

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 19 日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25290044

研究課題名(和文) DNA障害応答とシグナル伝達をクロストークする新規分子機構の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of crosstalk between DNA-damage response and signal transduction

研究代表者

北川 雅敏 (Kitagawa, Masatoshi)

浜松医科大学・医学部・教授

研究者番号：50294971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々はEGF刺激時に起こるEGFシグナル抑制分子Mig-6のリン酸化による脱抑制とMAPKの活性化がUV照射時にも起こる事を見だし、EGFシグナリングとDNA障害応答のクロストークを実証した。一方で、我々はUV照射によりHATの一種であるHBO1のSer50/Ser53がATRによりリン酸化されること、照射6h以降にCUL4-DDB1/DDB2によりHBO1はユビキチン化され分解されることを見いだした。一方で、UV照射後、HBO1はH3のアセチル化を介して損傷部位のクロマチン構造変化を誘導し、ヌクレオチド除去修復(NER)に関与する因子のリクルートを促すことでNERに関与する事を見いだした。

研究成果の概要(英文)：We found that Mig-6, an internal inhibitor of EGFR, is phosphorylated accompanied by EGF stimulation but also UV-irradiation. The results suggest that there is a crosstalk between EGF-signaling and DNA-damage response. Next, we found that HBO1, a histone acetyltransferase, phosphorylated Ser50/Ser53 of HBO1 by ATR after UV irradiation. HBO1 is ubiquitinated by CUL4-DDB1/DDB2 and degraded 6h after UV-irradiation. Moreover, we found that HBO1 participated in nucleotide excision repair(NER). UV-DNA-damage induced phosphorylation of HBO1 promoted acetylation of histone H3 to induce structural change of chromatin in the damaged sites. These results suggested that the HBO1-mediated chromatin conformational change promoted recruitment of NER-related factors to enhanced the NER.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA障害応答 シグナル伝達 リン酸化

1. 研究開始当初の背景

DNA 障害応答は細胞運命決定や細胞がん化と密接に関連する極めて重要な研究領域である。しかしながら、DNA 障害応答から修復完了までの全容の解明は未だされていない。また種々のシグナル伝達機構と DNA 障害応答のクロストークについても不明の点が多い。

2. 研究の目的

(1) 上皮増殖因子(EGF)のシグナル伝達経路と DNA 障害応答経路のクロストークの可能性を検証する。

(2) DNA 障害シグナルによるヒストンアセチル化酵素の量的質的制御機構とその意義を解析する。

3. 研究の方法

(1) UV、HU 等の DNA 障害を細胞に与え、Chk1、Mig-6、EGFR、MAP キナーゼが活性化するか否かを各種特異的リン酸化抗体を用いたウエスタンブロッティングにより解析する。その結果を EGF 刺激時のシグナル伝達と比較する。さらに Mig-6 に関しては PhosTag ゲル電気泳動を用いて検証する。

(2) UV 照射により DNA 障害を細胞に与え、ヒストンアセチル化酵素 HBO1 のリン酸化を質量分析等で解析する。同定したリン酸化 pSer50/pSer53 に特異的抗体を作製する。UV 照射後の HBO1 のリン酸化や細胞内動態と DNA 障害関連因子の挙動を蛍光顕微鏡で解析し、HBO1 と各種因子との共局在性を解析する。UV 照射後の HBO1 の量的変動を解析し、プロテアソーム阻害剤存在下でユビキチン化を解析する。さらにこのユビキチン化に関与する E3 リガーゼ候補を細胞内に発現させ、HBO1 のユビキチン化が亢進するか、E3 リガーゼ候補のノックダウンにより HBO1 のユビキチン化が抑制されるかで検証することで、HBO1 のユビキチン化に関与する

E3 リガーゼを同定する。DNA 修復における HBO1 の機能の検証については、細胞を UV 照射後リン酸化型 HBO1 と DNA 修復関連因子の免疫染色を行い、蛍光顕微鏡で解析し、HBO1 と各種因子との共局在性を解析する。この時、非リン酸化型 HBO1 の共発現や、HBO1 や ATR のノックダウンで DNA 修復関連因子の障害部位へのリクルートが阻害されるかを解析し、HBO1 が DNA 修復関連因子の障害部位へのリクルートに必要なかを検証する。さらにこの時 UV 照射後のコロニー形成能(感受性解析)やコメットアッセイ等を行い HBO1 およびそのリン酸化が DNA 修復に必要なかを検証する。

4. 研究成果

(1) 申請者等の解析の結果、EGF 刺激時、EGF 受容体(EGFR)は自己リン酸化が起こるが、それに伴い EGFR の細胞内ドメインと直接結合して EGF シグナルを抑制する分子 Mig-6 のリン酸化が起こり、Mig-6 の EGFR 抑制能が低下し、シグナルの開始に寄与することが判明した。さらにこの Mig-6 のリン酸化を行う酵素は Chk1 である事、Chk1 の活性化は EGFR/PI3K 経路で起こる事を見いだした。

この DNA 障害非依存的な Chk1 の機能は EGF シグナルの開始に関与する事が示唆された。一方で UV 照射時にも Mig-6 のリン酸化が起こる事が判明し、DNA 障害応答と EGF シグナリングのクロストークが示唆された。

(2) 我々は UV やヒドロキシウレア、ブレオマイシン等の DNA 傷害性薬剤で細胞を処理すると、DNA 傷害に伴いヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)の一種である HBO1 の Ser50/Ser53 がリン酸化されることを見いだした。siRNA を用いた ATR のノックダウンや ATR 阻害剤により UV 照射で誘導される HBO1 の Ser50/Ser53 のリン酸化が低下することから、その責任リン酸化酵素が ATR

であることが判明した。さらに、Ser50/Ser53 がリン酸化された HBO1 は DDB2 と結合する事を見いだした。この結果から HBO1 をユビキチン化するユビキチンリガーゼは CUL4-DDB1/DDB2 であることが予想された。我々は UV 照射後に HBO1 がリン酸化されると 6 時間以降に CUL4-DDB1/DDB2 によってユビキチン化され、プロテアソーム依存的に分解される事を証明した。この現象は細胞増殖の ON/OFF と深く関係している事も示唆された。

これまで HBO1 が DNA 損傷修復機構に機能するという報告はなかったが、我々はそれを示唆する予備的結果を得ていた。本研究ではそれを基に DNA の傷を直す DNA 損傷修復機構にヒストンアセチルトランスフェラーゼである HBO1 が如何に関与するかの解析を行った。まず、UV 照射後の HBO1 のリン酸化に伴い、ヌクレオチド除去修復 (NER:nucleotide excision repair)に関わる因子が DNA 損傷部位にリクルートされる事を上記の細胞生物学的解析によって見いだした。このとき HBO1 の Ser50/53 を Alanine に変異を導入するとこの NER 関連因子のリクルートは阻害され、NER による修復も抑制される事が判明した。また障害部位において HBO1 によるヒストン H3 のアセチル化が亢進することが確認された。このヒストン修飾によりクロマチン構造が開く事が示唆され、NER 関連因子が導入されやすくなると考えられる。

以上の解析結果により、UV 照射による塩基の損傷は ATR による HBO1 のリン酸化を引き起こし、HBO1 は損傷部位のヒストン H3 をアセチル化してクロマチン構造変化を誘導する。それにより NER 関連因子のリクルートが促進され NER に寄与することが強く示唆された。

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 2 件)

1. Matsunuma, R., *Niida, H., Ohhata, T., Kitagawa, K., Sakai, S., Uchida, C., Shiotani, B., Matsumoto, M., Nakayama, K.I., Ogura, H., Shiiya, N. and Kitagawa, M.: UV Damage-Induced Phosphorylation of HBO1 Triggers CRL4^{DDB2}-Mediated Degradation to Regulate Cell proliferation. *Mol. Cell. Biol.* **36**:394-406, 2016.
2. 北川雅敏: がん抑制遺伝子産物 Mig-6 の増殖シグナル制御機構 生化学 86 (4): 498-502, 2014.

[学会発表] (計 3 件)

1. Niida, H.: DDB2-dependent HBO1 recruitment is required for efficient repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimer: IMB conference, Mainz, Germany 2015.
2. Niida, H.: ATM/ATR-dependent phosphorylation dissociates HBO1 from replication origin: Cold Spring Harbor Lab meeting, USA 2014.
3. 丹伊田浩行、塩谷文章、松本雅記、西谷秀男、北川雅敏: ATM/ATR-dependent phosphorylation dissociates HBO1 from replication origin: 第 36 回日本分子生物学会年会、神戸、2013.

[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
http://www.hama-med.ac.jp/uni_education_igakubu_igaku_seika1.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

北川 雅敏 (KITAGAWA, Masatoshi)
浜松医科大学・医学部・教授
研究者番号：50294971

(2) 研究分担者

松本 雅記 (MATSUMOTO, Masaki)
九州大学・生体防御医学研究所・准教授
研究者番号：60380531

(3) 連携研究者

丹伊田 浩行 (NIIDA, Hiroyuki)
浜松医科大学・医学部・准教授
研究者番号：20336671