

令和元年6月24日現在

機関番号：32692

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19615

研究課題名(和文)クロマチン構造を介した転写とDSB修復の共役のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Investigation of the mechanism underlying the association between DSB repair and Transcription

研究代表者

宇井 彩子 (UI, Ayako)

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：00469967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二重鎖切断(DSB)は、致命的なDNAダメージであり、がんを引き起こす。近年、このDSBが転写抑制を引き起こし(DSB依存的な転写抑制)、この転写抑制はゲノム不安定性とがん化を抑制していることが明らかになった。そこで本研究では、DSB依存的な転写抑制、DSB修復、ゲノム不安定性の関連を解析した。その結果、転写とDSB修復に関わるヒストンのユビキチン化因子が、DSB依存的な転写抑制に必要であることを明らかにした。またDSB依存的な転写抑制を引き起こすヒストン修飾を同定した。これらの結果は、今後のゲノム不安定性とがん化のメカニズムの解明に貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、DSB依存的に起こる転写抑制は、ゲノム安定性維持と細胞がん化の抑制に重要な役割を果たすことが明らかになってきている。そこで本研究の成果は、ゲノム安定性維持のメカニズムの解明による細胞がん化機構の解明につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DSB (DNA double strand break) is one of harmful DNA damage that induces cancer. Recently, DSB-induced transcriptional repression prevents genome instability and cancer. In this study, we investigated the relationship between DSB-induced transcriptional repression, DSB repair and transcription. We found that factors of histone ubiquitination which have been reported to be involved in transcription and DSB repair are required for DSB-induced transcriptional repression. In addition, we identify the histone modifications that are required for DSB-induced transcriptional repression. These findings may be an important information to reveal the mechanism of genome instability and cancer.

研究分野：DNA修復

キーワード：DNA修復

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

DNA 二重鎖切断 (DSB) は、致命的な DNA ダメージであり、がんを引き起こす。近年、この DSB が転写抑制を引き起こし (DSB 依存的な転写抑制) この転写抑制はゲノム不安定性とがん化を抑制していることが明らかになりつつある (Ui et al., Nucleus, 2016; Ui et al., Molecular Cell, 2015) (図 1 (A) (B))。しかし、DSB の近傍での転写抑制はどのように制御されているのか、DSB 修復はどのような経路により起こるのかは未だ不明なままである。また、この転写抑制にはポリコム複合体が関与するユビキチン経路が重要な役割を果たすことが明らかになっている。しかし、ポリコム以外のユビキチン化経路が関与する可能性や、ユビキチン関連因子が DSB 修復に関与する可能性は不明な点が多い。

2. 研究の目的

そこで本研究では、DSB 依存的な転写抑制がどのように起こるのかを明らかにする。以前、我々は DSB 依存的な転写抑制はポリコム因子により制御されていることを明らかにした。しかしポリコム以外のユビキチン経路も関与している可能性が示唆されているため (Ui et al., Nucleus, 2016; Ui et al., Molecular Cell, 2015) (図 1 (A))、他のユビキチン経路の転写における関与を明らかにする。特に DSB 修復において重要な役割を果たすユビキチン経路としてユビキチン E3-ligase である RNF168 と RNF8 が関わるユビキチン経路が知られており、その下流に家族性乳がん原因遺伝子でありユビキチン E3-ligase である BRCA1 が機能していることが知られている。これらのユビキチン経路が DSB 修復と転写の制御に重要な役割を果たしている可能性は高い。そこでポリコム経路との機能的関連を明らかにする。

また、転写近傍の DSB 修復はどのような修復経路により制御されているかは不明な点が多い。DSB 修復は、時間がかかるが正確な修復である Homologous Recombination (HR) 経路、早いエラーが多い None homologous end joining (NHEJ) 経路という二つの経路により修復されることが知られている。そこでこれらの修復経路の関与を明らかにし、ゲノム不安定性がいかに保たれているかを明らかにする。さらに、ユビキチン関連因子が、DSB 修復の中でどのような機能を担っているのかを解明し、転写抑制に関与する可能性を検討する。

3. 研究の方法

転写と DSB の機能的関連を明らかにするために、独自に開発した転写と DSB を簡便に可視化する方法を用いた (図 1 (C))。この実験系は、エストロゲンにより転写を活性化できるカセットが染色体上に導入されており、その転写のプロモーター部分に制限酵素の I-SceI サイトが

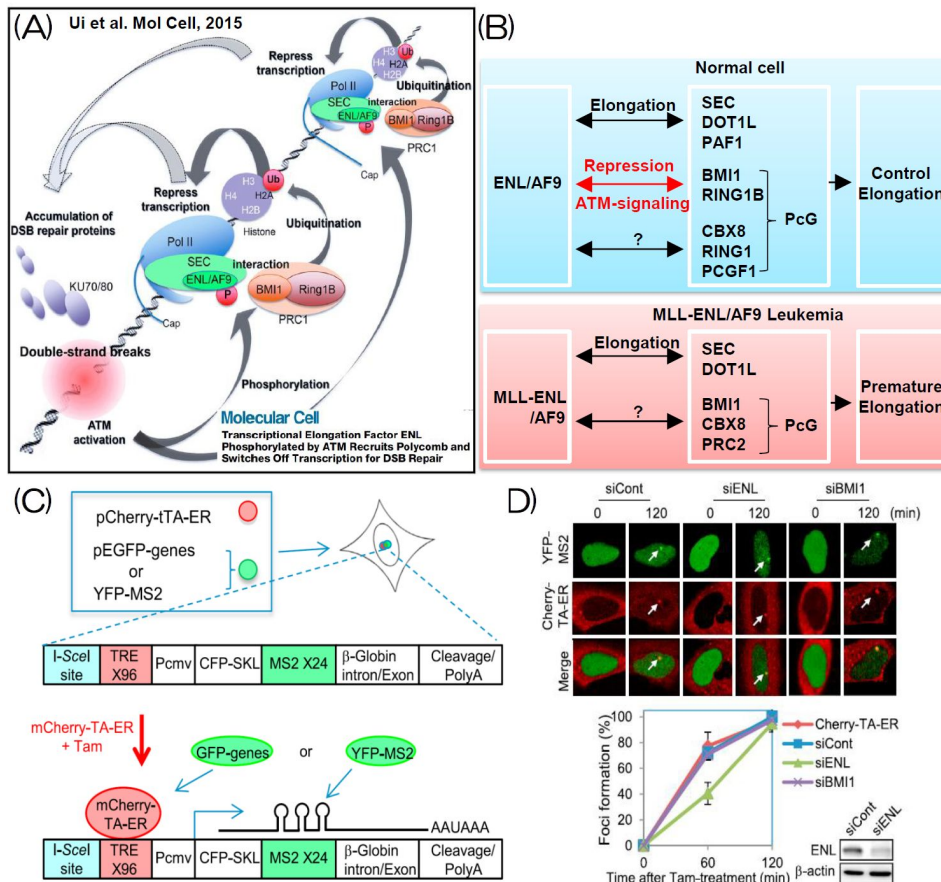


図 1. (A) 転写とDSB修復は共役して機能するという新たな共役機構により、ゲノムの安定性が維持されていることを見出した (Ui et al. Mol Cell, 2015)。 (B) これは、それまで不明であった ENL/MLLT1 とポリコムの新たな細胞内機能の発見にもつながった。 (C) しかし転写とDSB修復機構の共役メカニズムは不明な点が多い。そこで独自に開発した、“転写”と“DSB修復”を同時に検出する実験系を用いて本研究を行った。 (D) 本研究に用いた実験系を用いると、ライブイメージングにより簡便に“転写とDSB修復”を観察できる。

ある(図1(C))。このため、I-SceI のプラスミドを発現させることにより、I-SceI による DSB を入れることができる。そして、DSB の発生は DSB マーカーである γ H2AX の免疫染色などにより検出できる。

さらに転写活性化もライブで検出できる(図1(D))。転写の活性化により生成される RNA が取る立体構造を YFP-MS2 が認識することにより可視化できる。GFP-に転写因子や DSB 修復因子を融合させることにより、転写部位へのこれら因子の結合を観察することができる。また免疫染色などにより、転写や DSB 修復の進行も観察することができる。さらに、放射線や抗がん剤、顕微鏡のレーザーを用いて DSB を導入し、転写や DSB 修復に関する因子の挙動を検討した。

4. 研究成果

今回、RNF8 のノックダウンにより、DSB による転写抑制が減少した。また、ポリコームのユビキチン経路と RNF8 のユビキチン経路はお互いに影響しあい機能している可能性を示唆する結果が得られた。さらに、この転写抑制に RNF8 と RNF168 の下流で機能する家族性乳がん原因遺伝子の BRCA1 やそれと拮抗して働く 53BP1 が機能している可能性を示唆する結果が得られている。

また転写抑制近傍でおきる DSB 修復も転写の活性化状況に影響を受ける可能性を見出している。特に転写活性化因子や抑制因子の発現の変化や、ヒストン修飾因子の機能低下などにより転写抑制が影響を受ける可能性を見出した。

これらの結果より、転写と DSB 修復に関わるヒストンのユビキチン化因子が、DSB 依存的な転写抑制に必要であることを明らかにした。また DSB 依存的な転写抑制を引き起こすヒストン修飾を同定した。これらの結果は、今後のゲノム不安定性とがん化のメカニズムの解明に貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Yasuda T, Kagawa W, Ogi T, Kato TA, Suzuki T, Dohmae N, Takizawa K, Nakazawa Y, M D., Genet, Saotome M, Matsumoto K, Aizawa Y, Hama M, Konishi T, Nakajima I, Hazawa M, Tomita M, Koike M, Noshiro K, Tomiyama K, Obara C, Gotoh T, **Ui A**, Fujimori A, Nakayama F, Hanaoka F, Sugasawa K, Okayasu R, Penny A, Jeggo, Tajima K.
Novel Function of HATs and HDACs in Homologous Recombination through Acetylation of Human RAD52 at Double-Strand Break Sites
PLoS One, 14, e1007277, 2018 (査読あり)
2. Niida H, Matsunuma R, Horiguchi R, Uchida C, Nakazawa Y, Motegi A, Nishimoto K, Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Moriwaki S, Nishitani H, **Ui A**, Ogi, T and Kitagawa M.
Phosphorylated HBO1 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair.
Nature Communication, 8, 16102, 2017 (査読あり)
3. Watanabe R, Kanno S, Mohamadi A, **Ui A**, Yasui A.
Nucleosome remodeling, DNA repair and transcriptional regulation build negative feedback loops in cancer and cellular aging.
Philos. Trans. Biology, 372, 1731, 2017 (査読あり)

〔学会発表〕(計7件)

1. **宇井彩子**

DSB シグナル伝達と修復における PRC1 とヒストンユビキチン化に関する分子機能解析
日本分子生物学会 ワークショップ 2018年12月 2018/11/29

2. **宇井彩子**

DSB シグナル伝達と修復におけるヒストン修飾因子とクロマチンリモデリング複合体の機能解析
日本放射線影響学会 シンポジウム 2018年10月 2018/11/7

3. **宇井彩子**

DSB 修復におけるヒストンメチル化 H3K4 の機能
日本遺伝学会 2018年10月 2018/9/21

4. **宇井彩子**

DSB 修復に関わる新規 Ubiquitin E3-ligase の機能解析
日本分子生物学会 ワークショップ 2017 年 12 月

5. **宇井彩子**

DSB 修復を制御する Ubiquitin E3-ligase の新規機能
日本放射線影響学会 シンポジウム 2017 年 10 月

6. **宇井彩子**

DSB 修復に関わる Ubiquitin E3-ligase の機能解析
国立遺伝学研究会 ワークショップ 2017 年 10 月

7. **宇井彩子**

DSB 修復を制御する Ubiquitin E3-ligase の新規機能
日本遺伝学会 ワークショップ 2017 年 9 月

6. 研究組織