

## 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 33 万 3 千円，旅費 5 万 5 千円

### [2] 研究経過

#### 本研究の目的・概要

DNA2 本鎖切断修復のシグナリングにはリン酸化による翻訳後修飾が重要であることが知られていた。しかし、そのシグナリングのうちの一部はリン酸化では説明できないことも知られていた。本研究課題の代表者は、E3 ユビキチンリガーゼ RNF8 および RNF168 が DNA 損傷応答シグナリングに重要であることを発見し、これまで不明とされていたシグナリングが非分解性ユビキチン化依存的に行われていることを明らかにした。

ユビキチンが関わる DNA 損傷応答についての研究はその後飛躍的に進み、RNF8 や RNF168 以外の様々な E3 ユビキチンリガーゼも関与し、また、ユビキチン化される基質も非常に多いということがわかってきた。

我々は、これまでの前年度まで共同研究において、ユビキチン化レベルの精密な制御機構が適切な DNA 修復経路の選択に必要であることを見だし、発表してきた (図)。しかし、この研究成果は、ユビキチンが関わる DNA 損傷応答の 1 部に焦点を絞ったものであり、他の多彩なユビキチン依存性 DNA 損傷応答と DNA 修復との関連も重要な研究課題である。

本共同研究では、ユビキチン依存性の DNA 損傷応答シグナルと相同組換え修復との関連を明らかにすることを目的として研究を行った。

#### 研究打ち合わせ等の開催状況

2014年6月5、6日に、東北大学加齢医学研究所にて、安井明教授や他の共同研究課題代表者であ

る群馬大学の柴田淳史博士、さらに DNA 損傷応答研究を行っている複数の若手研究者らとともに、研究の打ち合わせを行った。非常に熱心な討論が行われ、DNA 損傷応答研究における問題点などが明確に浮かび上がった有意義な打ち合わせとなった。

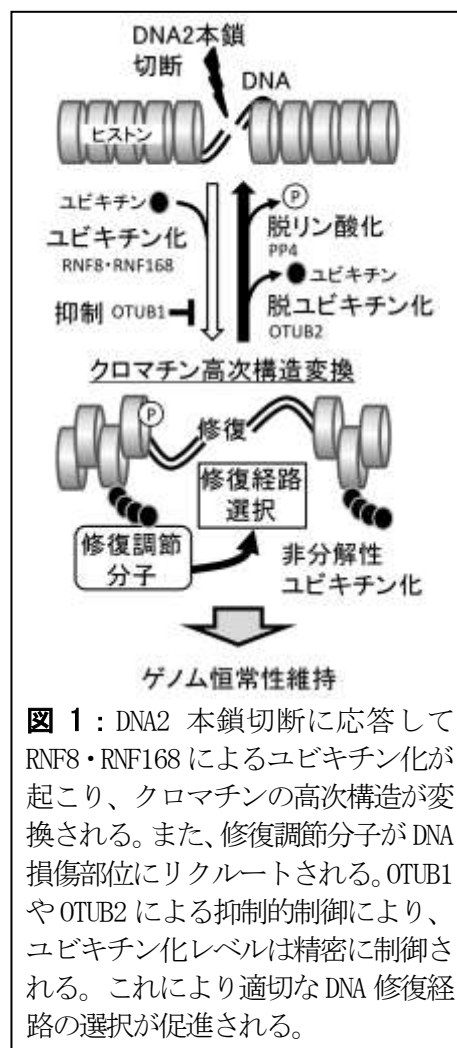


図 1：DNA2 本鎖切断に反応して RNF8・RNF168 によるユビキチン化が起こり、クロマチンの高次構造が変換される。また、修復調節分子が DNA 損傷部位にリクルートされる。OTUB1 や OTUB2 による抑制的制御により、ユビキチン化レベルは精密に制御される。これにより適切な DNA 修復経路の選択が促進される。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は以下に示す成果を得た。

- ①相同組換え修復にはユビキチン化が関与する。本研究課題の代表者は、脱ユビキチン化酵素 OTUB1 が UBE2N (UBC13) および UBE2D・2E (UBCH5 など) ファミリーの E2 ユビキチン結合酵素の機能を阻害

することを見だし発表してきた。そこで、OTUB1 を過剰発現した細胞に DNA 損傷を与え、固定した後には相同組換え修復に関わる分子の蛍光免疫染色を行った。その結果、OTUB1 過剰発現細胞では、相同組換え修復経路が途中で停止していることが明らかとなった。E2 に結合できない変異体 F133A はこの経路に全く影響を与えなかったことから、相同組換え修復にはユビキチン化が関与していることが明らかとなった。

## ② 相同組換え修復に関与する E3 および E2 の同定した

siRNA を用いて E3 ユビキチン連結酵素と E2 ユビキチン結合酵素をノックダウンし、相同組換え修復経路への影響を蛍光免疫染色やウエスタンブロッティング法により解析することにより、相同組換え修復に関与する E3 と E2 を同定した。

## ③ レポーターアッセイの構築

Crispr/Cas9 システムにより DNA 損傷修復効率を測定するためのレポーターアッセイ系を作製し、そのテストを行った。実際に実験系として機能することを確認した。

### (3-2) 波及効果と発展性など

国際学会において、研究成果を発表したが、その際、海外および国内の研究室において同様の研究が行われていることが明らかとなった。しかし、それぞれの研究室のデータは細かなところで異なっている。その原因の一つは、DNA 損傷を発生させるために用いている薬剤が異なっていることにあると考えている。このことは、未だ明らかにされていない相同組換え修復の複雑な制御機構を明らかにするための契機となると考えられる。

本共同研究において開催した打ち合わせにおいて、比較的若手の DNA2 本鎖損傷研究者が集まったことにより、来年度、より研究内容を詳細に検討するための開催することとなり、DNA 損傷応答研究のさらなる展開に発展しつつある。

## [4] 成果資料

Kazuhiro Nakajima and Shinichiro Nakada Multiple Ubiquitination pathways suppress RAD51 recruitment through facilitating RPA S4/S8 phosphorylation. Keystone Symposia 2015 Canada