

## 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：加藤 希世子  
(大阪大学大学院医学系研究科)

研究費：物件費 25万2千590円  
旅費 4万6千390円

### [2] 研究経過

DNA二本鎖切断 (DNA double-strand break: DSB) は、適切に修復されなければ遺伝子変異や細胞死が誘導される非常に危険なDNA損傷である。DSB修復には大きく分けると相同組換え修復 (homologous recombination: HR) と非同末端結合 (non-homologous end joinin: NHEJ) の2系統が存在する。HRはDNA配列を元の通りに修復する経路であり、姉妹染色体を鋳型として修復を行うため、細胞周期のS期とG2期に限定的に利用され、時間もかかる。一方、NHEJはDSB断端を素早く直接結合させる修復系で、全細胞周期において利用されるが、修復部位においてDNAが変異する場合がある。S期、G2期にはどちらの修復経路も選択的することが可能であるが、その分子機構が解明され始めたのは最近のことである。

HRとNHEJの違いは、切断されたDNA endの処理の違いに顕著に表れる。HRでは、損傷したDNA鎖の末端を姉妹染色分体に侵入させるために、一方のDNA鎖を削り (end resection)、3' overhang (DNA一本鎖) を作り出す必要がある。Resectionを受けたDNA末端はNHEJでは修復されにくい。このことから、DNA end resectionを受けるか、DNA end protectionが行われるかが、修復経路選択の第一の分岐点となる。

DSB部位に集積する分子のうち、53BP1とRAP80はDNA end resectionを抑制しDNA end protectionに働くことが近年の研究により明らかにされている。53BP1とRAP80のDSB部位への局在は、E3ユビキチン

リガーゼRNF8とRNF168によるDSB部位における様々な分子のユビキチン化に依存している。

そこで我々は、「RNF8・RNF168依存性のユビキチン化が増強された場合、DNA end resectionが強く抑制され、DSB修復はNHEJに偏るのではないか」という仮説を立てた。この仮説を検証するために、まず、NHEJが開始されるまでの短い時間にDSB部位におけるユビキチン化を抑制するような脱ユビキチン化酵素を発見し、その脱ユビキチン化酵素の発現を抑制した細胞 (DSB依存性のユビキチン化が増強していると予想される細胞) におけるDNA修復経路選択の状況を検証することにした。

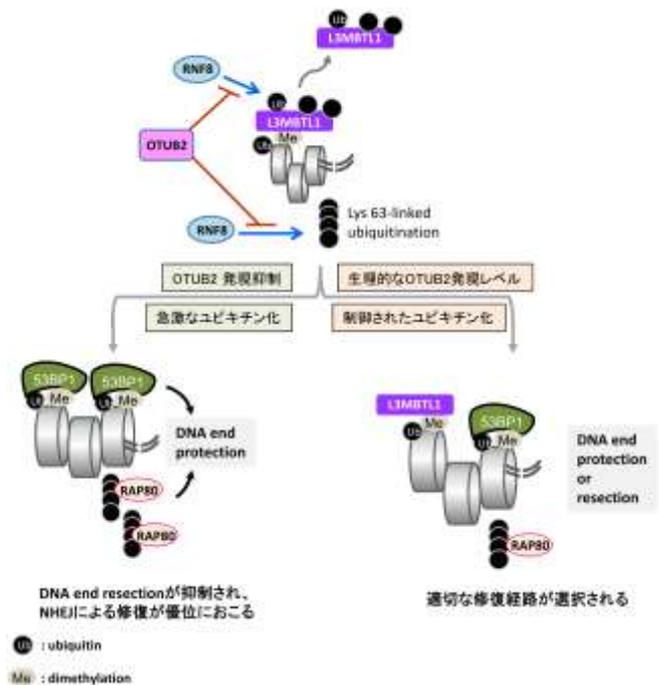


図 OTUB2によるユビキチン化の抑制的制御とDNA修復経路選択への影響  
DNA二本鎖損傷部位では、L3MBTL1のユビキチン化とLys63-linkedユビキチン鎖の伸長がおこる。これらのユビキチン化が急速に進んだ場合(OTUB2ノックダウン細胞の場合)には、L3MBTL1のクロマチンからの除去に続く53BP1の局在とLys 63-linkedユビキチン鎖の伸長に依存したRAP80のDNA損傷部位への局在も急速に進む。その結果、53BP1とRAP80によるDNA end protectionが優位となり、NHEJによる修復が起こりやすくなる。OTUB2は、これらのユビキチン化を抑制することにより、DNA end resectionがおこる環境を整え、適切な修復経路選択を可能とする。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

DSB を起こす薬剤の一つである neocarzinostatin (NCS) 処理から 5 分後の RAP80 の DSB 部位への集積増強をリードアウトとして、全脱ユビキチン化酵素に対する siRNA ライブラリーのスクリーニングを行った。その結果、5 つのヒットが得られ、その中から OTUB2 の機能について解析を進めた。siRNA を用いて OTUB2 をノックダウンした細胞を、NCS 処理後時間を追って固定し、conjugated ubiquitin 特異抗体や DSB 応答関連分子に特異的な抗体を用いて免疫染色した。OTUB2 ノックダウン細胞では、NCS 処理後 5~20 分における DSB 部位でのユビキチン化はコントロール細胞 (non-targeting siRNA をトランスフェクトした細胞) と比較して増強しており、1 時間経過した時点では、同等になっていた。一方、ユビキチン化の上流で起こるヒストン H2AX のリン酸化や MDC1 の DSB 部位への局在 (foci 形成として観察される。) は OTUB2 ノックダウンの影響を受けなかった。これらのデータから、OTUB2 ノックダウン細胞ではユビキチン化反応が通常より加速していると考えられた。また、NCS 処理後 5~30 分における RNF168 (RNF8 によるユビキチン化に依存して DSB 部位に局在する E3 ユビキチンリガーゼ)、RAP80 および 53BP1 の DSB 部位への集積も増強していた。

また、Flag-OTUB2 を過剰発現した細胞を NCS 処理後固定し、様々な DSB 応答関連蛋白を蛍光免疫染色したところ、OTUB2 の過剰発現により、RNF8 依存性のユビキチン化が抑制されることが示された。さらに *in vitro* および *in vivo*、でのユビキチン化アッセイおよび脱ユビキチン化アッセイにより、OTUB2 は L3MBTL1 のユビキチン化および Lys 63-linked ユビキチン鎖の伸長を抑制することが示された。

これらのデータを基に、我々は、脱ユビキチン化酵素 OTUB2 が DNA 損傷部位に局在かどうか検証することにした。その一つの方法として、マイクロレーザー照射により発生させた DSB 部位への OTUB2 の局在変化を観察した。この実験により、GFP-OTUB2 を一過性に発現させた細胞では、GFP-OTUB2 のシグナルが弱いながらマイクロレーザー照射部位に検出されることが示された。

最後に、OTUB2 ノックダウン細胞において増強したユビキチン化が DSB 修復にどのように影響するかを調べたところ、NHEJ が促進され、HR が抑制されていることが示された。

結論として、OTUB2 は、RNF8 によるユビキチン化を抑制的に制御することにより、適切な DNA 修復経路が選択できるような環境を整えていると考えられた。

#### (3-2) 波及効果と発展性など

脱ユビキチン化酵素 OTUB2 および E3 ユビキチンリガーゼ RNF8 による DSB 修復経路選択機構の一端が明らかにされた。RNF8 ノックダウン細胞は放射線に高感受性を示すにもかかわらず、RNF8 依存性ユビキチン化が DSB 修復にどのように関与しているか、これまで明らかにされてこなかった。本研究により、その役割の一端が明らかとなった。本研究の成果は、ユビキチン化依存性クロマチンリモデリングと DSB 応答との関連のさらなる解明にむけた基盤の一つとなると期待できる。

記載内容については「ライフサイエンス新着論文レビュー」でも記載した。

### [4] 成果資料

Kiyoko Kato, Kazuhiro Nakajima, Ayako Ui, Yuri Muto-Terao, Hideaki Ogiwara, and Shinichiro Nakada. Fine-Tuning of DNA Damage-Dependent Ubiquitination by OTUB2 Supports the DNA Repair Pathway Choice. *Molecular Cell* **53**, 617-630 (2014)