

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月22日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21510055

研究課題名（和文） ゲノム損傷応答機構におけるCUL4/DDB1ユビキチンリガーゼの新機能の解明

研究課題名（英文） Functional analysis of CUL4/DDB1 ubiquitin E3 ligase in DNA damage response

研究代表者

若杉 光生 (WAKASUGI MITSUO)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号：80345595

研究成果の概要（和文）：

生体がおもつ発がんの防御システムの1つであるDNA損傷応答反応において、ユビキチン化反応やそれを介したシグナル伝達は極めて重要である。本研究ではCul4/DDB1ユビキチンリガーゼのアダプターとして機能するDDB1のコンディショナルノックアウト細胞を用いて、DNA傷害が生じた時のCul4/DDB1ユビキチンリガーゼの破綻による影響を詳細に解析し、細胞の生存においてユビキチンリガーゼとしての機能が必須であることを示した。

研究成果の概要（英文）：

The Cul4/DDB1 complex is a recently identified culling-RING ubiquitin ligase, which regulates DNA repair, DNA replication and transcription. We analyzed the potential functions of DDB1 in the responses to various DNA damaging agents using a conditional knockout DT40 cells. Furthermore, we found that the interaction between DDB1 and Cul4 is absolutely required for cell viability, suggesting an essential role of DDB1 as a component of Cul4/DDB1 ubiquitin E3 ligase.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,300,000 | 390,000 | 1,690,000 |
| 2010年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：ゲノム、シグナル伝達、DNA損傷応答、ユビキチン

1. 研究開始当初の背景

生体がおもつ発がんの防御システムであるDNA損傷応答反応においても、ユビキチン化反応やそれを介したシグナル伝達の重要性が明らかにされている。本研究計画で着目しているCul4/DDB1ユビキチンリガーゼは、他のCullinファミリーと比較して研究が遅れていたCullin4 (Cul4)を含むRING型ユビキチンリガーゼであり、Damaged

DNA-binding protein 1 (DDB1)は、そのアダプターとして基質の認識に関わっている。ここ数年でいくつかの基質が明らかにされ、ヌクレオチド除去修復のDNA損傷の認識に関わるXPCや転写と共役した修復に関わるCSB等のDNA修復タンパク質も基質となることがわかった。しかし、さらに多くの標的となるタンパク質の存在を示唆するよう

に、数百もの基質特異的なレセプターと推定されるタンパク質 (DCAF) が存在することが判明し、その多様な機能が注目されている。また、その可能性を支持するように、多くのグループによりその欠損体の多様な表現型が報告されている。特に、分裂酵母の DDB1 欠損体においては、複製チェックポイントを介した S 期進行の異常、自然突然変異率の上昇、染色体分配の異常などの表現型が観察され、遺伝情報の維持においても重要な役割を担っていることが示唆される。また、高等動物における DDB1 欠損体に関しては、最近になってコンディショナルノックアウトマウスが作製され、個体の発生における必須な機能が明らかになったが、DNA 傷害が生じた時の DDB1 欠損の影響については、その欠損が致死となるために十分な解析が行われていないのが現状である。

一方で、我々も DDB1 の種間における高度な保存性に着目し、その機能を明らかにするためにニワトリ DT40 細胞を用いてノックアウト細胞の作製と解析を行ってきた。驚くべきことに DDB1 の欠損は細胞レベルでも致死であり、DDB1 が細胞の増殖や生存に必須の機能を持つことを明らかにした。現在は、この必須機能に関する解析と同時に、DNA 損傷応答における役割について解析を進めていたところ、新規の機能を示唆する結果が得られていた。これらの実験結果と数百もの基質が明らかになっていないレセプターが存在することは、DDB1 の DNA 損傷応答における未知の機能を示唆しており、それらを解明したいと考えて本研究計画を着想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、ユビキチンリガーゼのアダプターとして機能する DDB1 のコンディショナルノックアウト細胞を用いて、DNA 傷害が生じた時の Cu14/DDB1 ユビキチンリガーゼの標的分子やその破綻による影響を解析し、DNA 損傷応答における機能を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

DDB1 の変異体もしくは分解タグを付加した DDB1 発現細胞の単離には、コンディショナル DDB1 ノックアウト DT40 細胞を用いた。図 1 で示したように、DDB1 コンディショナルノックアウト細胞に、変異型もしくは分解タグを付加した DDB1 を MicroPorator MP-100 (エル・エム・エス) を用いてトランスフェクションし、薬剤耐性細胞株を単離し、ウェスタンブロッティングにより、安定発現細胞株をスクリーニングした。コンディショナルノ

ックアウト細胞内の最初に導入したトランスジーンがドキシサイクリンの添加により発現が抑制されることを利用し、新たに導入した恒常的に発現する DDB1 の変異の及ぼす影響について解析を行った。

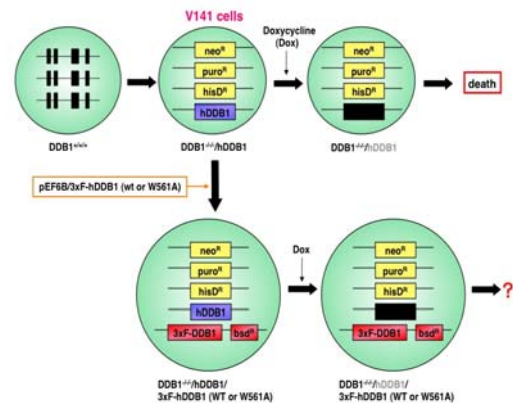


図 1 コンディショナルノックアウト細胞を用いた安定発現細胞株の単離と表現型解析の概略

4. 研究成果

DT40 細胞を用いて作製したコンディショナルノックアウト細胞を用いて、DDB1 を欠損した時の各種 DNA 傷害剤に対する感受性や応答性について検討した。感受性は色素排除法により解析を行ったが、紫外線、X 線、カンプトテシン、エトポシド、シスプラチン、過酸化水素、ヒドロキシウレアのいずれにおいてもわずかな抵抗性を示し、この指標では信頼のおける結果が得られないと判断した。そこで細胞周期分布の変化に注目して解析を行ったところ、カンプトテシンやエトポシドを処理した時に、野生型の DT40 細胞や DDB1 存在下では著しい G₂/M 期への蓄積がみられたが、DDB1 を欠損させた場合には S 期の初期で遅延または停止していることがわかった。この結果は、解析が進んでいる紫外線による DNA 損傷のみならず、二本鎖切断を誘起するこれらの薬剤に対する応答反応への関与を示唆しており、非常に興味深い。

また二本鎖切断が誘起された時にヒストン H2A のバリエーションである H2AX がリン酸化され、さらにユビキチン化を受けることが知られており非常に注目を集めている。我々は DSB が生じない紫外線によっても H2AX がリン酸化されることを見いだして解析を行ってきたが、紫外線によってもリン酸化体である γH2AX がユビキチン化されることを新たに発見した。さらに興味深いことには、その反応に DDB1 の関与を示唆する結果を得た。今後はその結果を注意深く検証するとともに、その反応の意義を明らかにしていきたい。

そして、DDB1 のユビキチンリガーゼとしての機能の重要性を明らかにするために、まず立体構造的に DDB1 と Cul4 との相互作用に必要と考えられるアミノ酸に変異を導入した各種 DDB1 を作成し、相互作用に重要なアミノ酸を同定した。その変異型 DDB1 を DDB1 コンディショナルノックアウト細胞に導入し、Cul4/DDB1 ユビキチンリガーゼの基質の量について調べたところ、DDB1 を欠損した場合と同様に基質の量が増加し、ユビキチンリガーゼとしての機能が失われていると考えられた (図 2)。この Cul4 との相互作用が消失した DDB1 変異体の表現型の解析を行ったところ、この変異体が DDB1 を完全に欠損した場合と全く同様な表現型を示し、細胞致死に至ることがわかった (図 3)。したがって、DDB1 の生存に必須な機能がユビキチンリガーゼとしての機能によることがわかった。

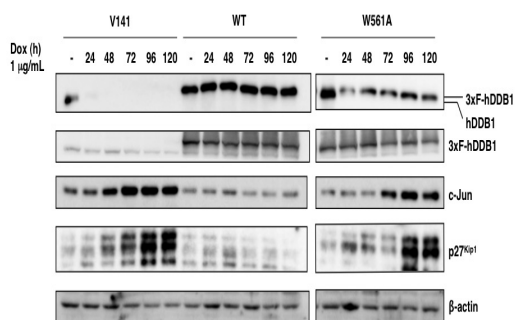


図 2 DDB1 変異によるユビキチンリガーゼの機能消失

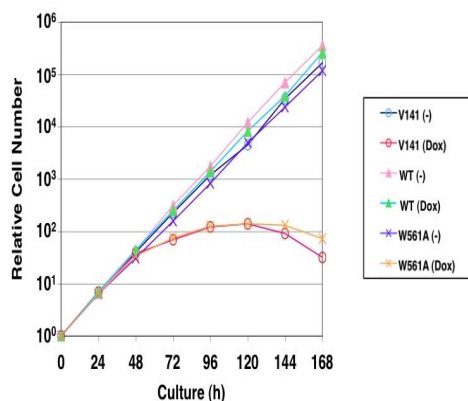


図 3 DDB1 変異の増殖能に及ぼす影響

これまでにコンディショナルノックアウト細胞を用いて、いくつかの新規の知見を得ることができたが、この実験系では DDB1 が消失するまでの時間が長く、間接的な効果を見ている可能性が否定できないため、短時間で発現調節の可能な分解誘導による発現抑制系の導入を試みた。分解タグを付加した

DDB1 を一過性に発現させ、DDB1 の発現が極めて速やかに抑制されることを確認できた。安定発現細胞の樹立に進め、DT40 細胞を用いて内在と同程度の発現を持つ細胞株を得た。今後は得られた細胞株の詳細な性格付けを早急に行い、本研究により得られた新規の知見を検証するとともに、十分に解析することのできなかつた Cul4/DDB1 ユビキチンリガーゼの基質を同定していきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Nishinaga M, Kurata R, Onishi K, Kuriyama K, Wakasugi M, Matsunaga T. (2012) Establishment of a microplate-formatted cell-based immunoassay for rapid analysis of nucleotide excision repair ability in human primary cells., *Photochem. Photobiol.* 88, 356 - 62. 査読有, doi:10.1111/j.1751-1097.2012.01073.x.
- ② Fischer ES, Scrima A, Bohm K, Matsumoto S, Lingaraju GM, Faty M, Yasuda T, Cavadini S, Wakasugi M, Hanaoka F, Iwai S, Gut H, Sugawara K, Thoma NH. (2011) The molecular basis of CRL4DDB2/CSA ubiquitin ligase architecture, targeting, and activation. *Cell.* 147, 1024 - 1039. 査読有, doi:10.1016/j.cell.2011.10.035
- ③ 若杉光生, 松永司 (2011) 「休止期におけるヌクレオチド除去修復依存的な二次的 DNA 損傷の生成」 *放射線生物研究* 46, 322 - 331. 査読無, <http://www.narmed-u.ac.jp/~oncra/rbrc/>
- ④ Fisher LA, Bessho M, Wakasugi M, Matsunaga T, Bessho T. (2011) Role of interaction of XPF with RPA in nucleotide excision repair., *J Mol Biol.* 413, 337 - 346. 査読有, doi: 10.1016/j.jmb.2011.08.034
- ⑤ Uchida S, Watanabe N, Kudo Y, Yoshioka K, Matsunaga T, Ishizaka Y, Nakagama H, Poon RY, Yamashita K. (2011) SCFβ(TrCP) mediates stress-activated MAPK-induced Cdc25B degradation. *J Cell Sci.* 124, 2816 - 2825. 査読有, doi: 10.1242/jcs.083931
- ⑥ Wakasugi M, Kasashima H, Fukase Y, Imura M, Imai R, Yamada S, Cleaver JE, Matsunaga T. (2009) Physical and functional interaction between DDB and XPA innucleotide excision repair. *Nucleic Acids Res.* 37, 516 - 525. 査読有, doi: 10.1093/nar/gkn964

- ⑦ Uchida S, Yoshioka K, Kizu R, Nakagama H, Matsunaga T, Ishizaka Y, Poon RY, Yamashita K. (2009) Stress-activated mitogen-activated protein kinases c-Jun NH2-terminal kinase and p38 target Cdc25B for degradation. *Cancer Res.* 69, 6438 - 44. 査読有, doi: 10.1158/0008-5472.CAN09-0869

[学会発表] (計 14 件)

- ① 松永 司、「ヌクレオチド除去修復能の新規解析系の開発とその応用」、国立遺伝学研究所研究集会「ユビキチン・SUMOによるDNA複製およびDNA修復系の制御」、2012年2月10日、国立遺伝学研究所(静岡県)
- ② 若杉光生、「休止期のヌクレオチド除去修復に伴う二重鎖切断の生成とATMシグナリング経路の活性化」、第34回日本分子生物学会年会、2011年12月15日、パシフィコ横浜(神奈川県)
- ③ 若杉光生、「休止期細胞におけるヌクレオチド除去修復に依存した二重鎖切断の生成とATMシグナリング経路の活性化」、日本放射線影響学会第54回大会、2011年11月18日、神戸商工会議所会館(兵庫県)
- ④ 松永 司、「ヒトG0期細胞におけるヌクレオチド除去修復に伴うATRとATMの活性化」、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、2010年12月9日、神戸国際展示場(兵庫県)
- ⑤ 若杉光生、「ユビキチンE3リガーゼコンポーネントとしてのDDB1の機能解析」、第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会、2010年12月8日、神戸国際展示場(兵庫県)
- ⑥ Kawaguchi, Y. “Essential role of DDB1 as a component of DDB1-CUL4 ubiquitin E3 ligase.” 7th 3R (Replication, Recombination and Repair) Symposium. 2010. 10. 29. Toyama international conference center (Toyama)
- ⑦ 若杉光生、「紫外線照射されたG0期細胞におけるヌクレオチド除去修復に依存した二次的DNA損傷の生成」、日本放射線影響学会第53回大会、2010年10月21日、京都テルサ(京都府)
- ⑧ 松永 司、「DDB1-Cul4 E3リガーゼの機能解析」、国立遺伝学研究所研究集会、2010年10月1日、国立遺伝学研究所(静岡県)
- ⑨ 松永 司、「末梢血由来リンパ球を用いたヌクレオチド除去修復能診断系の開発」、第69回日本癌学会学術総会、2010年9月24日、大阪国際会議場(大阪府)
- ⑩ 松永 司、「DNA損傷によるChk1キナーゼ

の活性化とその制御」、平成22年度専門研究会、2010年9月11日、京都大学原子炉実験所(大阪府)

- ⑪ Wakasugi, M. “Modulation of nucleotide excision repair in human cells.” International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010. 2010. 2. 18. Matsumoto Ryojun Auditorium Bawdwin Hall (Nagasaki)
- ⑫ Matsunaga, T. “Histone H2AX phosphorylation triggered by nucleotide excision repair intermediates in quiescent cells.” Keystone Symposia “Telomere Biology and DNA Repair.” 2009. 10. 11. RACV Royal Pines Resort (Australia)
- ⑬ Matuura, K. “The role of caspase-Dependent Chk1 cleavage during apoptosis.” Keystone Symposia “Telomere Biology and DNA Repair.” 2009. 10. 11. RACV Royal Pines Resort (Australia)
- ⑭ 松永 司、「癌細胞におけるDNA損傷/複製ストレス後のChk1リン酸化の異常亢進」、第68回日本癌学会学術総会、2009年10月1日、パシフィコ横浜(神奈川県)

[産業財産権]

○出願状況(計1件)

名称: DNA 損傷修復能力の簡便・迅速な検査方法

発明者: 松永 司、西山千晶

権利者: 金沢大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-155303

出願年月日: 2010年7月7日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.p.kanazawa-u.ac.jp/~iden/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

若杉 光生 (WAKASUGI MITSUO)

金沢大学・薬学系・助教

研究者番号: 80345595

(2) 研究分担者

松永 司 (MATSUNAGA TSUKASA)

金沢大学・薬学系・教授

研究者番号: 60192340

(3) 連携研究者

該当なし