著に高く、ATR-Chk1 経路の活性化の指標となる Chk1 のリン酸化の程度も極めて低い。このような表現型を TopBP1 の損

傷部位への局在の遅れで説明するのは難しい。むしろ、TopBP1の局在の遅延はこの株の損傷応答能の減少を反映しているとも考えられる。従って、9-1-1とTopBP1の結合がこれらの蛋白質の細胞内局在に与える影響は少なく、この結合は、これらの蛋白質が損傷部位へ集積した後のシグナル伝達で主な役割を担うと結論した(投稿準備中)。

#### (4) DNA 損傷応答因子の DNA 結合

9-1-1はRad9のC末端を欠失させるとプライマー/テンプレート型DNAに結合する事が報告されている。本研究では、野生型9-1-1、C末端領域を欠く9-1-1(9-1-1ΔC)を精製して、ゲルシフト法によりこれらのDNA結合能を解析した。その結果、9-1-1ΔCは一本鎖DNA、二本鎖DNAのいずれにも結合したが、野生型の9-1-1はいずれのDNAにもほとんど結合しなかった(図5)。さらに9-1-1ΔCのDNA結合について調べたところ、一本鎖DNA、二本鎖DNAの長さに依存して結合の増加が見られた。興味深い事に、9-1-1ΔCとDNAの結合系にRad9のC末端を加えるだけで、この結合を阻害した事から、Rad9のC末端には9-1-1リング部分でのDNA結合を阻害する機能が存在する事が示唆された。さらに、TopBP1、Rad17-RFCも精製して、同様の解析を行ったところ、これらも一本鎖DNA、二本鎖DNAのいずれにも結合した。これらのことから、ATR-Chk1経路に関わる損傷応答因子の多くがDNA結合能を有しており、蛋白質間相互作用および蛋白質-DNA間の結合を利用して損傷部位への局在とシグナル伝達を行う事が伺える。

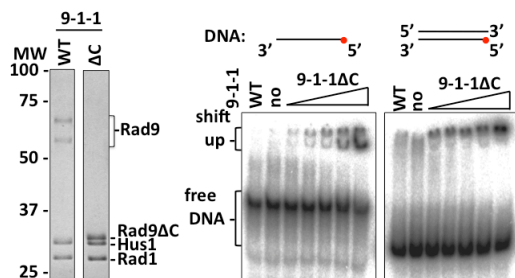


図5. ゲルシフト法を用いた9-1-1のDNA結合能の解析  
9-1-1と9-1-1ΔCの精製標品(左)。9-1-1ΔCは、どちらの基質DNAにも結合した(右)。

#### 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4件)

- (1) Hashimoto K, Cho Y, Yang IY, Akagi J, Ohashi E, Tateishi S, de Wind N, Hanaoka F, Ohmori H, and Moriya M. The vital role of polymerase  $\zeta$  and REV1 in mutagenic, but not correct, DNA

synthesis across benzo[a]pyrene-dG and recruitment of polymerase  $\zeta$  by REV1 to replication-stalled site. *J. Biol. Chem.* 2012, 287:9613-9622. 査読有り

- (2) Narita T, Tsurimoto T, Yamamoto J, Nishihara K, Ogawa K, Ohashi E, Evans T, Iwai S, Takeda S, and Hirota K. Human replicative DNA polymerase  $\delta$  can bypass T-T (6-4) ultraviolet photoproducts on template strands. *Genes Cells.* 2010, 15: 1228-1239. 査読有り
- (3) Murakami T, Takano R, Takeo S, Taniguchi R, Ogawa K, Ohashi E, and Tsurimoto T. Stable interaction between the human PCNA loader complex Ctf18-RFC and DNA polymerase  $\epsilon$  is mediated by the cohesion specific subunits, Ctf18, Dcc1 and Ctf8. *J. Biol. Chem.* 2010, 285: 34608-34615. 査読有り
- (4) Takeishi Y, Ohashi E, Ogawa K, Masai H, Obuse C, and Tsurimoto T. Casein kinase 2-dependent phosphorylation of human Rad9 mediates the interaction between human Rad9-Hus1-Rad1 complex and TopBP1. *Genes Cells.* 2010, 15: 761-771. 査読有り

[学会発表] (計4件)

- (1) Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, and Tsurimoto T. Roles of the 9-1-1/TopBP1 interaction for DNA damage responses in human cells. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月15日 横浜
- (2) 大橋 英治, 武石 幸容, 上田 聡, 釣本 敏樹. ヒト細胞内でのDNA損傷応答における9-1-1/TopBP1相互作用の役割. 第21回DNA複製・組換え・ゲノム安定性制御ワークショップ 2011年10月25日 福津
- (3) Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, and Tsurimoto T. Roles of the human 9-1-1/TopBP1 interaction for DNA damage responses. Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on "Eukaryotic DNA replication and genome maintenance" 2011年9月8日 CSH, NY, USA
- (4) Ohashi E, Takeishi Y, Ueda S, and Tsurimoto T. Chromatin association of human Rad9-Hus1-Rad1 complex is dependent on TopBP1 but not on the interaction with TopBP1. 第33回日本分子生物学会年会 2010年12月7日 神戸

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大橋英治 (OHASHI EIJI)  
九州大学・理学研究院・助教  
研究者番号：90378951

(2) 研究協力者

釣本敏樹 (TSURIMOTO TOSHIKI)  
九州大学・理学研究院・教授  
研究者番号：30163885