

新規ユビキチンリガーゼによる Ku70/Ku86 複合体 ユビキチン化の DNA 損傷応答における役割

【1】組織

代表者：石田 典子
(東北大学大学院医学系研究科)
対応者：安井 明
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：中山 啓子
(東北大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 13 万円

【2】研究経過

DNA 損傷応答メカニズムに関する研究は、国内外を問わず非常に注目度が高い領域であるが、近年ではユビキチン化の役割についても、その重要性が示されている。私たちは、ヒストンシャペロン NAP1L1 をユビキチン化し、タンパク質分解を促進する新規ユビキチンリガーゼ RNF が、DNA 損傷応答タンパク質である Ku70/Ku86 と結合して三者複合体を形成し、Ku86 をユビキチン化する (in vitro, in vivo) ことを発見した。Ku70/Ku86 複合体は二重鎖切断における非相同組換え末端結合修復 (NHEJ) 経路で働く重要な因子である。そこで本共同研究では、DNA 損傷応答における RNF ユビキチンリガーゼによる Ku70/Ku86 複合体ユビキチン化の役割を明らかにすることを目的とし、研究を行った。

これまでに本共同研究では ① GFP-RNF タンパク質のリアルタイム解析を行い、DNA 損傷時 (504nm レーザー照射) に GFP-RNF (ユビキチンリガーゼ) が損傷部位へ集積すること ② 特異的抗体を用いた検出により、内在性 RNF タンパク質も DNA 損傷時に損傷部位へ集積し、Ku70/Ku86 と共局在すること ③ その損傷部位への集積は Ku86 に依存すること ④ ガンマ線照射、及びシスプラチン処理による DNA 損傷修復において、siRNA により RNF ユビキチンリガーゼを減少させると、感受性が高まり、修復に対する阻害効果がみられること ⑤ RNF の減少、及び RNF 変異体の過剰発現はガンマ線照射後に形成される γ -H2AX foci 除去も遅延させることを明らかにし、RNF によるユビキチン化がガンマ線照射やシスプラチン処理による DNA 損傷修復の NHEJ 経路で機能し、Ku86 を分解している可能性を示唆するデータを得てきた。そこで

今年度は NHEJ 経路において、RNF が Ku86 を分解して生理的な機能を果たしていることを検証する、より詳細な解析を行った。

以下、具体的な解析方法と研究活動状況の概要を記す。

[1] RNF タンパク質が機能する DNA 損傷修復経路の同定：HR アッセイや NHEJ アッセイ、コメットアッセイなど複数のアッセイ方法を用いて、NHEJ 修復経路で RNF が機能するかを検討

[2] リアルタイム解析や DSB アッセイによる RNF 発現量低下が GFP-Ku86 の DNA 損傷部位への集積や解離に与える影響

[3] DNA 損傷依存的な内在性 Ku86 のユビキチン化の検出

[4] 質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた Ku86 のユビキチン化部位の同定

上記の研究活動を遂行するために、以下 3 回の研究打ち合わせを行い、それ以外にも直接、あるいは電子メールを用いてディスカッション等を随時行った。

第 1 回研究打ち合わせ：平成 22 年 3 月 6 日

第 2 回研究打ち合わせ：平成 22 年 4 月 28 日

第 3 回研究打ち合わせ：平成 22 年 11 月 8 日

【3】成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、HR アッセイ、NHEJ アッセイ (図 1 参照)、コメットアッセイ (図 2 参照) により RNF が NHEJ 経路で機能していることを明らかにした。

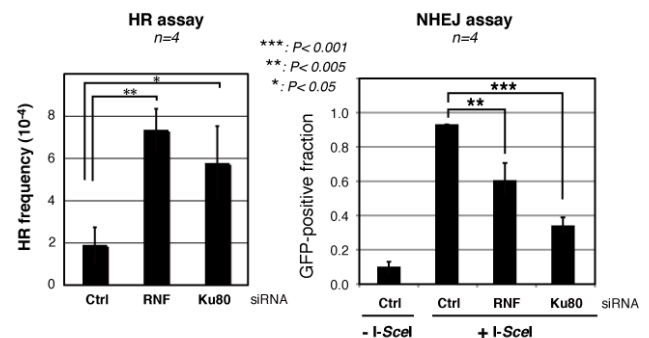


図 1 RNF は HR 経路ではなく、NHEJ 経路で機能する

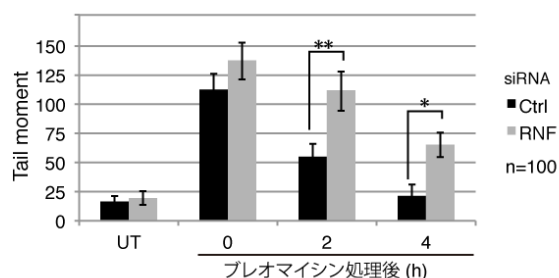


図2 RNFの発現量減少によりNHEJ経路による修復の遅延がみられた

第2に、RNF発現量の低下はDNA損傷部位へのKu86の集積には影響しないが、損傷部位からの解離が遅延する傾向がリアルタイム解析より得られた。しかしインキュベーターがないため、長時間（5時間以上）のリアルタイム解析を安定して行い、データ数を増やすことが困難であった。そこでDSB部位に集積するGFP-Ku86を検出可能な新しい検出方法を用いて、GFP-Ku86の解離を解析した。その結果、RNFの発現量低下によりKu86のDSB部位からの解離が遅れることが示唆された。現在、まだデータを解析中であり、統計処理を行うためにデータ数を増やしている。

第3に、内在性Ku86のDNA損傷依存的なユビキチン化の検出を試みた。これまで従来の免疫沈降法を用いた検出を行ったが、成功していなかった。そこで今回はマルチユビキチン結合ドメインタンパク質を用いたアフィニティー精製を行い、その後抗Ku86抗体でユビキチン化Ku86を免疫沈降するタンデム精製法により、検出を行った。その結果、まだ改良の余地はあるものの、初めて内在性Ku86のDNA損傷依存的なユビキチン化の検出に成功した。

第4に、RNFによるKu86ユビキチン化部位の同定をLC-MS/MSを用いて行った。ユビキチン、Ku86、RNFを発現させたHEK293T細胞から最初に変性条件化でユビキチン化タンパク質、次にユビキチン化Ku86をタンデム精製し、最終的にLC-MS/MS解析により、ユビキチン化された8ヶ所のリジン残基を同定した。現在異なる手法によるLC-MS/MS解析を行うと同時に、同定されたリジン残基をアルギニンに置換したKu86変異体を作製し、この変異体がRNFによるユビキチン化を受けないか解析中である。

以上の得られた研究結果より、RNFユビキチンリガーゼはDNA損傷依存的にKu70/Ku86複合体と結合・ユビキチン化し、NHEJ経路の修復反応終了時にKu70/Ku86を分解し、DNA切断部位より除去している可能性が示された。現在進行中の解析を行うことにより、この仮説を検証し、DNA修復

におけるRNFによるKu70/Ku86制御メカニズムを明らかにすることが期待される。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究で明らかになったRNFユビキチンリガーゼによるKu70/Ku86複合体ユビキチン化の役割に関する成果は、タンパク分解による転写制御とDNA修復の協調的な制御、という新しい研究プロジェクト、コンディショナルノックアウトマウスを用いた個体における機能解析、という研究の発展に結びつき、今後の発展が期待される。

【4】成果資料

本共同研究の研究成果は現在論文投稿準備中であり、直接掲載された論文はまだないため、関連論文を掲載する。

1. Onoyama I, Suzuki A, Matsumoto A, Tomita K, Katagiri H, Oike Y, Nakayama K, Nakayama KI. Fbxw7 controls lipid metabolism and cell fate decision in the liver in mice. *J. Clin. Invest.* 121, 342-54 (2011)
2. Matsumoto A, Tateishi Y, Onoyama I, Okita Y, Nakayama K, Nakayama KI. Fbxw7 β resides in the endoplasmic reticulum membrane and protects cells from oxidative stress. *Cancer Sci.* 102, 749-55 (2011)
3. Wang H, Bauzon F, Ji P, Xu X, Sun D, Locker J, Sellers RS, Nakayama K, Nakayama KI, Cobrinik D & Zhu L. Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1(+/-) mice. *Nat. Genet.* 42, 83-88 (2010).
4. Tsuchiya Y, Asano T, Nakayama K, Kato T, Jr Karin M & Kamata H. Nuclear IKK β is an adaptor protein for I κ B α ubiquitination and degradation in UV-induced NF- κ B activation. *Mol. Cell* 39, 570-582 (2010).
5. Masuda K, Ishikawa Y, Onoyama I, Unno M, de Alboran IM, Nakayama KI & * Nakayama K. Complex regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts. *Oncogene* 29, 1798-1809 (2010).