

平成 28 年 4 月 22 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25550028

研究課題名(和文) ヒストンH3ジメチル化におけるE3リガーゼRNF168のアダプターとしての役割

研究課題名(英文) Roles of E3 ubiquitin ligase RNF168 as an adaptor molecule for histone H3 methylation

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：53BP1はDNA2本鎖切断端において、DNA切断端を保護する役割がある。E3ユビキチンリガーゼRNF168依存性に53BP1がDNA損傷部位に局在する分子機構について研究を行った。BAT3-DOT1L-RNF168はDNA損傷の有無によらずタンパク複合体を形成し、BAT3およびDOT1Lはいずれも53BP1のDNA損傷部位への局在に必要であった。RNF168がアダプターとして53BP1のDNA損傷部位への局在を制御する機構は存在しているが、この機構のDNA損傷応答への寄与は限定的であった。一方、RNF168のDNA損傷部位への局在には既報とは異なる分子機構が存在することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：53BP1 localizes to sites of DNA double-strand breaks (DSBs) and protects the DSB ends from degradation. Since the localization of 53BP1 to DSB sites depends on E3 ubiquitin ligase RNF168, we investigated the molecular mechanism how RNF168 regulates the 53BP1 accumulation at DSB sites. Our data suggest that RNF168 forms protein complex with BAT3 and DOT1L and these proteins also regulate the localization of 53BP1 to DSB sites. Even though other data implicate that contribution of the function of RNF168 as an adaptor is partial, RNF168 can work as an adaptor for the localization of DOT1L to DSB sites. Our data also suggest that RNF168 localizes to DSB sites by a mechanism that has not been reported yet.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復 DNA2本鎖切断

1. 研究開始当初の背景

DNA2 本鎖切断部位には、様々な分子が局在し、細胞周期の停止や DNA 損傷修復を制御している。53BP1 は DNA2 本鎖切断部位に集積する代表的な分子であり、DNA 切断端において、DNA が過剰に削られるのを抑制する役割がある。報告者はこれまでに E3 ユビキチンリガーゼの RNF8 と RNF168 が 53BP1 の DNA 損傷部位への局在に不可欠な分子であることを示してきた (*Science* 2007, *Cell* 2009, *Nature* 2010)。RNF168 は DNA2 本鎖切断部位においてヒストン H2A と結合し、ヒストン H2A をユビキチン化すると (研究開始時には) 考えられていた。しかし、53BP1 はユビキチン化ヒストン H2A に結合せず、メチル化ヒストン H3 および H4 に結合する (と研究開始時には考えられていた)。では、なぜ 53BP1 の DNA 損傷部位への集積に RNF168 が不可欠であるのか、この疑問点は解明されていなかった。

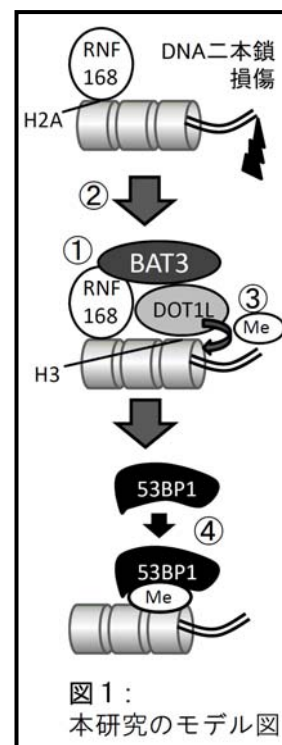
この疑問点を解明するために、報告者は RNF168 と結合するヒストンメチル化関連分子の探索を行った。細胞から RNF168 を免疫沈降し、その免疫沈降物に含まれる蛋白を液体クロマトグラフィ-タンデムマスマスペクトロメトリ法により分析した。その結果、DNA 損傷を与えたサンプルでのみ RNF168 との結合が検出された分子が HLA-B-associated transcript 3 (BAT3) であった。

BAT3 はメチルトランスフェラーゼ DOT1L と結合し、DOT1L とヒストン H3 との結合を増強し、細胞全体のヒストン H3 リジン 79 (K79) のジメチル化を促進している。53BP1 は G1, G2 期においてはジメチル化ヒストン H3 K79 に結合するため、DNA 二本鎖切断部位への 53BP1 の局在も BAT3 によって促進される (Wakeman TP et al, *EMBO J.* 2012) と報告されている。しかし、BAT3-DOT1L がどのようにして DNA 損傷局所

で働くのか、その分子機構はまだ解明されていなかった。

2. 研究の目的
報告者は、自らのプロテオミクスの結果と BAT3 の既知の機能をもとに、次のようなシグナル経路があるという仮説を立てた (図 1 参照)。

- ① RNF168 は BAT3-DOT1L と複合体を形成する。
- ② DNA2 本鎖損傷が発生した時、RNF168 が DNA 損傷部位のヒストン



H2A と結合することにより、BAT3-DOT1L が RNF168 複合体として DNA 損傷部位へと局在する。

- ③ DNA 損傷部位において、DOT1L がヒストン H3 と結合し、DNA 損傷部位において集中的にヒストン H3 K79 をジメチル化する。
- ④ DNA 損傷部位のジメチル化ヒストン H3 K79 に 53BP1 が結合する。

このモデルでは、RNF168 は E3 ではなく、アダプターとして機能していることになる。本研究では、分子生物学的な手法と細胞生物学的な手法を用いてこの仮説について検証した。

3. 研究の方法

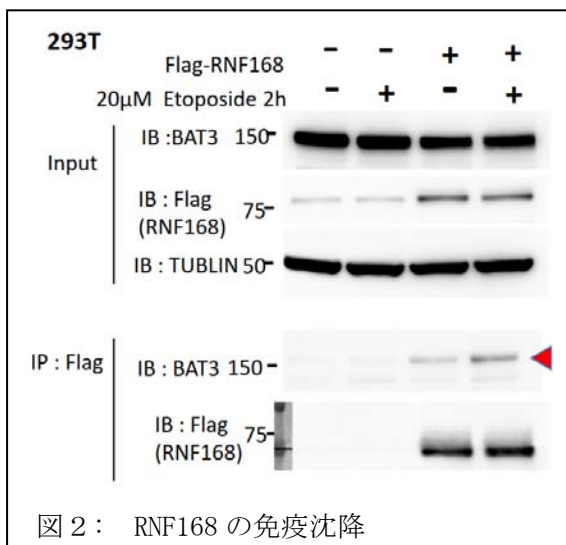
- ① 免疫沈降-マスマスペクトロメトリー法により検出した RNF168 と BAT3 の結合を古典的な免疫沈降・SDS-PAGE・ウエスタンブロット法により再確認する。
- ② BAT3 あるいは DOT1L をノックダウンした細胞に DNA2 本鎖切断を発生させ、53BP1 の foci

形成 (DNA2 本鎖切断部位への集積) について解析を行う。

③RNF168 をノックダウンした細胞において、siRNA に抵抗性とした RNF168 の野生型や変異体の mRNA を発現させ、RNF168 蛋白を発現させる。それらの細胞における RNF168 および 53BP1 の DNA 損傷部位への局在を観察する。

4. 研究成果

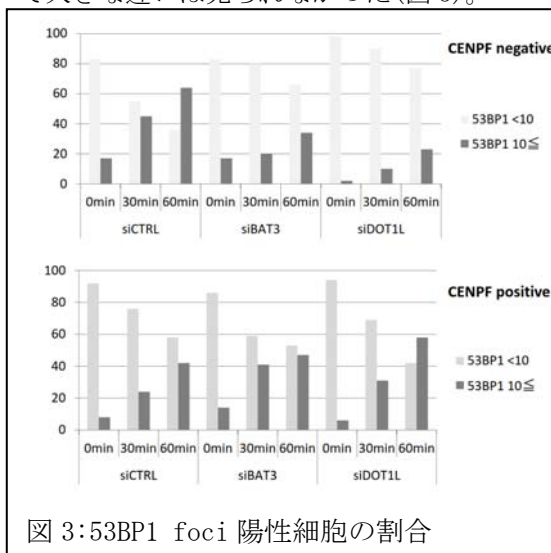
①Flag タグつけた RNF168 を U2OS 細胞に発現させ、その細胞から抽出した lysate から Flag 抗体を用いて免疫沈降をおこない、Flag-RNF168 を含む蛋白複合体を精製した。この免疫複合体を SDS-PAGE 法により分子量ごとに分離した後、ウエスタンブロット法により BAT3 および DOT1L の検出を試みた。その結果、RNF168 には BAT3 および DOT1L が結合することが確認された。この結合は、細胞に DNA 損傷をさせなくても観察され、恒常的に形成される蛋白複合体であることが示された (図 2)。



また、野生型の RNF168 ではなく、E3 ユビキチンリガーゼ活性を失った変異体を用いた場合であっても RNF168 と BAT3 および DOT1L の結合が検出されたことから、これらの分子の複合体形成は RNF168 の E3 ユビキチンリガーゼ活性に依存しないことが示された。

②BAT3 および DOT1L 特異的な siRNA を U2OS 細胞にトランスフェクトし、BAT3 および

DOT1L をノックダウンした。これらの細胞をゼオシンで処理して DNA2 本鎖損傷を発生させた。その後固定し、53BP1 特異抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。細胞周期による違いを解析するため、S-G2 期に陽性となる CENPF 抗体を用いた 2 重染色を行い、CENPF 陽性・陰性細胞における 53BP1 の foci 形成を解析した。その結果、BAT3 および DOT1L をノックダウンした CENPF 陰性の細胞では 53BP1 の DNA 損傷部位への局在が低下することが示された。一方、CENPF 陽性細胞ではコントロール細胞とノックダウン細胞との間で大きな違いは見られなかった (図 3)。



これらの結果から、BAT3 および DOT1L は G1 期における 53BP1 の foci 形成に関与する可能性が示唆された。

③RNF168 がアダプターとして機能することで 53BP1 の DNA 損傷部位への局在が制御されるのであれば、RNF168 の DNA 損傷部位での局在量と 53BP1 の DNA 損傷部位での局在量との間に強い相関が見られると予想される。RNF168 は複数箇所存在するユビキチン結合ドメインを用いて RNF8 によりユビキチン化された基質に結合することで DNA 損傷部位に局在することが知られている。そこで、RNF168 のユビキチン結合ドメインに変異を入れ、ユビキチン結合能を失わせた RNF168 を RNF168 ノックダウン細胞に発現させた後

に DNA2 本鎖切断を発生させ、RNF168 および 53BP1 の局在を解析した。RNF168 は過剰発現させた場合、RNF8 によるユビキチン化がなくとも RNF168 は DNA 損傷部位に局在してしまうため、この実験は一過性発現を用いた手法では解析できなかった。そこで、ドキシサイクリンにより発現を ON にできる RNF168 安定発現株を作成し、ドキシサイクリン濃度をなるべく少なく加えることで RNF168 の発現量を少量に抑えた。この条件下で実験を遂行した。その結果、あるユビキチン結合ドメインに変異を入れた細胞では RNF168 がほとんど DNA 損傷部位に局在しないにもかかわらず、53BP1 が非常に多く DNA 損傷部位に局在することが高頻度に観察された (図 4)。

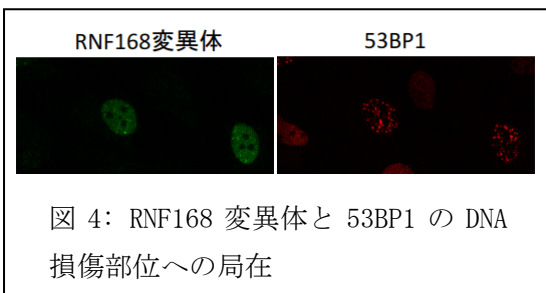


図 4: RNF168 変異体と 53BP1 の DNA 損傷部位への局在

このことから、RNF168 のアダプターとしての機能はそれほど重要ではないと考えられた。また、本研究課題を遂行している期間に、53BP1 の DNA 損傷部位への局在は TUDOR によるジメチル化ヒストン H4 と UDM によるユビキチン化ヒストン H2A との結合にあることを示す研究成果が蓄積し、53BP1 とメチル化ヒストン H3 とが結合するというモデルは受け入れられなくなってきた。このことから、BAT3 および DOT1L は 53BP1 の DNA 損傷部位への局在に関連するものの、DOT1L がヒストン H3 のメチル化を制御して、53BP1 の DNA 損傷部位への局在を制御するという本研究課題当初の仮説のような分子機構が DNA 損傷応答シグナルにおいて貢献する度合いは低いと考えられた。本研究において得られた、RNF168 のユビキチン結合ドメインの変異体の foci 形成パターン

と 53BP1 の foci 形成パターンとの関係は、DNA 損傷応答における RNF168 の機能が現時点で広く受け入れられているモデルとは異なることを強く示唆しており、この点において、本研究課題において今後の研究に発展する重要な成果が得られたと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

中田慎一郎. ユビキチン化制御による DNA2 本鎖損傷修復選択機構. 放射線影響学会 (招待講演) 2014 年 10 月 1 日~3 日 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. 日本分子生物学会 (招待講演) 2014 年 11 月 25 日~27 日 横浜

Shinichiro Nakada. DNA damage-induced Ubiquitination Affects DNA Repair Pathway Choice. 15th International Congress of Radiation Research (招待講演). 2015 年 5 月 25 日~29 日 京都

中田慎一郎. 相同組換え修復過程におけるユビキチン化の関与. 第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会合同大会 (招待講演) 2015 年 12 月 1 日~4 日

[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.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

(Shinichiro Nakada)

大阪大学/大学院医学系研究科 准教授

研究者番号: 70548528