

## DNA二本鎖切断修復を担うユビキチン化経路の解明

### [1] 組織

代表者：中田 慎一郎  
(大阪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：宇井 彩子  
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費22万7千204円  
旅費7万300円

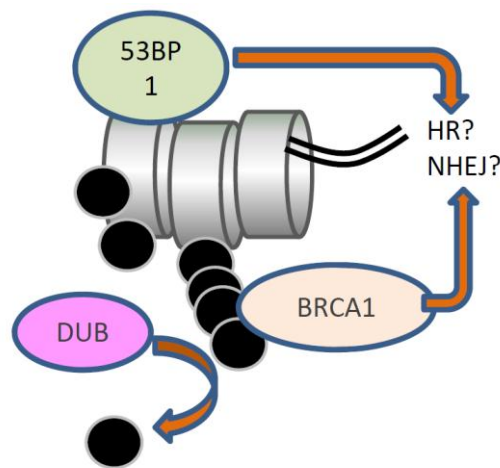
### [2] 研究経過

DNA二本鎖切断は、正常に修復されないと細胞死や発癌につながる遺伝子変異を引き起こす重大なDNA損傷である。また、この損傷の致死性は癌治療に応用されている。DNA二本鎖切断が起こると、DNA損傷部位を取り巻くクロマチンにおいてユビキチン化が行われる。E3ユビキチンリガーゼRNF8とRNF168はE2ユビキチン結合酵素のUBC13とともにヒストンH2Aにリジン63(K63)-linkedユビキチン鎖を付加し、クロマチンの高次構造変換を行い、DNA損傷修復に関連したシグナルを伝達する。また、RNF20/RNF40もDNA二本鎖切断に反応してヒストンH2Bのユビキチン化を行い、相同組換え修復および非相同末端結合を制御している。最近、RNF8はヒストン以外の蛋白をユビキチン化し、DNA損傷のシグナルを伝達していることが解明されてきた。

このように、DNA損傷応答において、ユビキチン化が行われることとそのシグナリングの順序については詳細が解明されてきたものの、ユビキチン化とDNA修復との関連、たとえば、どの分子がどれだけ、どのようにユビキチン化された場合に、相同組換え修復(HR)と非相同末端結合(NHEJ)のどちらが、活性化されるのか抑制されるのか、といったことは未だ判明していない。

本研究では、siRNAライブラリーのスクリーニングやプロテオミクスを用いて、DNA損傷応答時に起こるユビキチン化の新たな制御因子を同定し、ユビキチン化とDNA修復との関連、そしてその制御機構

について分子生物学的に解明するための研究を遂行した。大阪大学側において全般的な研究計画の組み立て、実験を行い、東北大学加齢医学研究所では、マイクロレーザー照射による実験を行うこととした。研究打合わせは主に電子メールと電話により行い、また、2013年2月に東北大学加齢医学研究所において会合を行った。



図：DNA損傷時に発生するクロマチンユビキチン化はどのようにDNA修復に影響するのか。また、その制御はどのように行われているのか。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

元々、KUをユビキチン化のターゲットとする応答を標的にしようと考えていたが、我々の手法では既報データを再現することが難しかったため、新たな標的を探索した。スクリーニング的な研究の結果、我々は、ポリコーム分子L3MBTL1がE3ユビキチンリガーゼRNF8によりユビキチン化され、損傷クロマチンから除去される過程に注目し、この過程を抑制的に制御する新たな脱ユビキチン化酵素を発見した。

L3MBTL1はメチル化ヒストンH4に結合する分子である。一方、DNA損傷応答分子である53BP1もメチル化ヒストンH4に結合するので、L3MBTL1が存在する場合、53BP1はヒストンH4と結合でない。DNA損傷時には、L3MBTL1はユビキチン化され、DNA損傷部位から取り除かれる。これにより、DNA損傷部位

のメチル化ヒストン H4 がむき出しとなり、そこに 53BP1 が結合するようになる。本研究で研究対象としている脱ユビキチン化酵素を過剰発現させると、L3MBTL1 のユビキチン化が強く抑制され、53BP1 の DNA 損傷部位への局在も強く抑制された。この抑制効果は脱ユビキチン活性依存性であり、脱ユビキチン活性を失った変異体を過剰発現させても L3MBTL1 のユビキチン化や 53BP1 の DNA 損傷部位への局在は抑制されなかった。一方、siRNA を用いて脱ユビキチン化酵素の発現を抑制した場合には 53BP1 の DNA 損傷部位への局在は増強された。

これらのデータを基に、我々は、脱ユビキチン化酵素による L3MBTL1 のユビキチン化制御が DNA 損傷応答に重要であると考えた。そこで、L3MBTL1 が損傷クロマチンから除去される過程を脱ユビキチン化酵素が抑制することを細胞形態を保ったまま確認するため、脱ユビキチン化酵素を過剰発現させた細胞にマイクロレーザーを当て、この細胞を免疫染色する実験を行った。ここでは、核全体に染色される L3MBTL1 が DNA 損傷部位に一致して染色されなくなることを示さなくてはならず、これは非常に難しい実験である。（既報ではその結果が示されている。）我々は、L3MBTL1 に対する様々な市販抗体を用いて細胞免疫染色を試みたが、残念ながら、既報のような結果を得ることができなかった。そこで、Flag-tag を融合させた L3MBTL1 を恒常発現する U2OS 細胞を新たに樹立した。この細胞を Flag 抗体により免疫染色すると核全体が均一に染色された。現在、この細胞を用いて、再度実験を行っているところである。

### （3-2）波及効果と発展性など

この共同研究により、本研究室と東北大学加齢医学研究所安井明教授の教室との間の意見交換が活発に行われるようになった。本課題以外の研究についても共同研究を行うことが決定し、互いの研究室の長所を生かし、迅速に成果を上げる共同研究体制の構築が期待できる。また、本共同研究を契機として、本研究室でもマイクロレーザー照射による実験を取り入れる試みを始めており、今後相互の技術移転が期待される。

### 〔4〕 成果資料

研究成果は現時点で未発表である。