

課題番号 63

ゲノム恒常性維持機構における RNF8 のシグナル経路の解明

[1] 組織

代表者：中田 慎一郎
(大阪大学・高等共創研究院)

対応者：宇井 彩子
(東北大学加齢医学研究所)

研究費：物件費 10 万円

[2] 研究経過

DNA2 本鎖損傷 (DNA double strand break : DSB) は致命的な DNA 損傷であり、またその異常修復は細胞がん化につながる。核内に発生した DSB は速やかに検出され、その情報がシグナルとして伝達・修復されるが、この一連のシグナリングは DNA 損傷応答 (DNA damage response: DDR) と呼ばれる。

この DDR において、ユビキチン化はリン酸化と並び中心的な翻訳後修飾であるが、その中核を担うのが E3 ユビキチンリガーゼ RNF8 および RNF168 である。この DDR におけるユビキチンシグナルの発見 (申請者: Science 2007, Cell 2009) 以降、ユビキチン依存的 DDR の役割や分子機構が世界中で精力的に研究されてきた。ここ約 10 年間に様々な研究成果が発表されてきたにもかかわらず、RNF8-RNF168 依存的な DDR には、いくつかの根本的な謎が未解明のまま残されており、分子機構の一部は「予想」や「論議中」の段階にとどまっている。

本研究では RNF8 の新規結合因子を同定することにより、RNF8-RNF168 依存的な DNA 修復メカニズムの新たな展開を目指すことを目標とした。

なお、年度内に 2 回の研究打ち合わせを Web 会議にて実施した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

Bio Grid (<https://thebiogrid.org>) より、RNF8 に結合することが報告されているが、まだ RNF8 経路での機能が未解析な因子を 27 因子抽出した (図 1)。

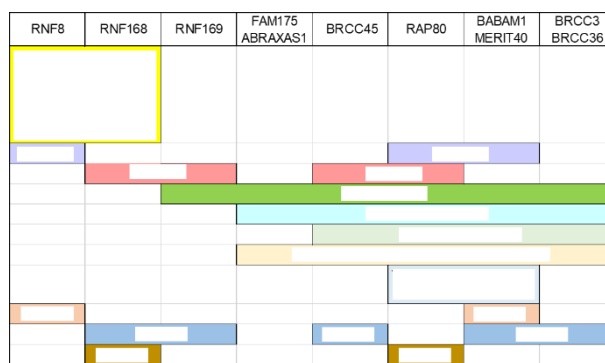


図 1. RNF8結合因子の同定

次に、上記因子の DSB 修復への関与を検討した。相同組換え (HR) 頻度測定のスランダードである DR-GFP アッセイにより、HR 頻度を測定した。DR-GFP 細胞に各遺伝子に特異的な siRNA を個々に導入した後、制限酵素 I-sceI 発現ベクターを導入し、HR により GFP 陽性となった細胞の割合をフローサイトメトリーを用いて解析した。siRNA の導入により HR 活性が低下した遺伝子は複数存在した (図 2)。本研究では、遺伝子 X (仮称) に着目し、研究を進めることとした。

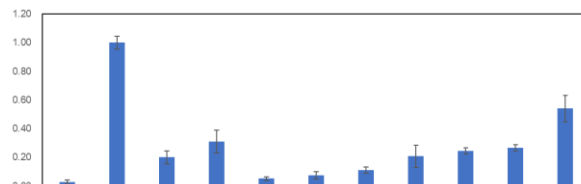


図 2. DR-GFP assayによるHR活性の測定

BRCA1 および 53BP1 の DNA 損傷部位への局在に関して、遺伝子 X のノックダウンにより発生する影響を検証した。BRCA1 および 53BP1 は RNF8-RNF168 に依存的に DNA 損傷部位に局在する因子として知られている。遺伝子 X をノックダウンした細胞では、BRCA1 の DSB への局在は減弱した。一方、53BP1 の DSB への局在は増強した (図 3)。53BP1 は HR 抑制因子として知られており、DR-GFP アッセイと相容れる結果となった。

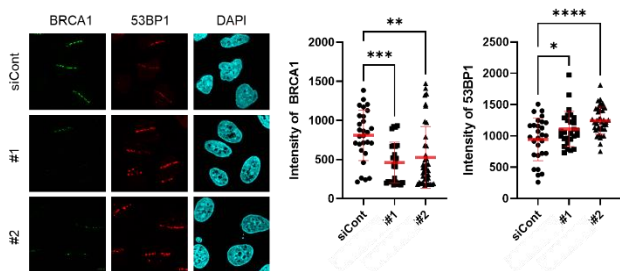


図3. BRCA1と53BP1のDSB結合に対する影響

これらの結果から、遺伝子 X は 53BP1 の DSB 部位への局在を抑制することで、HR を促進すると予想した。53BP1 の HR 抑制機構の一つは、HR に必須である DNA end resection (DNA 断端において、3'端の 1 本鎖 DNA を露出させる機構) の抑制である。そこで、遺伝子 X のノックダウンが与える、DNA end resection への影響を解析した。その結果、遺伝子 X ノックダウン細胞では、RPA リン酸化が減弱していることが示された。RPA は end resection により露出した 1 本鎖 DNA に結合し、その後リン酸化を受ける。このことから、遺伝子 X のノックダウンにより DNA end resection が抑制されることが示唆された (図 4)。

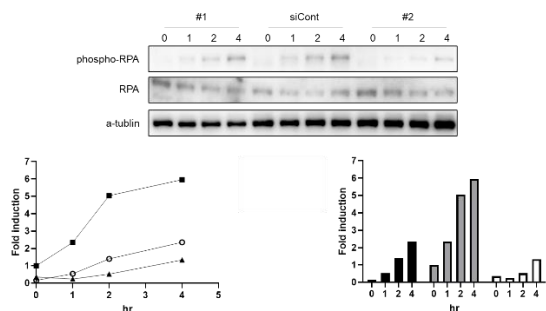


図4. DNA end resectionに対する影響

以上の結果より、遺伝子 X は 53BP1 の DSB への局在を抑制することにより、DNA end resection を促進し、HR による DNA 修復を起しやすくと考えられた。

HR は DNA1 本鎖切断に複製フォークが衝突した際に発生する DNA 損傷 (one-ended DSB) の修復に必須である。DNA1 本鎖切断は PARP 阻害剤である オラパリブにより未修復に保つことが可能である。オラパリブに暴露した増殖期の細胞では、one-ended DSB が蓄積することとなる。HR が機能しない細胞をオラパリブに暴露すると、one-ended DSB が修復できず、致死となる。遺伝子 X 発現抑制細胞はオラパリブへの暴露により生存率が低下したことから、遺伝子 X は one-ended DSB の HR に重要であると考えられる。

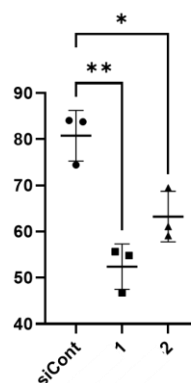


図5. オラパリブ感受性に対する影響

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究から RNF8 のユビキチン経路の制御に関わる新規因子が見出された。これまでに得た結果から、遺伝子 X は RNF8 よりも下流、53BP1 のリクルートよりも上流で機能することが予想される。RNF8 と直接結合するのか、RNF8 によるユビキチン化を受けるのか、もしユビキチン化を受けるのであれば、ユビキチン化により機能が変化するのか、それとも遺伝子 X の産物が DNA 損傷部位から除去されるのかなど、今後解明しなくてはならない課題が残されているが、RNF8 依存的 DDR の新規機構の解明につながる可能性が高いと期待できる。

遺伝子 X はがん細胞で過剰発現していることが報告されている。このため、本研究は RNF8 のユビキチンシグナル経路と細胞がん化の未解明な領域を解き明かす新たな実験系の構築につながると考えられる。今後は更に実験系を進展させて、新たなメカニズムの解明につなげたい。

[4] 成果資料 準備中