

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23310040

研究課題名(和文) ユビキチン化を介する相同組み換え修復制御機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms for Ubiquitination-Dependent Regulation of Homologous Recombination

研究代表者

中田 慎一郎 (NAKADA, Shinichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70548528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNA2本鎖損傷は相同組換えもしくは非相同末端結合によって修復されることが知られている。DNA2本鎖損傷応答においては、ユビキチン化依存性のシグナル伝達の重要性が明らかにされてきている。本課題では、BRCA1非依存性HR機構の解明とユビキチン化依存性シグナリングによる相同組換え修復の制御機構の解明を目的として研究を行った。研究成果として、E3ユビキチンリガーゼのRNF8が53BP1非存在下でのBRCA1非依存性RAD51リクルートを制御していることを見いだした。また、脱ユビキチン化酵素OTUB2によるユビキチン化の精密制御が相同組換え修復に必要であることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：DNA double-strand breaks (DSBs) are repaired by the error-free homologous recombination pathway and error-prone non-homologous end joining. Ubiquitination is indispensable post-translational modification for DSB response. Here, we focused on the mechanism of BRCA1-independent HR and ubiquitination-dependent regulation of HR. In this research project, we found that E3 ubiquitin ligase RNF8 regulates RAD51 assembly at DSB sites in the absence of BRCA1 and 53BP1. We also found that deubiquitinating enzyme OTUB2 finely regulates DSB-induced ubiquitination and enables HR.

研究分野：DNA損傷応答

キーワード：DNA損傷応答 DNA修復 ユビキチン 相同組換え修復

1. 研究開始当初の背景

DNA2 本鎖切断修復機構には、大きく分けて Non-homologous end joining (NHEJ) と Homologous recombination (HR) がある。NHEJ は全細胞周期で働く DNA 修復系で、短時間のうちに DNA 修復を終えるが、塩基の欠失や付加を伴う。これに対し、HR では、姉妹染色体をテンプレートとして損傷した DNA を修復するため、S-G2 期に限られ、時間もかかるが、正確に DNA が修復される。最近、Poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) 阻害剤を用いた癌治療との関連から、特に HR 機構が着目されている。PARP1 は塩基除去修復に重要な遺伝子であり、PARP1 を薬剤的に阻害すると DNA 複製に伴い late S-G2 期の細胞に DNA2 本鎖切断が蓄積する。BRCA1 あるいは BRCA2 欠損乳癌細胞では、BRCA1 あるいは BRCA2 に依存した HR が行われなため、DNA 損傷依存性の細胞死が誘導される。この分子機構を用いた治療が本格的な臨床応用に向けて進んでいる。この事実は、すべての HR 関連遺伝子が PARP1 阻害剤の効果を増強するための薬剤標的となる可能性を示唆している。このような観点で、HR による DNA2 本鎖切断修復における未知のプロセスを解明することは、重要かつ発展性がある。

2. 研究の目的

HR には CtIP・MRE11 による DNA の resection、RPA による一本鎖 DNA のコーティング、RAD51 のフィラメント形成、姉妹染色分体上でのホモロジーサーチ、strand invasion という DNA プロセッシングを行う過程と、クロマチンユビキチン化、BRCA1 の DNA 損傷へのリクルートといったシグナル伝達・制御の 2 過程がある。本研究ではユビキチン化依存性のシグナル伝達・制御に注目して、以下の 2 点について、明らかにすることを目的とした。

1) BRCA1 非依存性 HR 機構の解明

BRCA1 欠損細胞では、HR の効率が非常に悪いことが判明しており、BRCA1 は HR に必須の遺伝子だと考えられてきた。BRCA1 は DNA2 本鎖切断部位に集積し、CtIP と結合する、PALB2 を介して BRCA2/RAD51 を DNA 損傷部位へとリクルートするなどして、HR の機構を動かせる。BRCA1 の DNA 損傷部位への集積には、E3 ユビキチンリガーゼ RNF8、RNF168 および E2 ユビキチン結合酵素 UBC13 に依存したリジン 63 結合型ユビキチン鎖の形成 (Kolas et al. Science. 2007. Stewart et al. Cell. 2009 など) と BRCA1 複合体に含まれ、リジン 63 結合型ユビキチン鎖に特異的に結合する RAP80 (Wang et al. Science 2007 など) が重要である。同じく RNF8/RNF168 依存性に DNA 損傷部位へとリクルートされる分子に 53BP1 がある。最近、BRCA1 と 53BP1 に関連して、驚く

べき報告が発表された。これらの論文によると、53BP1 両アレルと BRCA1 のエクソン 11 を両アレルで同時に欠く MEF 細胞では、HR が wild type 細胞と同等に行われる (Bunting et al. Cell. 2010)。これらの論文は、哺乳類細胞に BRCA1 非依存性 HR 機構が存在することを示し、また、BRCA1 欠損癌細胞が PARP1 阻害剤に耐性となりうることを示している。一方、我々は、UBC13 の機能を抑制する脱ユビキチン化酵素 OTUB1 を過剰発現させ、DNA 損傷部位でのユビキチン鎖の形成および BRCA1、53BP1 の集積を妨げた場合、HR 効率は著しく低下することを発見した (Nakada et al. Nature 2010)。これらの事実を総合すると、BRCA1 非依存性 HR 機構はクロマチンユビキチン化の下流で機能していると考えられる。UBC13 依存性ユビキチン化反応に関連する分子、特にユビキチン鎖結合分子に着目することで BRCA1 非依存性 HR 制御機構を明らかにすべく、研究を行った。

2) HR 修復とユビキチン化依存性 DNA 損傷応答シグナルとの関連を解明する。

DSB 修復には、前述の通り HR と NHEJ がある。これら 2 つの修復経路はそもそも相互排他的であり、経路選択の誤りは染色体不安定性を誘発することが知られている。このことから、個々の DNA 損傷に対して適切な修復方法が存在し、細胞には修復経路を選択する分子機構が存在すると予想される。修復経路選択機構は DNA 修復研究に携わる研究者にとって長年の謎であったが、近年の研究成果の蓄積により、この謎に取り組む土壌が整い、その分子機構の解明が期待されている。これまで、我々はユビキチン化依存性の DNA 損傷応答について研究を行ってきた。しかし、ユビキチン化依存性の応答と DNA 修復との関連については明らかにされてこなかった。ここではこの未解明な点を明らかにすべく、研究を行った。

3. 研究の方法

1) 培養細胞を用いて研究を行った。RNAi 干渉法 (siRNA を用いた) により BRCA1、53BP1 および RNF8 のノックダウンを行った。ウエスタンブロット法により、3 つの遺伝子を同時にノックダウンすることが可能であることを確認した。細胞に X 線を照射し、DNA2 本鎖切断を発生させた。その後、細胞を固定し、HR において必須の過程である RAD51 の DNA 損傷部位への局在を解析するために蛍光免疫染色を行った。各細胞において、標的とした分子のノックダウンが行えているかを確認するため、結合型ユビキチン特異抗体や 53BP1 特異抗体を用いた蛍光免疫染色も行った。

HR 修復効率の解析には direct-repeat GFP

(DR-GFP) assay法を採用し、フローサイトメトリーにより分析を行った。

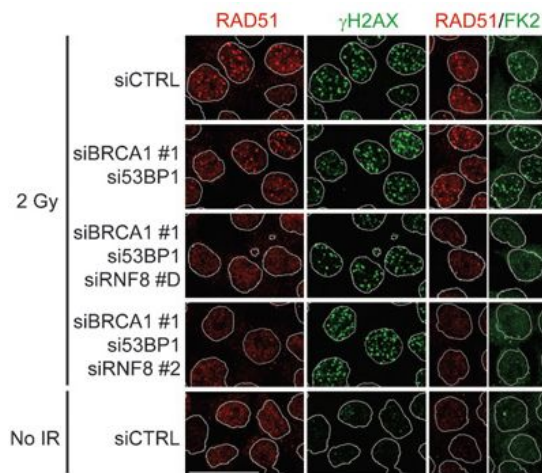
2) Flag-OTUB2をU2OS細胞に過剰発現させた細胞あるいはsiRNAを用いてOTUB2をノックダウンした細胞をneocarzinostatin (NCS) で処理し、DNA2本鎖切断を発生させた。NCS処理後さまざまな時間経過後に細胞を固定し、53BP1、RAP80、RNF168、H2AX抗体などで蛍光免疫染色を行い、DNA損傷応答シグナルについて解析を行った。

His-L3MBTL1とRNF8を細胞内で過剰発現させ、L3MBTL1をユビキチン化させる *in vivo* ubiquitination assayにおいて、OTUB2野生型および不活性変異体を過剰発現させ、OTUB2がL3MBTL1ユビキチン化に与える影響を解析した。

OTUB2ノックダウン細胞におけるHR修復効率をDR-GFPアッセイにより、また、HR過程についてRPAおよびRAD51のDNA損傷部位への集積により解析を行った。HR、NHEJを含めたtotalのDNA修復についてはneutral comet assayおよびH2AXの消失速度測定により解析した。

4. 研究成果

1) BRCA1・53BP1に加え、RNF8をノックダウンすると、BRCA1・53BP1ノックダウン細胞において観察されていたRAD51のDNA損傷部位への集積が観察されなくなった。一方、RPAのDNA損傷部位への集積はBRCA1・53BP1ノックダウン細胞でもBRCA1・53BP1・RNF8ノックダウン細胞でも観察された(下図)。このこと



から、BRCA1が存在しない状況において、RNF8はDNA end resectionを制御するのではなく、RPAとRAD51の置換の過程を制御していると考えられた。一方、RNF8を単独でノックダウンした場合にはRAD51のDNA損傷部位への集積は阻害されなかった。

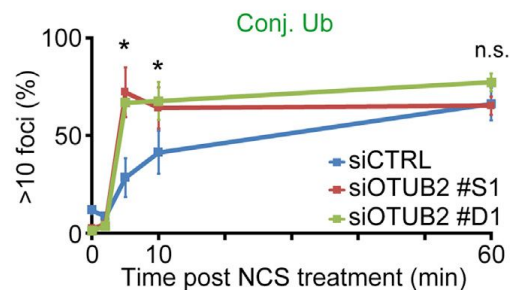
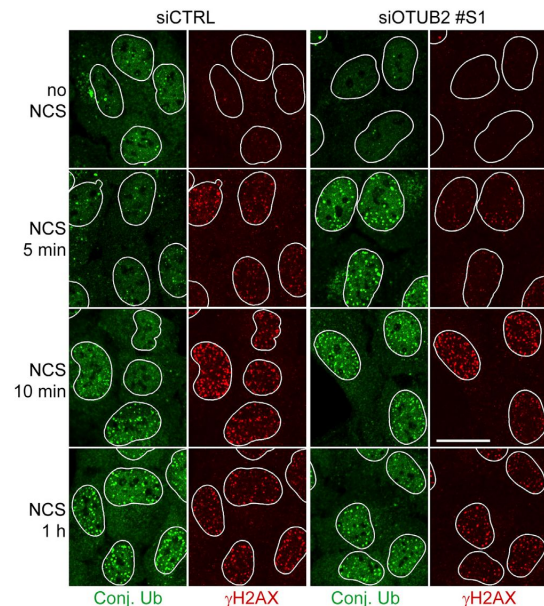
BRCA1・53BP1・RNF8をノックダウンした細胞に、siRNA抵抗性のRNF8を外来性に発現させると、RAD51のDNA損傷部位への集積は回復した。RNF8のエ3ユビキチンリガーゼ活性を失った変異体を発現させた場合にはRAD51のDNA損傷部位への局在は回復しなかった。このことから、

RNF8のユビキチン活性がBRCA1非依存性のRAD51リクルートに必要であることが示された。

BRCA1・53BP1ノックダウン細胞では、HR修復はコントロール細胞と同等の効率で起こっていたが、BRCA1・53BP1・RNF8ノックダウン細胞ではHR修復は抑制された。

これらのことから、BRCA1・53BP1非存在下においてRNF8はRAD51のDNA損傷部位への局在およびHRを制御していることが示された。

2) siRNAによりOTUB2をノックダウンした細胞をneocarzinostatinにより処理した後に固定し、結合型ユビキチンに特異的な抗体やDNA2本鎖切断応答に関連する分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。OTUB2ノックダウン細胞におけるDNA2本鎖切断部位のユビキチン化は、neocarzinostatinによる処理の5~20分のちには増強していたものの、1時間のちには対照となる細胞と同じ程度になっていた(下図)。



ユビキチン化の上流において起こるヒストンH2AXのリン酸化およびMDC1のDNA2本鎖切断部位への局在に変化はなかった。RNF8によるユビキチン化に依存してDNA2本鎖切断部位に局在するユビキチンリガーゼRNF168、RAP80、53BP1のDNA2本鎖切断部位への集積も、neocarzinostatinによる処理の5~30分

のちには増強していた。このことから、OTUB2 は RNF8 に依存性の DNA 2 本鎖切断応答に抑制的にかかわっていると考えられた。

FLAG-OTUB2 を過剰発現させた細胞を neocarzinostatin 処理後 1 時間で固定し、抗 FLAG 抗体および DNA 2 本鎖切断応答に関連する分子に対する抗体を用いて免疫染色を行った。野生型の OTUB2 を過剰発現させた場合には、DNA 2 本鎖切断部位におけるユビキチン化、および、DNA 2 本鎖切断部位への RNF168、53BP1、RAP80 の局在は強く抑制されていた。一方、脱ユビキチン活性中心に変異をもつ OTUB2 の過剰発現ではこのような抑制は認められなかった。DNA 2 本鎖切断応答シグナルの上流からみていくと、OTUB2 の過剰発現はヒストン H2AX のリン酸化、および、DNA 2 本鎖切断部位への MDC1 および RNF8 の局在に対し影響を及ぼさなかった。DNA 2 本鎖切断部位への RNF168 のリクルートには、RNF8 の DNA 2 本鎖切断部位への局在およびユビキチン化活性が必要であることから、OTUB2 は RNF8 に依存性のユビキチン化を脱ユビキチン化酵素活性に依存して抑制していると考えられた。

細胞を neocarzinostatin により処理したのち、DNA 2 本鎖切断のマーカーとして汎用されているリン酸化 H2AX および結合型ユビキチンのフォーカス形成を経時的に測定した。対照となる細胞と比べ OTUB2 ノックダウン細胞ではすみやかにフォーカスが消失した。また、コメットアッセイ法を用いた場合でも OTUB2 ノックダウン細胞は DNA 高い修復効率を示した。

DR-GFP により HR 修復の効率を測定したところ、OTUB2 ノックダウン細胞では HR 修復の効率は低下していた。さらに、OTUB2 ノックダウン細胞では RPA および RAD51 の DNA 2 本鎖切断部位への局在も低下していた。OTUB2 と同時に RAP80 あるいは 53BP1 をノックダウンすることにより、RPA および RAD51 のフォーカス形成は回復した。これらのことから、OTUB2 ノックダウン細胞では 53BP1 および RAP80 に依存した DNA 末端の保護が強まることにより非相同末端結合が優先的に選択され、HR 修復が選択されにくい状況になっていることが示された

RAP80 および 53BP1 の DNA 2 本鎖切断部位への局在には、ユビキチンの Lys63 と Gly76 とが共有結合をくり返した Lys63 結合型ユビキチン鎖の伸長、および、ヒストン H2A のユビキチン化が必要である。RAP80 は K63 結合型ユビキチン鎖に特異的に結合し、53BP1 は 20 番目の Lys がジメチル化したヒストン H4、および、15 番目の Lys がモノユビキチン化したヒストン H2A 結合することにより、DNA 2 本鎖切断部位に局在することが知られている。

しかし、ヒストン H4 の 20 番目の Lys のジメチル基には Polycomb 分子である L3MBTL1 が結合しており、L3MBTL1 が RNF8 によるユビキチン化をうけて DNA 2 本鎖切断部位から取り除かれなければ、53BP1 はここにアクセスできない。そこで、OTUB2 が L3MBTL1 のユビキチン化、Lys63 結合型ユビキチン鎖の伸長、ヒストン H2A のユビキチン化を抑制するかどうか検証した。細胞に His タグを付加した L3MBTL1、RNF8、ユビキチンを強制発現させ、変性条件において L3MBTL1 をプルダウンしたところ、ユビキチン化した L3MBTL1 からなるスミアをウェスタンブロット法により検出することができた。この実験系において、野生型の OTUB2 を同時に強制発現させたところ L3MBTL1 のユビキチン化は顕著に抑制されたが、脱ユビキチン活性中心に変異をもつ OTUB2 を強制発現させても抑制は起こらなかった。RNF8 の強制発現の代わりに薬剤により DNA 2 本鎖切断を発生させても同様の結果が得られた。また、*in vitro* において、OTUB2 はユビキチン化した L3MBTL1 を脱ユビキチン化した。さらに、OTUB2 は Lys63 結合型ユビキチン鎖の伸長を抑制し、かつ、Lys63 結合型テトラユビキチンをモノユビキチンに分解した。これに対し、RNF168 の過剰発現により起こる細胞内におけるヒストンのユビキチン化は、OTUB2 を同時に過剰発現したときには抑制されなかったが、OTUB1 を同時に過剰発現したときには抑制された。これらのことから、OTUB2 は L3MBTL1 のユビキチン化および Lys63 結合型ユビキチン鎖の伸長を抑制していると結論づけた

トポイソメラーゼ I の阻害剤であるカンプトテシンによる DNA 1 本鎖切断は、DNA 複製をへて DNA 2 本鎖切断に変換され、HR 修復により修復されることが知られている。OTUB2 ノックダウン細胞は、DNA 修復経路の選択が非相同末端結合にかたよることから予想されたとおり、カンプトテシンに対し高い感受性を示した。このことから、OTUB2 は HR 修復に促進的に機能することが示された。

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 3 件)

Kiyoko Kato, Kazuhiro Nakajima, Ayako Ui, Yuri Muto-Terao, Hideaki Ogiwara, Shinichiro Nakada: Fine-Tuning of DNA Damage-Dependent Ubiquitination by OTUB2 Supports the DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* 53. 617-630

(2014)

中嶋一裕、加藤希世子、中田慎一郎: ユビキチン化による DNA 二本鎖損傷応答制御機構. 放射線生物研究 49. 26-49 (2014)

Shinichiro Nakada: RNF8 regulates assembly of RAD51 at DNA double-strand breaks in the absence of BRCA1 and 53BP1. Cancer Research 72. 4974-83 (2012)

[学会発表](計 15 件)

Kiyoko Kato, Kazuhio Nakajima and Shinichiro Nakada: Fine-Tuning of DNA damage-induced ubiquitination supports adequate DNA repair pathway. Gordon Research Conference (2014). 香港、中国

Kiyoko Kato, Kazuhio Nakajima and Shinichiro Nakada: Fine-Tuning of DNA damage-induced ubiquitination supports adequate DNA repair pathway. Benzon Symposium (2014). コペンハーゲン デンマーク

Shinichiro Nakada: Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by the deubiquitinating enzyme OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity. (2014). 京都

Kiyoko Kato, Kazuhio Nakajima and Shinichiro Nakada: DNA damage-induced ubiquitination affects DNA repair pathway choice. 3R Symposium (2014). 御殿場

中田慎一郎: DNA 損傷依存性ユビキチン化の精密制御による適切な DNA 修復経路選択. 日本癌学会学術集会 (招待講演) (2014). 横浜

中田慎一郎: ユビキチン化制御による DNA2 本鎖損傷修復機構. 放射線影響学会 (招待講演) (2014). 鹿児島

中田慎一郎: ユビキチン依存性 DNA2 本鎖損傷応答シグナルと DNA 修復. 分生生物学会 (招待講演) (2014). 横浜

Kiyoko Kato, Kazuhio Nakajima and Shinichiro Nakada: The deubiquitinating enzyme OTUB2 tunes chromatin ubiquitination to control DNA repair. EMBO conference. (2013). Cape Sounio, Greece

Shinichiro Nakada: Complex regulation of homologous recombination by E3 ligases. AACR/JCA Joint Conference (招待講演) (2013). ハワイ、米国

Kiyoko Kato, Kazuhio Nakajima and Shinichiro Nakada: Fine tuning of chromatin ubiquitination by the deubiquitinating enzyme OTUB2 controls DNA repair. Ataxia-Telangiectasia Workshop. (2013). Birmingham, UK

中田慎一郎: 脱ユビキチン化酵素による DNA 二本鎖損傷応答制御機構 細胞生物学会 (招待講演). (2013). 名古屋

中田慎一郎: RNF8 による BRCA1 非依存性相同組換え制御 日本放射線影響学会 第 55 回大会 (招待講演) (2012). 仙台

Shinichiro Nakada: RNF8 regulates BRCA1-independent RAD51 assembly at sites of DNA double-strand breaks. 第 35 回 日本分子生物学会年会 (招待講演) (2012) 福岡

中田慎一郎: 脱ユビキチン化酵素 OTUB1 による DNA 損傷依存性クロマチンユビキチン化制御機構の解明. 第 70 回日本癌学会学術総会. (招待講演) (2011). 名古屋

中田慎一郎: DNA 二本鎖損傷によるクロマチンユビキチン化. 第 70 回日本癌学会学術総会. (招待講演) (2011). 名古屋

[産業財産権]

出願状況 (計 1 件)

名称: 単鎖切断誘導剤の増感剤及びその製造方法

発明者: 中田慎一郎

権利者: 学校法人慶應義塾

種類: 特許

番号: 特願 2012-072399

出願年月日：平成 24 年 3 月 27 日

国内外の別： 国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

http://www.bcr.med.osaka-u.ac.jp/public_html/index.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

中田 慎一郎 (NAKADA, Shinichiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：70548528