

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 30 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23241021

研究課題名(和文) NBS1新規ドメインによるユビキチン・シグナルとDNA鎖切断修復

研究課題名(英文) Roles of newly discovered NBS1 domains in ubiquitin signals and rejoining of double-strand breaks after irradiation

研究代表者

小松 賢志 (Komatsu, Kenshi)

京都大学・放射線生物研究センター・教授

研究者番号：80124577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 29,000,000円

研究成果の概要(和文)：放射線感受性遺伝病の蛋白NBS1は、そのC末側でATMおよびMRE11と結合してそれぞれ細胞周期チェックポイントと相同組換え修復を制御する事が報告されている。本研究で、NBS1蛋白はさらにユビキチンE3リガーゼのRAD18およびRNF20と直接結合して、PCNAのユビキチン化を介した損傷乗り越えDNA合成およびヒストンH2Bのユビキチン化を介したクロマチンリモデリングを開始する事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：NBS1, a protein responsible for radiation sensitive disorder, has been to control both cell cycle checkpoint and homologous recombination repair by binding to either ATM or MRE11 at the C-terminus of NBS1. We hosed here other two binding regions at the C-terminus and their regulatory mechanisms. NBS1 ubiquitinates PCNA and then initiates Pol eta-mediated translesional DNA synthesis by binding to RAD18. It also binding to RNF20 to ubiquitinate histone H2B, which, in turn, recruits histone chaperon FACT and initiates chromatin-remodeling for rejoining of DNA double-strand break.

研究分野：放射線生物学

キーワード：損傷乗り越えDNA合成 NBS1

1. 研究開始当初の背景

ナイミーヘン症候群は 1981 年 C. Weemaes によって報告された染色体不安定性と高発がん性を特徴とするヒト劣性遺伝病である。患者細胞は電離放射線（以下、放射線）に対する高感受性と細胞周期チェックポイント異常を呈することから、放射線による DNA 二重鎖切断の修復とゲノム安定化機構の解明に有力な研究材料と期待される。我々は、ポジショナルクローニングにより同疾患の原因遺伝子 NBS1 の同定に成功した。その結果、NBS1 が DNA 二重鎖切断の修復、チェックポイント制御、テロメア維持、DNA 複製、中心体維持、ウイルス感染、染色体安定性、アポトーシス、DNA クロスリンク修復など生命機能に重要な役割を担っていることが判明した。

我々は NBS1 蛋白ドメインの解析により蛋白 C 末側で MRE11 と結合して DNA 二重鎖切断の相同組換え修復を行う事を明らかにした。また、S. Jackson 等のグループにより C 末側突端で ATM と結合して DNA 二重鎖切断部位への ATM のリクルートとチェックポイント機能を制御する事が報告された。近年の X 線結晶解析により、NBS1 の N 末側は FHA/BRCT ドメインを介してリン酸化蛋白と結合して、C 末側の ATM ならびに MRE11 結合ドメインとリンクすることが他の研究者等により明らかにされた。このような重要な機能を担う NBS1 の C 末側ならびに N 末側のアミノ酸配列は高等真核生物 NBS1 を通じて非常に良く保存されている。我々はデータベース上で、ヒト、マウス、イヌ、オポッサム、ニワトリ、アフリカツメガエルの NBS1 アミノ酸配列を詳細に比較した結果、上記の ATM ならびに MRE11 と結合する領域以外にさらに保存領域が存在する事を明らかにした。

2. 研究の目的

DNA 二重鎖切断の修復には、上記の細胞周期チェックポイント以外にも、DNA 修復の調整機構および他の DNA 修復との連携機構の存在が示唆されているが、その詳細は不明である。本研究では、これら NBS1 蛋白 C 末側の保存領域に結合する蛋白を同定してそれらの DNA 修復の調整機構および連携機構における役割を明らかにする。また、それぞれの経路にシグナル伝達機構とその介在蛋白の同定と NBS1 との関連を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

実験に用いる細胞：ナイミーヘン症候群の患者細胞では、hypomorphic mutation の結果として NBS1 がわずかに発現していることが知られている。この患者細胞では、今回解析するドメインの生物学的性質がマスクされるので、実験に用いる細胞の選択は重要である。NBS1 ノックアウトマウスは胎生致死である

が、我々が作製した NBS1 ノックアウトキメラマウスから線維芽細胞 A31-1 クローンの樹立に成功した。この細胞では、ウエスタンブロットレベルでの NBS1 の発現が見られず(図 2 左)、また紫外線照射時に RAD18 のフォーカス形成が阻害されるなど通常の患者細胞に見られない性質を示す。この結果、紫外線や放射線に高感受性となる。この細胞の放射線感受性は野生型 NBS1 の導入により感受性が回復するが、RAD18 や RNF20 との結合ドメインを欠失した NBS1 の導入では放射線感受性の回復は見られない。実際、RNF20 のノックダウンにより相同組換えの低下が起こる。そこで、本研究では A31-1 細胞を中心に解析して、補助的に NBS 患者細胞 GM7166VA7 および siRNA (NBS1:GUACGUUGUUGGAAGGAAA) による NBS1 ノックダウン細胞を用いる。

1) H2AX 非依存的な RNF20 修復経路：RNF20 が損傷部位にリクルートされる機構ならびに RNF20 の下流で実際にクロマチン再編成に関与する蛋白を同定する。RNF20 による H2B ユビキチン化は転写で良く研究されている。転写では、ヒストンシャペロン FACT が RNF20/40 のヘテロダイマーを RNA ポリメラー II による転写部位にリクルートする事が知られている (Pavri, R. et al., Cell, 2006)。そこで、放射線照射細胞を用いた免疫沈降法により FACT の構成成分 Spt16/Pob3 と RNF20 との相互作用を確認する。また、Spt16 をノックダウン (siRNA: GAATGAAGATGAGGAAGAAGA) したときに、放射線による RNF20 フォーカス形成が阻害されるのか同時に確認する。もし、両蛋白の相互作用が見られない時には、Flag-HA 二重標識の RNF20 で Flag 抗体と HA 抗体の二回の免疫沈降物を SDS gel で分離後、クマシー染色バンドの蛋白をマスペクトルで同定する。さらに、最近我々が開発に成功した ChIP 技術を用いて、レーザー microirradiation の結果を確認する。この方法では DR-GFP 遺伝子を取り込んだ HeLa 細胞に、I-SceI 制限酵素発現ベクター pCBASce を導入して DNA 二重鎖切断を発生させる。損傷部位にリクルートされる蛋白を免疫沈降後、定量をリアルタイム PCR にて行う。この方法は DNA 二重鎖切断部位への特定蛋白の集結を確認するために用いられた Niida の方法 (Gene Dev. 2009) の改良法である。Niida の方法では、ChIP の精度を上げるために Ku-/-細胞を用いたが、ここでは代わりに DNA-PK 阻害剤の 10mM の Nu7026 を添加して測定する。続いて、H2AX 非依存的な RNF20 修復経路：前年度に同定した結合蛋白ならびにクロマチンリモデリング因子の機能ならびに H2AX 依存性修復経路との関係について解析する。① 転写阻害剤のアクチノマイシン D 処理による効果、および、クロマチン構造を弛緩させるトリコスタチン A やクロロキン処理による相同組換え能への影響を確認する。また、レポーター遺伝子を用いてそれぞれの蛋白・因子を単独ノックダウンおよび RNF20

との同時ノックダウンした時の相同組換え能および非相同末端再結合能を測定して、RNF20 修復経路における寄与を確認する。各蛋白の変異体あるいは siRNA によるノックダウンによる反応ステップの順序を確定する。また、H2AX ノックアウトマウス細胞を用いて H2AX 経路との関連を解析する。

2) RA18 を介した放射線修復経路: RAD18 により損傷部位にリクルートされる蛋白として Pol η eta (McIlwraith M. J. et al., Mol Cell. 2005) および RAD51C (Huang, J. et al., Nat Cell Biol. 2009) の関与が報告されているので、いずれが正しいか検証する。① Pol eta は相同組換えの D ループ形成後の修復複製の酵素とされているので、GFP 標識の Pol eta を用いて放射線および UV レーザー照射後のフォーカス形成と NBS1 の RAD18 結合部位欠失による阻害を確認する。また、DR-GFP レポーター遺伝子を用いた相同組換え能を指標として、Pol eta と RAD18 結合部位欠失 NBS1 変異体とのエピスタシス解析を行う。具体的には、タンデムに 2 個配列した不活性 GFP が、I-SceI 制限酵素で切断後に相同組換え修復が行われると GFP が発現する DR-GFP 遺伝子 (Sakamoto, S. et al., Oncogene, 2002) を導入した細胞に制限酵素 I-SceI を発現する pcBas プラスミド導入 3 日後に FACS 解析する。エピスタシス解析は 2 種類の修復蛋白が同一の修復経路で機能していることの判定に用いる。例えば、図 2 右では RNF20 ノックダウン細胞の相同組換え能が NBS1 と同時にノックダウンしても変わらないことから両者は同じ修復系に属することが示される。続いて、① GFP 標識蛋白を用いたレーザー照射による局在、および蛋白のノックダウンによるそれら修復機序の解析を行う。また、H2AX 経路との関連を H2AX ノックアウトマウス細胞を用いて解析する。②RNF20 と同様にリン酸化とユビキチン化、さらにポリユビキチン化による蛋白分解の効果を検証する

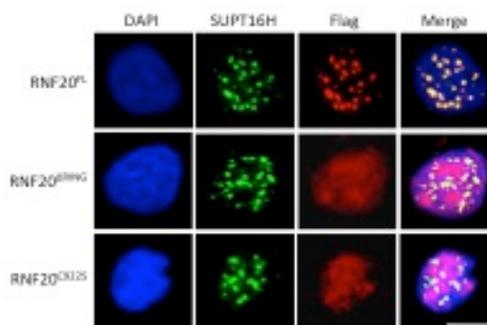
3) NBS1 の非相同末端再結合における役割: ほ乳類細胞の放射線感受性は非相同末端再結合の不全に由来するので、レポーター遺伝子 pEJ を用いて、NBS1 欠損 A31 細胞、wt-NBS1, RAD18 結合ドメイン欠損 NBS1, RNF20 結合ドメイン欠損 NBS1 をそれぞれ導入した細胞の非相同末端再結合能を定量測定する。pEJ レポーター遺伝子は GFP 遺伝子のプロモーター領域で I-SceI 2 カ所挟まれた insertion が脱落して非相同末端再結合すると GFP を発現する系である。

I-SceI 制限酵素の導入や GFP-positive 細胞のカウントは相同組換えレポーター遺伝子 DR-GFP と同じである。レポーター遺伝子を用いた実験と同時に、コロニー法を用いた電離放射線感受性も測定して両者の相関を確認する。① Scully 等の方法により (Nat Struct Mol Biol. 2009) レポーター遺伝子の再結合生成物のシークセンスから、古典的な非相同末端再結合かマイクロホモロジーを介した

alternative 非相同末端再結合かを決定する。また、②NBS1 の RAD18 および RNF20 結合ドメインに結合する蛋白ならびにその経路の蛋白の欠損変異体および siRNA ノックダウン細胞を用いて、NBS1 欠損細胞の結果と一致するかを確認する。

4. 研究成果

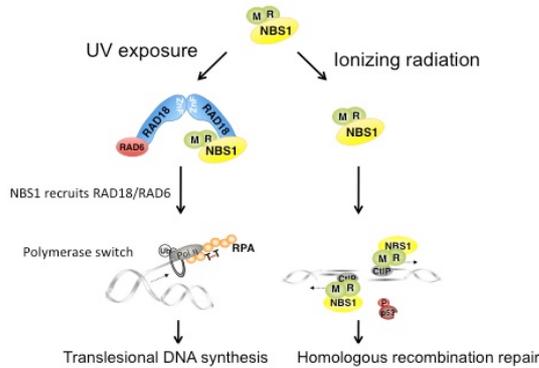
転写の研究から、RNF20 はヒストンシャペロン FACT と結合することが知られている。そこで、免疫共沈法を用いて解析した結果、FACT の構成因子 Spt16 と RNF20 が放射線照射依存的に結合することが判明した。放射線照射により RNF20 がフォーカスを形成することを以前に報告したが、Spt16 蛋白のノックダウンにより RNF20 フォーカスが消失した。このことから、Spt16 の C 末側で RNF20 の RINGU ドメインと結合して、放射線照射により発生した DNA 二重鎖切断部位に動員することが明らかとなった。実際 RING ドメインに変異を入れた蛋白では RNF20 のフォーカスが消失する。



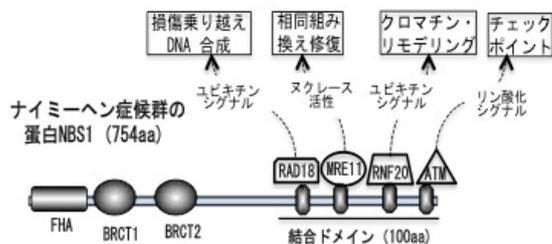
一方、DR-GFP レポーター遺伝子を用いてこれらの NBS1 領域を欠損した細胞の相同組み換え修復能を測定した結果、相同組換え修復が大きく減少した。一方、NBS1 と RNF20 の結合は転写や DNA 複製阻害剤の添加により影響を受けず、放射線照射にのみ依存することが示された。また、この結合は RAD51 のような相同組み換え蛋白の DNA 損傷部位への集積に必須であるが、クロマチン構造を弛緩させる薬剤処理により代替できた。一方、RNF20 と結合する蛋白として新たにヒストンシャペロンを同定して、そのノックダウンと結合領域の変異蛋白から、RNF20 を経由したクロマチン構造の弛緩とそれに続く相同組み換え修復の制御機構の存在が明らかになった。この結果、MRE11 領域のみならず、RNF20 ならびに ATM 領域の欠損による相同組み換え能が顕著に低下することが示された。続いて、pEJ レポーター遺伝子を用いて非相同末端再結合を測定した。驚いたことに、チェックポイントに関わる ATM 結合領域の欠損により非相同末端再結合能が低下した。現在までに、非相同末端再結合経路への ATM の役割は知られていないので、さらなる解析が必要である。

次に、RAD18 結合ドメインを欠損した NBS1

の欠失変異体を用いて、その役割を解析した結果、NBS1は直接RAD18蛋白と、しかもRAD6結合ドメインで結合することが判明した。NBS1はRAD6とも結合するがその結合にはRAD18が必須であることから、RAD18二量体にNBS1とRAD6が結合して、RAD18を紫外線損傷部位にリクルートすることが明らかとなった。この系は放射線によるMRE11を介したリクルート機構とは独立に機能する。



NBS1/RAD18の結合は紫外線のみならず、アルコール摂取により発生するアセトアルデヒドやその他のアルキル化剤にも高感受性を示した。RAD18欠失変異体ではレポーター遺伝子を用いた相同組み換えの測定により、これらのDNA損傷の修復には相同組み換え修復に加えてRAD18依存性の損傷乗り越えDNA合成が重要な役割を果たしていることが判明した。一方、Flag標識NBS1に免疫共沈する蛋白をマスマスペクトル法により同定した結果、幾つかの関連蛋白との新規結合が明らかとなった。RAD18結合ドメインを欠損したNbs1欠損細胞は放射線にわずかに感受性となる。その程度は相同組み換え修復の欠損細胞と類似しているため、DR-GFPレポーター遺伝子を用いて相同組み換え能をアッセイしたが異常は見られなかった。しかし、EdUを用いて放射線照射後の修復合成を測定した結果、顕著に低下していた。放射線はDNA二重鎖切



断以外にも数多くの塩基損傷を誘発するので、修復合成における損傷乗り越えにこのRAD18ドメインが必要であると思われる。

本研究の結論として、DNA-クロマチン構造はまるで呼吸するかのように、緩んだり、堅くなったりすることが知られている。ヒストンシャペロンFACTは緩んだクロマチンをより安定にする作用がある。DNA二重鎖切断に構造を緩めて、FACTが損傷部位に多く結合、そしてRNF20をリクルートすることが明らか

となった。このようにNBS1と結合するRAD18およびRNF20の解析から、損傷応答の新しい概念が導かれた。そして、NBS1による修復、チェックポイント、クロマチン・リモデリング、損傷乗り越え合成から構成される損傷応答機構の全体象が明らかとなった。

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16件)

① Oliveira DV, Kato A, Nakamura K, Ikura T, Okada M, Kobayashi J, Yanagihara H, Saito Y, Tauchi H, Komatsu K. Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20. *J Cell Sci*, 127: 763-772, 2014. 査読あり doi: 10.1242/jcs.135855

② Iwahori S, Kohmon D, Kobayashi J, Tani Y, Yugawa T, Komatsu K, Kiyono T, Sugimoto N, Fujita M. ATM regulates Cdt1 stability during the unperturbed S phase to prevent re-replication. *Cell Cycle*, 13:471-481, 2014. 査読あり doi: 10.4161/cc.27274.

③ Maki Ohara, Yumi Funyu, Shunsuke Ebara, Yuki Sakamoto, Ryota Seki, Kenta Iijima, Akiko Ohishi, Junya Kobayashi, Kenshi Komatsu, Akira Tachibana, and Hiroshi Tauchi. Mutations in the FHA-domain of ectopically expressed NBS1 lead to radiosensitization and to no increase in somatic mutation rates via a partial suppression of homologous recombination. *J. Radiat. Res.* 2014, in press 査読あり <http://jrr.oxfordjournals.org/>

④ Yoshida T, Awaya T, Shibata M, Kato T, Numabe H, Kobayashi J, Komatsu K, Heike T. Hypergonadotropic Hypogonadism and Hypersegmented Neutrophils in a Patient with Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder: Potential Diagnostic Clues? *Am J Med Genet A*, in press, 2014 査読あり doi: 10.1002/ajmg.a.36546

⑤ Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:2969-74, 2013. 査読あり doi: 10.1073/pnas.1222694110.

⑥ Saito Y, Takeda J, Okada M, Kobayashi J, Kato A, Hirota K, Taoka M, Matsumoto T, Komatsu K, Isobe T. The proteasome factor Bag101 binds to Rad22 and suppresses homologous recombination. *Sci Rep*, 3:2022, 2013. 査読あり

- ⑦ Saito Y, Fujimoto H, Kobayashi J. Role of NBS1 in DNA damage response and its relationship with cancer development. *Translational Cancer Research*, 2:178-189, 2013. 査読あり doi: 10.1038/srep02022
- ⑧ Shimada M, Hirayama R, Komatsu K. High LET radiation amplifies centrosome overduplication through a pathway of γ -tubulin monoubiquitination. *International Journal of Radiation Oncology · Biology · Physics*. 86:358-365, 2013 査読あり doi: 10.1016/j.ijrobp.2013.01.010.
- ⑨ Yoshiyama KO, Kobayashi J, Ogita N, Ueda M, Kimura S, Maki H, Umeda M. ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. *EMBO Rep*, 14:817-822, 2013. 査読あり doi: 10.1038/embor.2013.112
- ⑩ Urushihara Y, Kobayashi J, Matsumoto Y, Komatsu K, Oda S, Mitani H. DNA-PK inhibition causes a low level of H2AX phosphorylation and homologous recombination repair in Medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 429:131-6, 2012. 査読あり doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.128
- ⑪ Mashimo T, Takizawa A, Kobayashi J, Kunihiro Y, Yoshimi K, Ishida S, Tanabe K, Yanagi A, Tachibana A, Hirose J, Yomoda J, Morimoto S, Kuramoto T, Voigt B, Watanabe T, Hiai H, Tateno C, Komatsu K, Serikawa T. Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats. *Cell Reports*, 2:685-94, 2012. 査読あり doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.009
- ⑫ Kobayashi J, Fujimoto H, Sato J, Hayashi I, Burma S, Matsuura S, Chen DJ, Komatsu K. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. *PLoS One*, 7:e49245, 2012. 査読あり doi: 10.1371/journal.pone.0049245
- ⑬ Yanagihara H, Kobayashi J, Tateishi S, Kato A, Matsuura S, Tauchi H, Yamada K, Takezawa J, Sugawara K, Masutani C, Hanaoka F, Weemaes CM, Mori T, Zou L, Komatsu K. NBS1 recruits RAD18 via a RAD6-like domain and regulates Pol η -dependent translesion DNA synthesis. *Mol Cell* 43: 788-797, 2011. 査読あり doi: 10.1016/j.molcel.2011.07.026
- ⑭ Shimada M, Kato A, Habu T, Komatsu K. Genistein, isoflavonoids in soybeans, prevents the formation of excess radiation-induced centrosomes via p21 up-regulation. *Mutat Res*. 716:27-32, 2011. 査読あり doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.07.017
- ⑮ Kobayashi J, Okui M, Komatsu K, Chen

DJ. Possible Role of WRN Protein in Cellular Response Induced by a Little DNA Damage. *Fusion Science and Technology*, 60, 1186-1189, 2011. 査読あり doi: 10.1016/j.mad.2010.06.005

⑯ Nakamura K, Kato A, Kobayashi J, Yanagihara H, Sakamoto S, Oliveira D. V.N.P, Shimada M, Tauchi H, Suzuki H, Tashiro S, Zou L, Komatsu K. Regulation of homologous recombination by RNF20-dependent H2B ubiquitination. *Mol. Cell*, 41:515-628, 2011. 査読あり doi: 10.1016/j.molcel.2011.02.002.

[学会発表] (計 4 件)

① Junya Kobayashi, Hiroko Fujimoto, Yuichiro Saito, Ikue Hayashi, David J Chen, Kenshi Komatsu. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. 3rd Asian Congress of Radiation Research (ACRR2013), 2013年5月, Beijing, China.

② Junya Kobayashi, Taro Kawai, Hiroko Fujimoto, Takeo Kato, Shinya Matsuura, Shizuo Akira, Kenshi Komatsu. The role of cytoplasmic MRE11 and its relationship with ATM. 15th International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (ATW2013), 2013年7月, Birmingham, UK.

③ A Kato, H Yanagihara, K Komatsu. Distinct domains of NBS1 separately function in IR- and UV-damage response. The DNA damage response in cell physiology and disease, 2013年10月, Cape Sounio (ギリシャ)

④ A Kato, H Yanagihara, J Kobayashi, Y Saito, D Oliveira, C Weemaes, and K Komatsu. NBS1 plays a role in UV damage response through physical interaction with RAD18. International Symposium on Xeroderma Pigmentosum and Related Diseases: Disorders of DNA Damage Response -Bench to Bedside-, 2014年、3月、神戸

[図書] (計 3 件)

① 柳原啓見、小松賢志、ナイミーヘン染色体不安定症候群、「先天代謝異常症候群 (第二版)」, 編者/遠藤文夫, pp681-691, 日本臨床社, 2012.

② 小松賢志. DNA 修復とゲノム不安定性, pp151-160, “がん生物学イラストレイテッド”、渋谷正史、湯浅保仁編集、羊土社、2011.

③ 小松賢志、柳原啓見. 放射線による DNA 損傷の応答機構、バイオクリニカ、北隆館、27 巻 pp428-432, 2012

[その他]

ホームページ等

<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/Genome/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小松 賢志 (Komatsu Kenshi)

京都大学・放射線生物研究センター・教授
研究者番号：80124577

(2)研究分担者

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

加藤 晃弘 (Kato Akihiro)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員
研究者番号：70423051

(3)連携研究者

()

研究者番号：