

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 11 日現在

機関番号：82502

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651050

研究課題名（和文）非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾を介した DNA 損傷応答制御機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of DNA damage responses mediated by acetylation of non-histone proteins

研究代表者

安田 武嗣（YASUDA TAKESHI）

独立行政法人放射線医学総合研究所・緊急被ばく医療研究センター・主任研究員

研究者番号：60332269

研究成果の概要（和文）：我々は、DNA 損傷応答に関わる非ヒストンタンパク質の中で、*in vitro* で CBP および p300 のヒストンアセチル化酵素によりアセチル化されるタンパク質を新たに数種類同定した。その中で、Rad52 タンパク質のアセチル化は、DNA 二重鎖切断（DSB）によって誘導された。*In vitro* でアセチル化させたタンパク質の質量分析により、Rad52 のアセチル化部位を同定した。放射線によって誘導される相同組換えが、アセチル化部位の変異により阻害された。我々の結果は、Rad52 のアセチル化が相同組換えによる DSB 修復に必要なことを示している。

研究成果の概要（英文）： We have newly identified several non-histone target proteins involved in DNA damage response, which are acetylated by histone acetyltransferases such as CBP and p300 *in vitro*. Among the identified acetylated proteins, acetylation of human Rad52 protein was induced after DNA double-strand break (DSB). We identified the acetylation sites of Rad52 by mass spectrometry with the *in vitro*-acetylated purified Rad52 protein. Radiation-induced homologous recombination was inhibited by mutations at the acetylated sites. Our results indicates that acetylation of Rad52 is required for DSB repair by homologous recombination.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：複合新領域

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：DNA 損傷応答、アセチル化、DNA 修復、相同組換え

1. 研究開始当初の背景

生物は、放射線や化学物質などによって DNA に損傷を受けると、DNA 損傷に応答して、DNA 修復、細胞周期チェックポイント、アポトーシスなどの機構を発動する。真核生物であるヒトや酵母などでは、タンパク質のリン酸化

修飾が、DNA 損傷後のシグナル伝達などに重要な役割を果たすことが知られているが、近年、ユビキチン化や SUMO 化などの他のタンパク質修飾の重要性も明らかになりつつある。アセチル化修飾は、ヒストンタンパク質の修

飾として有名であるが、ヒストンアセチル化酵素によってアセチル化される非ヒストンタンパク質も報告されつつある。DNA 損傷応答に関わるタンパク質では、塩基除去修復に関わるTDGやDNA 損傷後の遺伝子発現制御に関わるp53などのアセチル化が報告されているが、まだ報告例は10 種類にも満たない状態であった。我々は、CBP およびp300 によってアセチル化されるタンパク質を探索した結果、これまでに、DNA修復やアポトーシスに関わる複数のタンパク質を発見していた。

2. 研究の目的

本研究では、DNA 損傷応答に関わる非ヒストンタンパク質の中で、申請者がすでにCBP およびp300 ヒストンアセチル化酵素によってアセチル化されることを同定しているタンパク質について、アセチル化修飾の役割を明らかにする。さらに、放射線や化学物質などによるDNA 損傷に応答して、DNA 修復や細胞内シグナル伝達、アポトーシスに関わるDNA 損傷応答関連タンパク質の中で、CBP およびp300 によりアセチル化の修飾を受けるものが、いったいどれだけあるのかを探索する。これらの研究により、非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾が、DNA 損傷に対する細胞内応答に、いったいどれほど深く関わっているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

無細胞系によるタンパク質合成と簡便な精製方法により主要なDNA損傷応答関連タンパク質を精製し、これらを用いて、p300 およびCBP ヒストンアセチル化酵素によって試験管内でアセチル化されるものを網羅的に探索する。すでに、アセチル化部位を同定しているRad52などについては、アセチル化部位のリジンのアセチル化されないリジンやアセチル化類似変異であるグルタミンに置換した変異に

よる影響を細胞生物学的あるいは生化学的に解析する。さらに、試験管内でアセチル化させた精製タンパク質の活性を生化学的に解析する。このように、アセチル化によるタンパク質の活性への影響を調べることにより、アセチル化修飾の生物学的役割を明らかにする。

4. 研究成果

我々は、DNA損傷応答に関わる非ヒストンタンパク質の中で、試験管内でCBPおよびp300のヒストンアセチル化酵素によりアセチル化されるタンパク質を複数同定していた。同定されたタンパク質の解析により、ヌクレオチド除去修復やアポトーシス誘導におけるアセチル化修飾の重要性が明らかになった。

同定されたタンパク質の中で、ヒトRad52タンパク質は、相同組換えによるDNA二重鎖切断 (DSB) 修復に関わっている。ヒトRad52のアセチル化はDSBにより誘導され、このアセチル化誘導はHEK293細胞でもヒト間葉系幹細胞でも起こった。この結果から、Rad52のアセチル化は、分化した細胞と幹細胞の両方において、DNA損傷応答に重要な役割を果たすことが示唆された。また、試験管内のRad52のアセチル化はDNAやRPAの添加により阻害されたことから、DSBによるRad52のアセチル化誘導はRad52が損傷DNAに結合する前に起きることが示唆される。Rad52のアセチル化やアセチル化部位のアセチル化類似変異であるグルタミンへの置換変異により、試験管内でのRad52の生化学的活性の変化が観察された。アセチル化されるリジンの中で、核移行に関わっていない10カ所をアセチル化されないアルギニンに置換すると、野生型Rad52で観察される放射線照射後のDSB部位への集積に異常が見られた。この変異型Rad52発現細胞では、RPAはDSB部位へ集積していたが、Rad51のDSB部位への集積にも異常が見られ、放射線照射によって誘導される細胞内相同組換えが阻害された。以上

の結果から、Rad52のアセチル化が相同組換えの制御に重要であることが示せた。

アセチル化される新規タンパク質を、さらに二つ同定し、質量分析によりアセチル化部位を決定した。これらのタンパク質のアセチル化の役割について解析を進めている。

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7件)

- (1) Michikawa, Y., Hazawa, M., Saotome-Nakamura, A., Yasuda, T., Gotoh, T., Tajima, K.: Clinical Impact of Radiation-Resistant Mesenchymal Stem Cells in Bone Marrow Deduced from Preclinical Studies. *Journal of Bone Marrow Research*, 1, 1000101, 2013. (査読有り) doi: 10.4172/jbmr.1000101
- (2) Nakayama, F., Umeda, S., Ichimiya, T., Kamiyama, S., Hazawa, M., Yasuda, T., Nishihara, S., Imai, T.: Sulfation of keratan sulfate proteoglycan reduces radiation-induced apoptosis in human Burkitt's lymphoma cell lines, *FEBS Letters*, 587, 231-237, 2013. (査読有り) doi:10.1016/j.febslet.2012.12.002.
- (3) Nakayama, F., Umeda, S., Yasuda, T., Asada, M., Motomura, K., Suzuki, M., Zakrzewska, M., Imamura, T., and Imai, T.: Structural stability of human fibroblast growth factor-1 is essential for protective effects against radiation-induced intestinal damage. *Int. J. Radiat. Biol. Phys.*, 85, 477-483, 2013. (査読有り)

doi:10.1016/j.ijrobp.2012.04.042

- (4) Hazawa, M., *Yasuda, T. (corresponding author), Noshiro, K., Saotome-Nakamura, A., Fukuzaki, T., Michikawa, Y., Gotoh, T., and Tajima, K.: Vitronectin improves cell survival after radiation injury in human umbilical vein endothelial cells. *FEBS Open Bio*, 2, 334-338, 2012. (査読有り) doi:org/10.1016/j.fob.2012.10.002
- (5) Fischer, E., Scrima, A., Böhm, K., Matsumoto, S., Lingaraju, G.M., Faty, M., Yasuda, T., Cavadini, S., Wakasugi, M., Hanaoka, F., Iwai S., Gut, H., Sugawara, K., Thomä, N.H.: The architecture of the CRL4^{DBB2/CSA} ubiquitin ligase, targeting and release of COP9 signalsome inhibition. *Cell*, 147, 1024-1039, 2011. (査読有り) doi:10.1016/j.cell.2011.10.035
- (6) Cui, X., Oonishi, K., Tsujii, H., Yasuda, T., Matsumoto, Y., Furusawa, Y., Akashi, M., Kamada, T. and Okayasu, R.: Effects of Carbon Ion Beam on Putative Colon Cancer Stem Cells and Its Comparison with X-rays. *Cancer Research*, 71, 3676-3687, 2011. (査読有り) doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-2926
- (7) Nakayama, F., Yasuda, T., Umeda, S., Asada, M., Imamura, T., Meineke, V., and Akashi, M.: Fibroblast Growth Factor-12 (FGF12) Translocation into Intestinal Epithelial Cells Is

Dependent on a Novel Cell-penetrating Peptide Domain. *J. Biol. Chem.*, 286, 25823-25834, 2011. (査読有り)
doi:10.1074/jbc.M110.198267

[学会発表] (計 12 件)

- ① **安田 武嗣**、DNA 修復におけるクロマチン構造の影響とヒストンアセチル化酵素の役割、平成 25 年東京 RBC 新春放談会 (招待講演)、2013 年 01 月 26 日、千葉
- ② **安田 武嗣**、齋藤健吾、香川 亘、荻 朋男、鈴木健祐、堂前 直、日野拓也、中沢由華、早乙女 (中邑) 愛、加藤 宝光、Matthew Genet、羽澤 勝治、富田 雅典、花岡 文雄、菅澤 薫、Penny Jeggo、岡安 隆一、田嶋 克史、胡桃坂 仁志、DNA 損傷によるヒト Rad52 タンパク質のアセチル化は、DNA 二重鎖切断部位への集積に必要である、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日、福岡
- ③ 早乙女 愛、**安田 武嗣**、齋藤 健吾、香川 亘、荻 朋男、鈴木 健祐、堂前 直、日野 拓也、中沢 由華、羽澤 勝治、花岡 文雄、菅澤 薫、岡安 隆一、胡桃坂 仁志、田嶋 克史、ヒト間葉系幹細胞におけるヒト Rad52 タンパク質の DNA 損傷によるアセチル化誘導、第 35 回日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日～2012 年 12 月 14 日、福岡
- ④ **安田 武嗣**、非ヒストンタンパク質のアセチル化修飾を介した DNA 修復制御機構、遺伝研研究集会 「遺伝情報の安定性を支える分子メカニズム」、2012 年 10 月 03 日～2012 年 10 月 04 日、三島

- ⑤ **Takeshi Yasuda**, Kengo Saito, Wataru Kagawa, Tomoo Ogi, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Takuya Hino, Yuka Nakazawa, Ai Saotome-Nakamura, Takamitsu Kato, Matthew Genet, Masaharu Hazawa, Masanori Tomita, Fumio Hanaoka, Kaoru Sugasawa, Penny Jeggo, Ryuichi Okayasu, Katsushi Tajima, Hitoshi Kurumizaka, Acetylation of human Rad52 protein by CBP/p300, The 8th 3R symposium, 2012 年 11 月 25 日～2012 年 11 月 28 日、兵庫県
- ⑥ Ai Saotome-Nakamura, **Takeshi Yasuda**, Kengo Saito, Wataru Kagawa, Tomoo Ogi, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Takuya Hino, Yuka Nakazawa, Masaharu Hazawa, Fumio Hanaoka, Kaoru Sugasawa, Ryuichi Okayasu, Hitoshi Kurumizaka, Katsushi Tajima, DNA damage-induced acetylation of human Rad52 protein in human mesenchymal stem cells, The 8th 3R symposium, 2012 年 11 月 25 日～2012 年 11 月 28 日、兵庫県
- ⑦ **安田 武嗣**、齋藤 健吾、香川 亘、荻 朋男、鈴木 健祐、堂前 直、日野 拓也、中沢 由華、早乙女 愛、羽澤 勝治、花岡 文雄、菅澤 薫、岡安 隆一、胡桃坂 仁志、田嶋 克史、DNA 損傷応答に関わる新規アセチル化標的タンパク質の同定、日本遺伝学会 第 84 回大会、2012 年 09 月 24 日～2012 年 09 月 26 日、福岡
- ⑧ Takuya Hino, Kengo Saito, **Takeshi Yasuda**, Takehiro Suzuki, Naoshi Dohmae, Wataru Kagawa, Hitoshi Kurumizaka, Analysis of molecular mechanisms

underlying regulation of Rad52 function by acetylation、第 34 回 日本分子生物学会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜、横浜市

⑨ Syota Matsumoto, Takeshi Yasuda, Naoshi Dohmae, Eric S. Fischer, Nicolas H. Thomä, Ryotaro Nishi, Fumio Hanaoka, Kaoru Sugasawa, Functional analysis of the CRL4DDB2 E3 ligase in mammalian nucleotide excision repair、第 34 回 日本分子生物学会、2011 年 12 月 16 日、パシフィコ横浜、横浜市

⑩ Kaoru Sugasawa, Daisuke Tone, Takeshi Yasuda, Fumio Hanaoka, Reconstitution of mammalian nucleotide excision repair: molecular basis for DNA damage recognition、第 34 回 日本分子生物学会、2011 年 12 月 17 日、パシフィコ横浜、横浜市

⑪ 中山 文明, 梅田 禎子, 安田 武嗣, 浅田 眞弘, 鈴木 理, 今村 亨, 今井高志、FGF12 の小腸に対する放射線防護効果について、日本放射線影響学会 第 54 回大会、2011 年 11 月 17 日、神戸商工会議所会館, 神戸

⑫ 安田 武嗣、私の選択：研究者キャリアパスにおける岐路に立って、日本放射線影響学会 第 54 回大会、2011 年 11 月 17 日、神戸商工会議所会館, 神戸

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称：細胞膜透過性の繊維芽細胞増殖因子の医療用途

発明者：中山文明、梅田禎子、安田武嗣、藤田真由美、今井高志

権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2012-259816
出願年月日：2012 年 11 月 28 日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 武嗣 (YASUDA TAKESHI)
独立行政法人放射線医学総合研究所・緊急
被ばく医療研究センター・主任研究員
研究者番号：60332269