

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 5 月 16 日現在

機関番号：14301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659152
 研究課題名（和文） 次世代プロテオミクスを使った、ユビキチン化による DNA 修復制御機構の生化学的解析
 研究課題名（英文） Comprehensive Analysis of Ubiquitome during DNA damage response

研究代表者
 武田 俊一（TAKEDA SHUNICHI）
 京都大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：60188191

研究成果の概要（和文）：本研究は、ユビキチン化酵素（例、UBC13）の基質を同定することを最終目標にして、ニワトリ DT40 遺伝子破壊株に SILAC（Stable Isotope Labeling using Amino Acids in Cell Culture）を応用する実験手法を樹立することを目的とする。我々は、SILAC ⇒ ユビキチン化ポリペプチドの濃縮 ⇒ 濃縮ポリペプチドの質量分析を実施する実験プロトコルを確立した。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to establish the protocol that ensures the sensitive analysis of ubiquitome for the chicken DT40 cell line. We have met the objective, and identified a number of ubiquitylated proteins.

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	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：プロテオミクス、ユビキチン、ユビキトーム、DNA 修復、質量分析、SILAC

1. 研究開始当初の背景

(1) ユビキチン化による相同組換えの制御

相同組換え（図 1）は、減数分裂時の組換えのみならず、抗がん剤（例、シスプラチン）によって発生した 2 重鎖 DNA 切断の修復に関与する。我々は、世界に先駆けてユビキチン化が 2 重鎖 DNA 切断修復に必須であることを見出した（Mol Cell 2007; MCB 2008）。すなわち、RAD18 もしくは UBC13 酵素が欠損したニワトリ DT40 細胞は、2 重鎖 DNA 切断修復の効率が大きく低下した。

図 1 7 ステップからなる相同組み換えによる修復

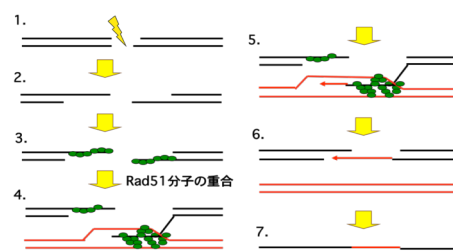


図 1

(2) 我々の研究で、未解明な問題

ユビキチン化は、E1/E2/E3 と呼ばれる 3 種

類の酵素が合体して反応が触媒される。UBC13 (E2 酵素) と相互作用する E3 酵素の候補として、RNF8 や RNF168 が論文発表された (2007 年に Cell 2 報、Science 1 報、2009 年に Cell 2 報)。相同組換えにおける RAD18, RNF8, RNF168, UBC13 の酵素の、ユビキチン化の基質は未解明のままである。

(3) ユビキチン化酵素の多重遺伝子破壊の必要性

ユビキチン化酵素は、複数の酵素が互いに相補することが多い。この相補性を解析するには、ユビキチン化酵素の多重遺伝子破壊が必要である。

(4) SILAC を使ったプロテオーム解析

SILAC 解析 (図 2) には、(i)安定アイソトープラベル、(ii)液体クロマトグラフィーと連結した質量分析、(iii)データの情報学的解析、の以上 3 ステップが必要である。研究開始当初、本プロジェクトを遂行できる研究室は京大の中に事実上無かった。2-3 種類の資料について 5,000 種類ものタンパクの量比を解析できる。

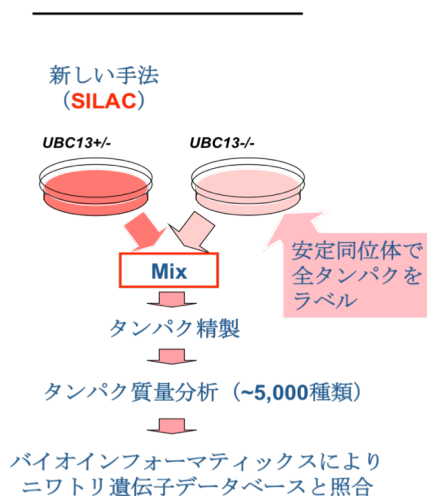


図 2

2. 研究の目的

SILAC (Stable Isotope Labeling using Amino acids in Cell culture) と呼ばれる次世代プロテオミクス手法を使って解析する。SILAC を使うと、2 種類の試料 (例、ユビキチン化酵素遺伝子破壊細胞と対照細胞) の間で 5,000 種ものタンパク分子の量を正確に比較定量できる。SILAC を使ったタンパク質量分析手法を DT40 細胞で確立する。そして確

立した手法で DT40 細胞のユビキトームを解析する。

3. 研究の方法

(1) ユビキチン化酵素 (RAD18 と RNF8) の、ユビキチン化依存的機能と非依存的機能を区別するために、前者の機能のみ破壊したノックインミュータント ($RAD18^{C29F/-}$ と $RNF8^{C398F/-}$ 細胞) を創る。

(2) ユビキチン化酵素の多重遺伝子破壊を実施する。

(3) RAD18, RNF8, RNF168 ユビキチン化酵素の基質を同定するため、SILAC によるユビキトーム解析を野生型-ユビキチン化酵素欠損細胞間で行う。

4. 研究成果

(1) $RAD18^{C29F/-}$, $RNF8^{C398F/-}$ 細胞と $RAD18^{-/-}/RNF8^{C398F/-}$, $RAD18^{C29F/-}/RNF8^{-/-}$ 細胞を創った。これらのミュータントは $RAD18^{-/-}$, $RNF8^{-/-}$ 細胞および $RAD18^{-/-}/RNF8^{-/-}$ 細胞よりも表現型が軽かった。すなわち、これらの酵素はユビキチン化非依存的機能もあることが証明できた。

(2) $RAD18^{-/-}/RNF8^{-/-}$ 細胞を創り、その表現型を $RAD18^{-/-}$ および $RNF8^{-/-}$ 細胞の表現型と比較した。その結果、多重遺伝子破壊細胞は相乗的に相同組換え機能が低下していることが判った。図 3 では、シスプラチン (抗がん治療薬) や紫外線に曝露された細胞の生存率

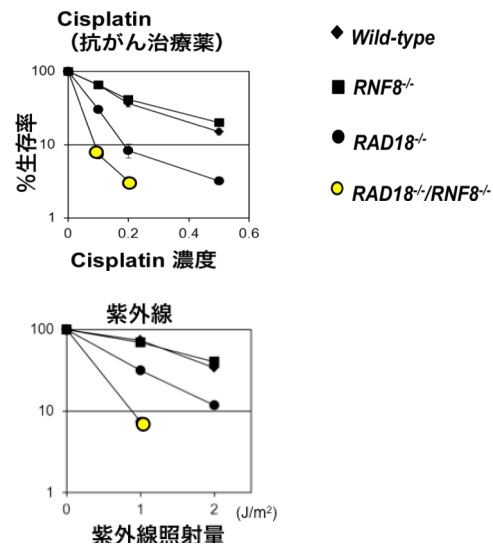


図 3

を示す。これらの処理によって生じた DNA 損傷が修復されにくくなり、特に

RAD18^{-/-}/*RNF8*^{-/-}細胞が死にやすいことが判る。死にやすい原因は、2重欠損の相同組換え機能が大きく低下したことである。

(3) 我々は、*RNF4*^{-/-} DT40 細胞を創り、その細胞では相同組換えの正確さが低下するという、非常に興味深い知見を得た。そこで SILAC の応用を、当初の予定を変更し、*RNF4* ユビキチン化酵素の基質を同定するプロジェクトをとくに優先的した。

X 放射線照射 10 分後のユビキトームを *RNF4*^{-/-} と *RNF4*^{+/+} DT40 細胞とで SILAC を使って比較した。その結果、*RNF4*^{+/+} DT40 細胞の方が有意に高くユビキチン化されたタンパクとして、Histone H3、SUMO2、Histone H1. 11L が同定できた。本研究は 2012 年 4 月に首都大学東京に我々の研究室から栄転した廣田教授が首都大学東京において実施した (図 4、5)。

各サンプルのmutの種類とラベリング

A	ubc13	L
B	ubc13	H
C	rnf8	L
D	rnf8	H
E	rad18	H
F	rad18	L
G	rnf168	H
H	rnf168	L
I	rnf169	H
J	rnf169	L
K	rnf4	H

図 4

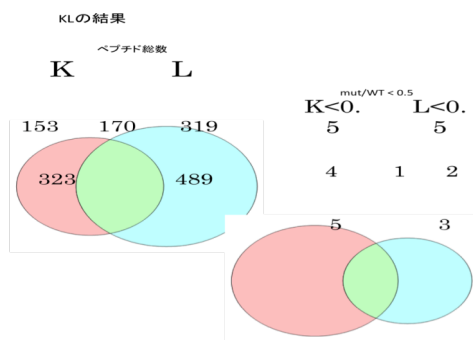


図 5

またリン酸化 (フォスホトーム) を解析する新たな研究を開始した。この研究は論文 1. の研究成果に基づく。

(4) トランスクリプトーム解析

DT40 細胞のトランスクリプトームを工樂博士 (神戸・理化学研究所) と共同して 2012 年度に解析した (基盤(S)の経費使用)。スクリプトーム解析は、ニワトリゲノムの x30 のカバレッジで行った。このデータベースによって、ニワトリの系統間にあるゲノム配列の多型性を気にすることなく、質量分析のデータからタンパク分子を同定する作業ができるようになった。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Fujita M, Sasanuma H, Yamamoto KN, Harada H, Kurosawa A, Adachi N, Omura M, Hiraoka M, Takeda S, Hirota K. (2013) Interference in DNA replication can cause mitotic chromosomal breakage unassociated with double-strand breaks. *PLoS One* 8: e60043. (査読あり)
DOI: 10.1371/journal.pone.0060043

[学会発表] (計 4 件)

1. Takeda S, Genetic and Biocheical evidence for translesion DNA synthesis by replicative DNA polymerase delta, Gordon Research Conference, Mutagenesis, 2012 年 8 月 19 日-24 日, Newport, USA.
2. Takeda S, Xpf and Mus81 are required to process homologous recombination intermediates, EMBO Workshop, Structure-specific nucleases in DNA replication and repair, 2012 年 9 月 19 日, Hyeres, France.
3. 武田俊一, 遺伝学的手法を応用した、新規抗がん剤のスクリーニングとその作用機序の解析, 金沢大学薬学シンポジウム 2012-DNA 損傷応答を標的とした革新的がん創薬研究-, 2013 年 2 月 19 日, 金沢.
4. Takeda S, Complex functional relationship of the UBC13 E2 ubiquitin conjugating enzyme, and the RAD18 and RNF8 E3 ubiquitin ligases, FASEB Summer Research Conferences, Genetic Recombination & Genome Rearrangements, 2011 年 7 月 24 日-29 日, Steamboat Springs, USA.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武田 俊一 (TAKEDA SHUNICHI)

京都大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：60188191

(2) 研究分担者

笹沼 博之 (SASANUMA HIROYUKI)

京都大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：00531691

(3) 連携研究者

なし