

# 修士学位論文

## DNA修復関連ユビキチンリガーゼの 標的タンパク質の探索

指導教授

廣田耕志

教授

平成 28年 2月 17日 提出

首都大学東京大学院

理工学研究科

分子物質化学専攻

学修番号 12880318

氏名 添野公雄

## DNA 修復関連ユビキチンリガーゼの標的タンパク質の探索

生物化学研究室 添野公雄

## [序論]

ユビキチンは真核生物に広く保存されたタンパク質であり、タンパク質のユビキチン化による翻訳後修飾は、タンパク質の運命を決める重要な役割を担っている。ユビキチン化には活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の3つの複合酵素によって特異的な基質にユビキチンが転移される。細胞は、DNA 損傷に応答する為の様々な経路をもつ。ユビキチン化は、以下の DNA 損傷応答経路を制御する。(i) 紫外線損傷の除去 (ヌクレオチド除去修復)<sup>1</sup>、(ii) 損傷した鋳型 DNA において複製 DNA ポリメラーゼが停止したときに、複製を再開させる機構 (損傷乗越えと鋳型スイッチ)<sup>2</sup>、(iii) 相同組換えによる2重鎖切断修復<sup>3</sup>。さらに、細胞周期の調節やチェックポイント制御など DNA 損傷応答において必須の役割を果たしている<sup>4</sup>。しかし、それら酵素群の標的タンパク質が不明であるために、DNA 修復や損傷応答における詳細な機能は不明であった。本研究では、DNA 修復や損傷応答に関わるユビキチンリガーゼ酵素 RNF8<sup>5</sup>、Rad18<sup>6</sup>、RNF168、RNF169、RNF4 の標的タンパク質の探索を行った。

## [材料と方法]

ニワトリ DT40 B リンパ細胞株 (DT40) は、レトロウィルス感染したニワトリのファブリキウス嚢より単離した、B リンパ球由来の細胞である。DT40 細胞は、ほ乳動物細胞株よりも標的組み換え効率が3桁以上高く、短期間に遺伝子破壊を確実に実施できる<sup>7</sup>。また、表現型がきわめて安定であり、遺伝学研究のツールとして優れている。また、DT40 細胞は、細胞周期の7割が DNA 複製期であり、G1 期でのチェックポイントが機能しない。故に、DNA 損傷による複製フォークの不安定化によるゲノムの破綻を最も効率的に検出できる<sup>8</sup>。

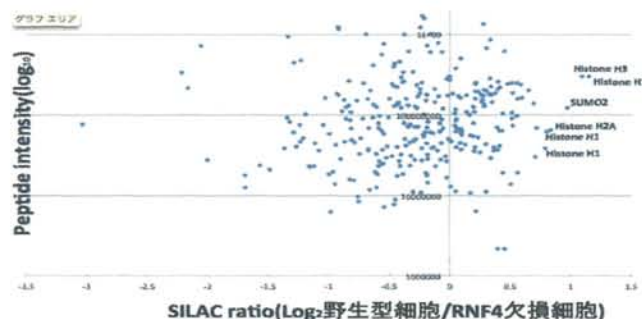
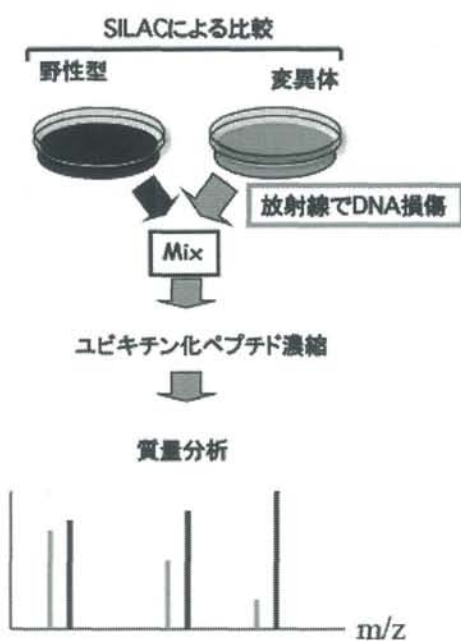
DT40 細胞に SILAC (stable isotope labeling using amino acids in cell culture) を応用する為の実験手法が確立されている。SILAC とは、質量分析の機器の能力を最大限に生かすための、質量分析前に細胞に対して実施する前処理方法である。SILAC を使うと、約5千種類のタンパク分子 (発現量やユビキチン化などの化学修飾) を、2種類の試料間で精確に”比較”できる。

これまでに、ユビキチン化酵素 RNF8、Rad18、RNF168、RNF169、RNF4 が DNA 修復や損傷応答に関わることを報告しているが、これらの標的タンパク質は同定されていないため、どのようなメカニズムで DNA 修復や損傷応答に関わっているのか不明のままであった。そこで、DT40 細胞から作製したユビキチン化酵素 RNF8、Rad18、RNF168、RNF169、RNF4 のノックアウト細胞を用いて、以下の方法で各酵素の標的タンパク質の探索を行った。

SILAC アプローチによる、ユビキチン化酵素の変異体 (*RNF8*<sup>-/-</sup>、*Rad18*<sup>-/-</sup>、*RNF168*<sup>-/-</sup>、*RNF169*<sup>-/-</sup>、*RNF4*<sup>-/-</sup>) と野生型間のタンパク質比較の方法について解説する。細胞培養を安定同位体でラベルする。(下図左; 野生型) と (下図右; 変異体) を質量数の異なるアイソトープでそれぞれラベルすることになる。両細胞をミックスして、ユビキチン化ペプチドを抗体を用いて濃縮し、質量分析を行う。ア

イソトープの質量差分、質量分析のピークの位置  $m/z$  はシフトして現れるので（下図の下）、野生型と変異体の区別が出来る。精製の前に比較する2種の細胞をミックスするので、精製過程で生じる誤差を考慮する必要がない。さらに、DT40細胞はきわめて形質が安定で同一の遺伝的バックグラウンドの野生型と変異体の比較が出来るので、SILAC研究に最適である。

#### [結果と考察]



本研究によりユビキチン化酵素 RNF8、Rad18、RNF168、RNF169、RNF4 によってユビキチン化を受ける基質を包括的に同定した。上図右に一例として、RNF4の基質としてヒストンタンパク質群を同定した結果を示した。これらのデータを基に、標的タンパク質の候補について、ウェスタンブロットなどの個別の実験を行い、ユビキチン化が変異体で低下しているのか、タンパク質の安定性に影響があるのかなど今後検討する必要がある。さらに、同定したユビキチン化部位の変異などで、ユビキチン化の生理的意義について調査する必要がある。

#### 【参考文献】

[1] Marteiijn *et al.*, 2014; van Cuijk *et al.*, 2014. [2] Lee and Myung, 2008. [3] Doil *et al.*, 2009; Fradet-Turcotte *et al.*, 2013; Kobayashi *et al.*, 2015b; Li *et al.*, 2010; Nakada *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2007. [4] Hirota *et al.*, 2014; Xie *et al.*, 2015. [5] Kobayashi *et al.*, 2015b. [6] Okada *et al.*, 2002; Yamashita *et al.*, 2002. [7] Buerstedde and Takeda, 1991. [8] Hirota *et al.*, 2010; Hirota *et al.*, 2015; Kobayashi *et al.*, 2015a; Yamamoto *et al.*, 2011.

## 目次

略語一覧.....	3
1. 序論.....	4
2. 試薬情報.....	7
3. 実験操作.....	21
●SILAC のための DT40 細胞の回収.....	22
●SILAC のための DT40 タンパク質トリプシン消化.....	22
●ローリー法.....	23
●GX41 と Affigel10 ビーズの結合.....	23
●GX41 抗体ビーズによるユビキチン化ペプチド IP.....	23
4. 実験結果.....	25
4.1 SILAC.....	25
4.1.1 GX41 と Affigel10 ビーズの結合の確認.....	25
4.1.2 【UBC13 の解析結果】 .....	25
4.1.3 【RNF8 の解析結果】 .....	26
4.1.4 【Rad18 の解析結果】 .....	26
4.1.5 【RNF168 の解析結果】 .....	27
4.1.6 【RNF169 の解析結果】 .....	27
4.1.7 【RNF4 の解析結果】 .....	28
5 結論と展望.....	51
6 参考文献.....	52
謝辞.....	66

## 略語一覽

---

APS	ammonium peroxodisulfate
BPB	bromophenol blue
BSA	bovine serum albumin
CIAP	Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal
D.W.	distilled water
DTT	dithiothreitol
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	Fetal bovine serum
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HRP	Horseradish Peroxidase
MOPS	3-Morpholinopropanesulfonic acid
MQ	milliQ
dNTP	deoxynucleotide triphosphate
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	polymerase chain reaction
PS	Penicillin/Streptomycin
pH	logarithm of hydrogen ion concentration
rpm	rotation per minute
SDS	sodium dodecyl sulfate
SILAC	stable isotope labeling using amino acids in cell culture
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine
Tris	2-amino-2-(hydroxymethyl)propane-1,3-diol

---

## 1. 序論

### 1.1 ユビキチン修飾と DNA 損傷応答

ユビキチンは真核生物に広く保存されたタンパク質であり、タンパク質のユビキチン化による翻訳後修飾は、タンパク質の運命を決める重要な役割を担っている。ユビキチン修飾にはユビキチンが標的タンパク質に1つ結合するモノユビキチン化や数珠状に連なり結合するポリユビキチン化が存在する。

ユビキチン化には活性化酵素(E1)、ユビキチン結合酵素(E2)、ユビキチンリガーゼ(E3)の3つの複合酵素によって特異的な基質にユビキチンが転移される。ポリユビキチン鎖を認識して26Sプロテアソームによって基質が分解される場合や、そのユビキチン鎖と結合するドメインを持つタンパク質がリクルートされる場合もある (Komander and Rape, 2012)。

細胞は、DNA損傷に応答する為の様々な経路をもつ。ユビキチン化は、以下のDNA損傷応答経路を制御する。(i) 紫外線損傷の除去(ヌクレオチド除去修復) (Marteijn et al., 2014; van Cuijk et al., 2014)、(ii) 損傷した鋳型DNAにおいて複製DNAポリメラーゼが停止したときに、複製を再開させる機構(損傷乗越えと鋳型スイッチ) (Lee and Myung, 2008)、(iii) 相同組換えによる2重鎖切断修復(Doil et al., 2009; Fradet-Turcotte et al., 2013; Kobayashi et al., 2015b; Li et al., 2010; Nakada et al., 2010; Zhao et al., 2007)。さらに、細胞周期の調節やチェックポイント制御などDNA損傷応答において必須の役割を果たしている(Hirota et al., 2014; Xie et al., 2015)。生物化学研究室では、これまでにユビキチン化に関わるユビキチン結合酵素(E2)やユビキチンリガーゼ(E3)の遺伝子を系統的に破壊し、様々なユビキチン化に関わる酵素のDNA修復やゲノムメンテナンスにおける機能を解明してきた。しかし、それら酵素群の標的タンパク質が不明であるために、DNA修復や損傷応答における詳細な機能は不明であった。

### 1.2 ニワトリ DT40 Bリンパ細胞株 (DT40) でのユビキチン化経路の研究の背景

ニワトリ DT40 Bリンパ細胞株 (DT40) は、レトロウイルス感染したニワト

りのファブリキウス嚢より単離した、Bリンパ球由来の細胞である。DT40細胞は、ほ乳動物細胞株よりも標的組み換え効率が3桁以上高く、短期間に遺伝子破壊を確実に実施できる(Buerstedde and Takeda, 1991)。また、表現型がきわめて安定であり、遺伝学研究のツールとして優れている。また、DT40細胞は、細胞周期の7割がDNA複製期であり、G1期でのチェックポイントが機能しない。故に、DNA損傷による複製フォークの不安定化によるゲノムの破綻を最も効率的に検出できる(Hirota et al., 2010; Hirota et al., 2015; Kobayashi et al., 2015a; Yamamoto et al., 2011)。

これまでに、ユビキチン化修飾酵素の遺伝子としてUbc13(Zhao et al., 2007), RNF8(Kobayashi et al., 2015b), Rad18(Okada et al., 2002; Yamashita et al., 2002), RNF168(未発表), RNF169(未発表), RNF4(Hirota et al., 2014)を遺伝子破壊し、それら酵素の機能をDT40細胞で系統的に調査してきた。*UBC13*<sup>-/-</sup> DT40細胞では、相同組み換えによる2重鎖切断修復も機能低下した(Zhao et al., 2007)。外国のグループによって、このUBC13と共同して働くE3ユビキチン化酵素として、RNF8とRNF168とが同定され、siRNAの実験から、これらのE3分子も2重鎖切断修復に関与することが示唆された(Kolas et al., 2007; Stewart et al., 2009)。生物化学教室では、3種のユビキチン化酵素の関係は複雑であり、UBC13はRNF8/RNF168と独立して機能することがあるし、一方、RNF8/RNF168はUBC13と独立して機能することもあることを発見した(Kobayashi et al., 2015b)。また、RNF8はRad18と共にS期でのDSB修復において、非相同末端結合を抑えることで異常融合染色体の発生を抑えていることを発見した(Kobayashi et al., 2015b; Saberi et al., 2007)。さらに、*RNF4*<sup>-/-</sup> DT40細胞では、細胞周期チェックポイントの異常や染色体異常がみられ、染色体維持に必須の役割を果たすことをこれまでに報告している(Hirota et al., 2015)。

このように、各ユビキチン化に関わる因子の果たす役割について、表現型を指標とした解析から知見が得られているが、どのようにDNA損傷応答に寄与するのか詳細な分子機構は不明のままであった。それは、それら酵素群の標的タンパク質が不明であるためである。本研究の目的は、各ユビキチン化酵素の標的タンパク質を包括的に理解し、それら標的分子との相関や分子機能の解明のための基礎的知見を得ることである。

### 1.3 SILAC

生物化学研究室では、DT40 細胞に SILAC (stable isotope labeling using amino acids in cell culture) を応用する為の実験手法を確立した。SILAC とは、質量分析の機器の能力を最大限に生かすための、質量分析前に細胞に対して実施する前処理方法である。SILAC を使うと、約 5 千種類のタンパク分子（発現量やユビキチン化などの化学修飾）を、2 種類の試料間で精確に”比較”できる。この”比較”は、DT40 細胞のような、遺伝的バックグラウンドが同一の遺伝子破壊細胞株間で実施すると、最も威力を発揮する。SILAC の原理を以下に説明する。

SILAC アプローチによる、ユビキチン化酵素の変異体と野生型間のタンパク質比較の方法。細胞培養を安定同位体でラベルする。(図 1 左;野生型)と(右;変異体)を質量数の異なるアイソトープでそれぞれラベルする。両細胞をミックスして、ユビキチン化ペプチドを単離し、質量分析を行う。アイソトープの質量差分、質量分析のピーク的位置  $m/z$  はシフトして現れるので(図 1 下)、野生型と変異体の区別が出来る。精製の前に比較する 2 種の細胞をミックスするので、精製過程で生じる誤差を考慮する必要がない。さらに、DT40 細胞はきわめて形質が安定で同一の遺伝的バックグラウンドの野生型と変異体の比較が出来るので、SILAC 研究に最適である。変異体ではユビキチン化酵素がないので、基質に対応するピークにおいて Heavy/Light の比が大きく 1 から離れることとなる。5%を有意水準とした予備実験で、1.8 倍比が変化すると、基質であると統計的に判断できる。

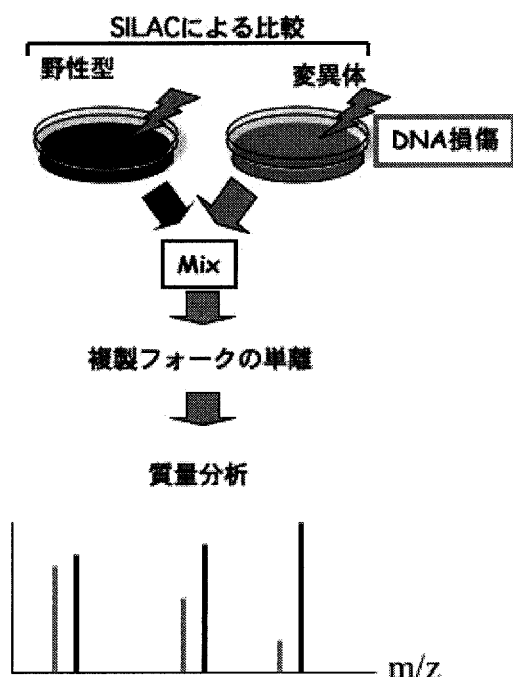


図 1



## 2. 試薬情報

### 2.1 購入試薬

---

Acetic acid (試薬特級)	和光純薬工業
Acrylamide(monomer) (電気泳動用)	和光純薬工業
Affigel-10	BIORAD
APS (電気泳動用)	和光純薬工業
Bacto Agar	和光純薬工業
Bacto Trypton	和光純薬工業
Bacto Yeast Extract	和光純薬工業
BPB (試薬特級)	和光純薬工業
BSA	ICN
Chicken Serum	Thermo
CH <sub>3</sub> COONa	和光純薬工業
CH <sub>3</sub> COONa · 3H <sub>2</sub> O	和光純薬工業
DMSO	和光純薬工業
DTT	和光純薬工業
FBS	Biosera
Glycine (試薬特級)	和光純薬工業
GX41(Anti-DIGLYCYL)	Luceruna
G418(50mg/ml)	Nacalai Tesque
HCl (試薬特級)	和光純薬工業
HEPES	SIGMA-Aldrich
Immobilon Transfer Membrane(PVDF)	MILLIPORE
Iodeasetamid	和光純薬工業
KOH	和光純薬工業
Methanol (試薬特級)	和光純薬工業
MOPS	SIGMA
L-Glutamin	Nacalai Tesque
Ligation high	TOYOBO
N,N'-methylenebisacrylamide	和光純薬工業
NaCl	和光純薬工業

NaOH	和光純薬工業
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	和光純薬工業
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O (試薬特級)	和光純薬工業
NH <sub>3</sub> HCO <sub>3</sub>	和光純薬工業
PCR 0.2ml チューブバンド セパレート 8 連	Greiner bio-one
Penicillin/Streptomycin	Nacalai Tesque
PMSF	SIGMA
RPMI1640 培地	Nacalai Tesque
RPMI1640 培地 without Lysine,Arginine	Nacalai Tesque
SDS (生化学用)	和光純薬工業
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen
Sodium Azide	関東化学
TEMED (電気泳動用)	和光純薬工業
Triton X-100	和光純薬工業
Tween 20	関東化学
2-Mercaptoethanol (生化学用)	和光純薬工業
スキムミルク粉末 (生化学用)	和光純薬工業

---

## 2.2 調整試薬

### 【SILAC 関連】

#### ● 0.5M リン酸 buffer pH8.0

試薬	使用量	最終濃度
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.53g	0.5M
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	16.7g	0.5M
NaCl	19.5g	300mM
D.W.	up to 1L	

\*pH を 8.0 に合わせる。オートクレーブで滅菌した。

#### ● 1M MOPS buffer pH 7.2

試薬	使用量	最終濃度
MOPS	209.2g	1M
D.W.	up to 1L	

\*pH を 7.2 に合わせる。オートクレーブで滅菌した。

#### ● 10x IP buffer

試薬	使用量	最終濃度
1M MOPS(pH7.2)	25ml	0.5M
NaCl	2.9g	0.5M
0.5M リン酸 buffer pH8.0	10ml	0.1M
MQ	up to 50ml	

#### ● 1M HEPES buffer pH8.5

試薬	使用量	最終濃度
HEPES	238.3g	1 M
KOH	pH8.5 に調節	
D.W.	up to 1L	

\*オートクレーブで滅菌した。

● 0.2M HEPES buffer pH8.5

試薬	使用量	最終濃度
1M HEPES	200ml	0.1 M
D.W.	up to 1L	

● 0.1M Glycin HCL pH3.0

試薬	使用量	最終濃度
Glycin	3.75g	0.1M
HCl	pH3.0 に合わせる	
MQ	up to 50ml	

● 10x PBS

試薬	使用量	最終濃度
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhydrate	115g	
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	29.6g	
NaCl	58.5g	
D.W.	up to 1L	

※オートクレーブで滅菌した。

● 1x PBS

試薬	使用量	最終濃度
10x PBS	100ml	
D.W.	up to 1L	

● PBS(0.02%Sodium azide)

試薬	使用量	最終濃度
PBS	50ml	
Sodium Azide	20mg	0.02%(w/v)
D.W.	up to 50ml	

● D-sol

試薬	使用量	最終濃度
グアニジン塩酸	66.8g	7M
1M Tris-HCl pH8.5	50ml	0.5M
EDTA	0.37g	10mM
MQ	up to 100ml	

● 3M sodium acetate, pH5.2

試薬	使用量	最終濃度
CH <sub>3</sub> COONa · 3H <sub>2</sub> O	102.1g	3M
CH <sub>3</sub> COOH	pH5.2 に調製	
D.W.	up to 250ml	

※オートクレーブで滅菌した。

● 10x 透析 buffer

試薬	使用量	最終濃度
NH <sub>3</sub> HCO <sub>3</sub>	7.9g	100mM
D.W.	up to 1L	

● 1x 透析 buffer

試薬	使用量	最終濃度
10x 透析 buffer	200ml	10mM
D.W.	up to 2L	

## 【DNA 関連】

### ● 50x TAE buffer

試薬	使用量	最終濃度
Trizma base	242g	
Acetic acid	57.1ml	
0.5M EDTA, pH8.0	100ml	
D.W.	up to 1L	

### ● 1x TAE buffer

試薬	使用量	最終濃度
50x TAE buffer	200ml	
D.W.	up to 10L	

### ● 10x TE buffer

試薬	使用量	最終濃度
1M Tris-HCl, pH7.5	50ml	0.1M
0.5M EDTA, pH7.5	10ml	0.01M
D.W.	up to 500ml	

### ● 70% ethanol

試薬	使用量	最終濃度
99.5% ethanol	70ml	70%(v/v)
D.W.	up to 100ml	

### ● agarose gel running buffer

試薬	使用量	最終濃度
1x TAE buffer	200ml	
SYBR Safe DNA gel stain	2 $\mu$ l	0.001%

● 1.0% TAE agarose gel

試薬	使用量	最終濃度
1x TAE buffer	50ml	
agarose	0.5g	1.0%(w/v)
SYBR Safe DNA gel stain	0.5 $\mu$ l	0.01%

● SDS-PAGE running buffer

試薬	使用量	最終濃度
5x SDS-PAGE running buffer	200ml	
D.W.	up to 1L	

## 【タンパク質関連】

### ● 10% SDS

試薬	使用量	最終濃度
SDS	100g	10%(w/v)
D.W.	up to 1L	

### ● 1M Tris-HCl, pH6.8 (for stacking gel)

試薬	使用量	最終濃度
Trizma base	121g	1M
HCl	pH6.8 に調製	
D.W.	up to 1000ml	

### ● 1M Tris-HCl, pH8.0

試薬	使用量	最終濃度
Trizma base	121g	
HCl	pH8.0 に調製	
D.W.	up to 1L	

\*オートクレーブで滅菌した。

### ● 1M Tris-HCl, pH8.5

試薬	使用量	最終濃度
Trizma base	121g	
HCl	pH8.0 に調製	
D.W.	up to 1L	

\*オートクレーブで滅菌した。

### ● 1.5M Tris-HCl, pH8.8 (for running gel)

試薬	使用量	最終濃度
Trizma base	181.5g	1.5M
HCl	pH8.8 に調製	
D.W.	up to 1000ml	



● 30%アクリルアミド溶液

試薬	使用量	最終濃度
Acrylamid	145g	29%(w/v)
N,N'-methylenebisacrylamide	5g	1%(w/v)
D.W.	up to 500ml	

\*0.22 $\mu$ m フィルターで滅菌した。

● 5x SDS-PAGE running buffer

試薬	使用量	最終濃度
Trizma base	75g	
Glycine	450g	
10%SDS	250ml	
D.W.	up to 5L	

● SDS-PAGE running buffer

試薬	使用量	最終濃度
5x SDS-PAGE running buffer	200ml	
D.W.	up to 1L	

● 2 x SDS gel-loading buffer

試薬	使用量	最終濃度
Trizma base		12.1g
100mM		
SDS		4g
4%(w/v)		
BPB		0.2g
0.2%(w/v)		
Glycerol		15.8ml
20%(w/v)		
D.W.	up to 100ml	

● 1x Sample buffer

試薬	使用量	最終濃度
2x Sample buffer	0.5ml	
D.W.	up to 1ml	

● 10x TBS, pH8.0

試薬	使用量	最終濃度
NaCl	87g	
1M Tris-HCl, pH8.0	200ml	
D.W.	up to 1L	

● TBS-T

試薬	使用量	最終濃度
10x TBS, pH8.0	100ml	
D.W.	up to 1L	
Tween 20	0.9ml	0.1%(w/v)

● Transfer buffer

試薬	使用量	最終濃度
1M Tris-HCl, pH8.0	40ml	25mM
Glycine	14.4g	192mM
Methanol	200ml	20%(v/v)
D.W.	up to 1L	

● 5% スキムミルク

試薬	使用量	最終濃度
スキムミルク粉末	5g	5%(w/v)
TBS	up to 100ml	

【大腸菌関連】

● LB -AMP

試薬	使用量	最終濃度
Trypton	5g	
Yeast Extract	2.5g	
NaCl	2.5g	
5M NaOHaq	200ul	
D.W.	up to 500ml	

\*オートクレーブで滅菌し、60℃程度まで冷却した後に Ampicilin 100ug/mL になるようにを加えた。

● LB -KAN

試薬	使用量	最終濃度
Trypton	5g	
Yeast Extract	2.5g	
NaCl	2.5g	
5M NaOHaq	200ul	
D.W.	up to 500ml	

\*オートクレーブで滅菌し、60℃程度まで冷却した後に kanamycin 50ug/mL になるように加えた。

● LB -AMP-plate

試薬	使用量	最終濃度
Trypton	5g	
Yeast Extract	2.5g	
NaCl	2.5g	
5M NaOHaq	200ul	
Bacto Agar	20g	
D.W.	up to 500ml	

\*オートクレーブで滅菌し、60℃程度まで冷却した後に Ampicilin 100ug/mL になるようにを加え、10cm DISH に移し、冷やし固める。

● LB KAN-plate

試薬	使用量	最終濃度
Trypton	5g	
Yeast Extract	2.5g	
NaCl	2.5g	
5M NaOHaq	200ul	
Bacto Agar	20g	
D.W.	up to 500ml	

\*オートクレーブで滅菌し、60°C程度まで冷却した後に kanamycin 50ug/mL になるようにを加え、10cm DISH に移し、冷やし固める。

● Soltion I

試薬	使用量	最終濃度
グルコース	0.45g	50mM
1M Tris-HCl pH8.0	1.25mL	25mM
0.5M EDTA pH8.0	1mL	10mM
D.W.	up to 50mL	

● Soltion II

試薬	使用量	最終濃度
NaOH	0.4g	0.2M
SDS	0.5g	1%(w/v)
D.W.	up to 50mL	

● Soltion III(5M KOAc pH4.8)

試薬	使用量	最終濃度
KOAc	29.4g	
CH <sub>3</sub> COOH	11.5ml	
D.W.	up to 100mL	

■ 培養実験関連

● ニワトリ完全培地

試薬	使用量	最終濃度
RPMI 1640	500ml	
FBS	50ml	
L-Glutamin	5ml	
PS	5ml	
Chicken serum	5ml	
2-Mercaptoethanol	500ul	

\*2-Mercaptoethanol は 0.22um フィルターでろ過した。

\*FBS は 56 度 30 分間非働化した。

● SILAC 培地

試薬	使用量	最終濃度
RPMI 1640 without Lysine, Arginine	500ml	
FBS	5ml	
FBS(dialysis)	50ml	
L-Glutamin	5ml	
PS	5ml	
Chicken serum	5ml	
2-Mercaptoethanol	500ul	
Lysine(Heavy or Light)	500ul	
Arginine(Heavy or Light)	500ul	

\*2-Mercaptoethanol は 0.22um フィルターでろ過した。

\*FBS は 56 度 30 分間非働化した。

\*FBS(dialysis)は 56 度 30 分間非働化し、2L の 1xPBS(-)、4℃の条件で 1.5 時間×4回の透析をした。

2.3 実験に用いた装置

AUTOMATIC HIGH SPEED REFRIGERATED	HITACH
CENTRIFUGE	Thermo Fisher
Nanodrop ND-1000	Scientific
LAS3000	FUJI FILM

---

TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL	BIO-RAD
Gene Pulser XCell	BIO-RAD

---

### 3 実験操作

#### 【SILAC の概要】

本研究では、ユビキチンを介したゲノムメンテナンスの複雑性を理解するため、ユビキチン化酵素 UBC13、RNF8、RAD18、RNF168、RNF169、RNF4 によってユビキチン化を受ける標的タンパク質の網羅的同定を行った。この目的のため、DT40 を用いて、野生型細胞とユビキチン化酵素欠損細胞を比較する遺伝学的手法と網羅的にタンパク質を同定できる質量分析を融合させることにより、網羅的にユビキチン修飾に差のある標的タンパク質を同定することができる SILAC を行った。野生型細胞とユビキチン化酵素欠損細胞を  $^{12}\text{C}$ (light) または  $^{13}\text{C}$ (heavy) でラベルされた培地で培養し、ユビキチン化されたペプチドを回収し、質量分析にかけた。

ユビキチン化酵素をもつ野生型細胞では正常にユビキチン化が起こるのでユビキチン化されたペプチドが多く回収される。一方、ユビキチン化酵素欠損細胞では正常にユビキチン化ができないので、ユビキチン化されたペプチドは少なくなる。そのため、野生型細胞とユビキチン化酵素欠損細胞のユビキチン化されたペプチド量を比べると野生型細胞が多くなる。

それらを考慮して質量分析の結果をみると、下の図のように同位体でラベルされているため、野生型細胞とユビキチン化酵素欠損細胞のユビキチン化ペプチドのピークが一定分子量分離したペアとして検出される。また、野生型細胞と *RNF4* 細胞で回収したユビキチン化ペプチド量はピークの高さとして表れるため、野生型細胞のピークが高く、変異体ではピークが低くなる。(図 2)

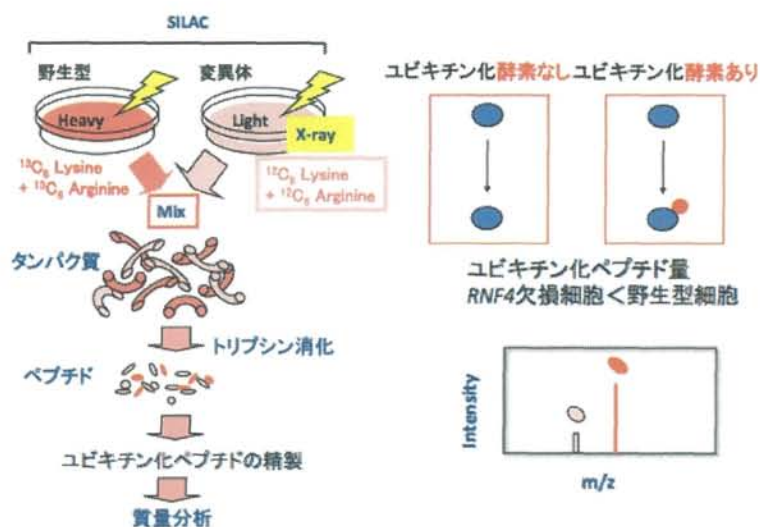


図 2 SILAC によるユビキチン化酵素同定

### 【SILAC 関連実験】

#### ● SILAC のための DT40 細胞の回収

野生型細胞、ユビキチン化酵素変異細胞 (*UBC13*<sup>-/-</sup>, *RNF8*<sup>-/-</sup>, *RAD18*<sup>-/-</sup>, *RNF168*<sup>-/-</sup>, *RNF169*<sup>-/-</sup>, *RNF4*<sup>-/-</sup>) をニワトリ完全培地 10ml で 39.5°C、CO<sub>2</sub> 濃度 5% で培養した。1200rpm、室温、5 分で遠心分離し、上清を除去し、Heavy ラベルまたは Light ラベルされた SILAC 培地を野生型細胞または *RNF4* 欠損細胞に 10ml 加え、培養した。150cm<sup>2</sup>FLASK で SILAC 培地 100ml 培養した。一例として、野生型と *RNF4* 欠損の細胞数使用量を以下に記載する。

	細胞数/mL	使用した液量 (mL)
野生型細胞(Light label)	7.4x10 <sup>5</sup>	70mL
<i>RNF4</i> 欠損細胞(Heavy label)	5.0x10 <sup>5</sup>	100mL
野生型細胞(Heavy label)	6.8x10 <sup>5</sup>	100mL
<i>RNF4</i> 欠損細胞(Light label)	7.2x10 <sup>5</sup>	100mL

それらを 75cm<sup>2</sup>FLASK に移し、ガンマセルで 10Gy (1 分間)、照射した。1200rpm、4°C、5 分で遠心分離し、上清を除去し、10mL 1xPBS で Heavy ラベルされた野生型と Light ラベルされた変異細胞を懸濁し、混ぜた。また、Light ラベルされた野生型と Heavy ラベルされた変異細胞も同様の操作を行った。懸濁液を 15mL チューブに移し、1200rpm、4°C、5 分で遠心分離し、上清を除去し、液体窒素につけ、保存した。

#### ●SILAC のための DT40 タンパク質トリプシン消化

回収した DT40 細胞を 5mL の D-sol で溶解し、ソニケーションでゲノムを剪断した。1 分間、窒素置換を行い、10mg DTT (in 100ul D-sol) を混ぜ、90 分間室温で静置した。25mg ヨードアセトアミド (in 100ul D-sol) を添加し、遮光して 90 分間室温で静置した。10mM H<sub>3</sub>HCO<sub>3</sub>buffer にサンプルを透析用セルローズチューブで 4 回透析 (3 時間、3 時間、O/N、3 時間) を行った。ローリー法によりタンパク質濃度を測定し、シェイカーを用いて、37°C、O/N でタンパク質量の 1% 質量のトリプシン消化を行った。



### ●ローリー法

25ulBSA(2mg/ml)を 1.5mL チューブに移した。それらを MQ で段階希釈し、2mg/ml、1mg/ml、0.5mg/ml、0.25mg/ml、0.125mg/ml を用意した。Bio-Rad DC protein assay 付属の 1●SILAC のための DT40 タンパク質トリプシン消化 00ul A-Solution を加え、800uL B-Solution を加え、15分間静置し、750nm で OD を測定し、検量線を引いた。そして、サンプル濃度を測定した。

### ●GX41 と Affigel10 ビーズの結合

氷上で 1mg GX41 を 500uL の 0.2M HEPES pH8.5 を加えた。チップの先を切り、ビーズ 250uL を 1.5mL チューブにとった。3krpm、4℃、5分間の遠心分離を行い、上清を除去し、1mM HCl でビーズを 2 回洗った。3krpm、4℃、5分間の遠心分離を行い、上清を除去し、250uL の抗体と 200ul の 0.2M HEPES pH8.5 を加え、4℃ O/N でローテーションを行った。3krpm、4℃、5分間の遠心分離を行い、上清を除去し、1mL の 1M Tris-HCl pH8.0 を加え、3krpm、4℃、5分間の遠心分離を行い、上清を除去した。1mL の 1M Tris-HCl pH8.0 を加え、4℃ O/N でローテーションを行った。3krpm、4℃、5分間の遠心分離を行い、上清を保存し、沈殿したビーズを 1mL の 0.1 Glycin-HCl pH3.0 で 3 回洗った。0.5mL の PBS(0.02% Sodium Azide)を加えた。

SDS-PAGE に保存した上清と元の抗体を電気泳動し、抗体とビーズの結合率を求めた。

### ●GX41 抗体ビーズによるユビキチン化ペプチド IP

トリプシン消化を行ったペプチド溶液に 2M PMSF(in DMSO)を 4mM になるように加え、4krpm、4℃、10分間の遠心分離を行い、15ml チューブに上清を移し、250uL の GX41 抗体ビーズを加え、4℃、O/N でローテーションを行った。3krpm、4℃、5分間の遠心分離を行い、上清を保存した。また、沈殿したビーズを 1mL の 1xIP buffer で 1.5mL チューブへ回収した。5krpm、4℃、2分間の遠心分離を行い、上清を除いた。2回、1mL の 1xIP buffer で 5krpm、4℃、2分間遠心分離を行った。上清を除き、3回 1mL の MQ で同様の条件下で遠心分離を行い、上清を除いた。0.1mL の 0.1%TFA を加え、ペプチドを溶出し、5krpm、4℃、5分間の遠心分離を行い、上清を回収した。沈殿したビーズへ 1xIP buffer を加え、保存した上清に加え、4℃ 30分間のローテーショ

ンを行った。その後、ペプチド回収までの過程を上記の操作を行い、300ul のペプチド溶液を回収し、質量分析にかけた。

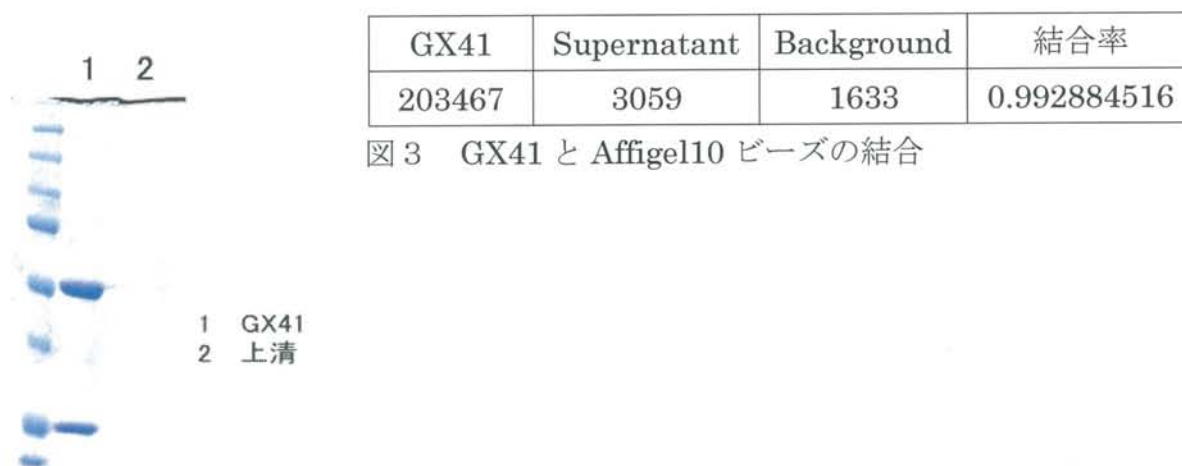
## 4.実験結果

### 4.1【SILAC】

#### 4.1.1【GX41 と Affigel10 ビーズの結合の確認】

GX41(Anti-DIGLYCYL)とビーズが結合しているか確認するため、SDS-PAGEを行い、25kDa 付近を Multi Gauge で測定した。その結果、GX41 と Affigel10 ビーズは約 99%結合していることが確認された。(図3)

Lane 1 は GX41(2mg/ml)、Lane2 は GX41 とビーズを結合させ、遠心分離を行い回収した上清。仮に GX41 とビーズが完全に結合されなかった場合、上清の濃度は 1mg/ml になる。



#### 4.1.2【UBC13 の解析結果】

質量分析にかけた結果、野生型細胞 (Heavy) と *UBC13* 欠損細胞(Light)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 619 個検出された。一方、野生型細胞 (Light) と RNF4(Heavy)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 815 個検出された。共通するユビキチン化ペプチドは 381 個だった。(図4)

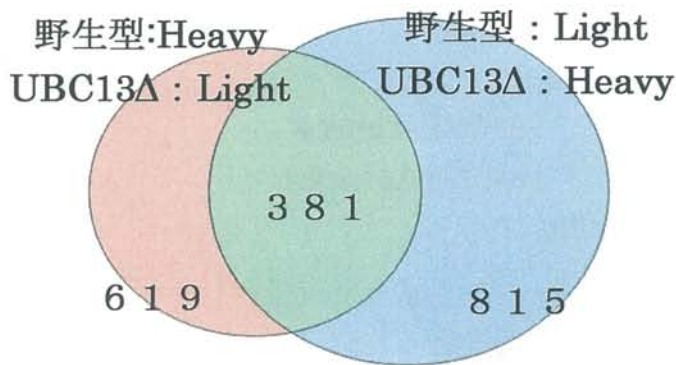


図4 SILAC で検出された野生型 vs *UBC13Δ*のユビキチン化ペプチド数

#### 4.1.3 【RNF8 の解析結果】

質量分析にかけた結果、野生型細胞 (Heavy) と *RNF8* 欠損細胞(Light)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 575 個検出された。一方、野生型細胞 (Light) と *RNF4*(Heavy)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 591 個検出された。共通するユビキチン化ペプチドは 287 個だった。(図 5)

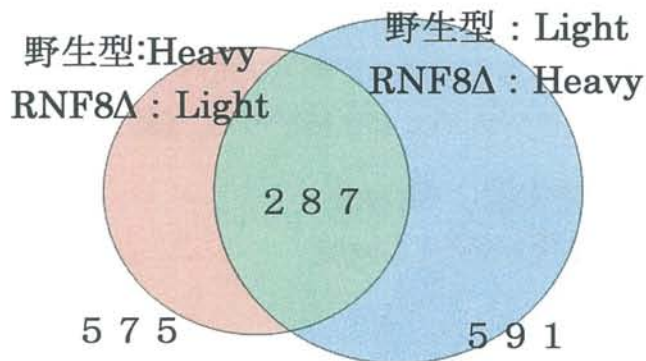


図5 SILAC で検出された野生型 vs *RNF8Δ*のユビキチン化ペプチド数

#### 4.1.4 【Rad18 の解析結果】

質量分析にかけた結果、野生型細胞 (Heavy) と *Rad18* 欠損細胞(Light)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 867 個検出された。一方、野生型細胞 (Light) と *RNF4*(Heavy)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 731 個検出された。共通するユビキチン化ペプチドは 411 個だった。(図 6)

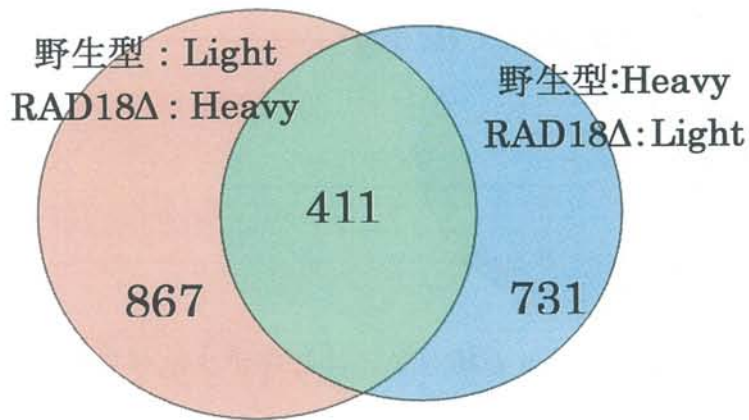


図 6 SILAC で検出された野生型 vs *Rad18Δ*のユビキチン化ペプチド数

#### 4.1.5 【RNF168 の解析結果】

質量分析にかけた結果、野生型細胞 (Heavy) と *RNF168* 欠損細胞(Light)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 826 個検出された。一方、野生型細胞 (Light) と *RNF4*(Heavy)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 967 個検出された。共通するユビキチン化ペプチドは 473 個だった。(図 7)

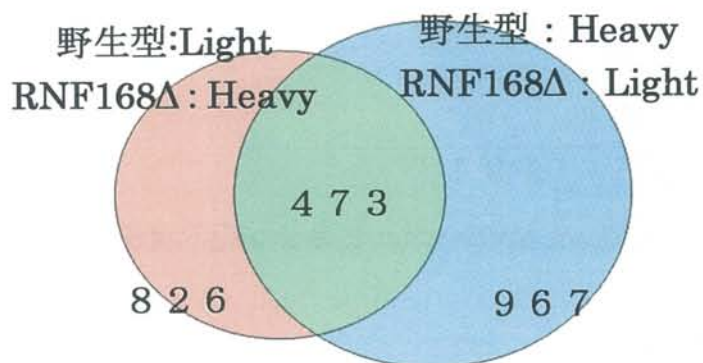


図 7 SILAC で検出された野生型 vs *RNF168Δ*のユビキチン化ペプチド数

#### 4.1.6 【RNF169 の解析結果】

質量分析にかけた結果、野生型細胞 (Heavy) と *UBC13* 欠損細胞(Light)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 592 個検出された。一方、野生型細胞

(Light)と RNF4(Heavy)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 1030 個検出された。共通するユビキチン化ペプチドは 320 個だった。(図 8)

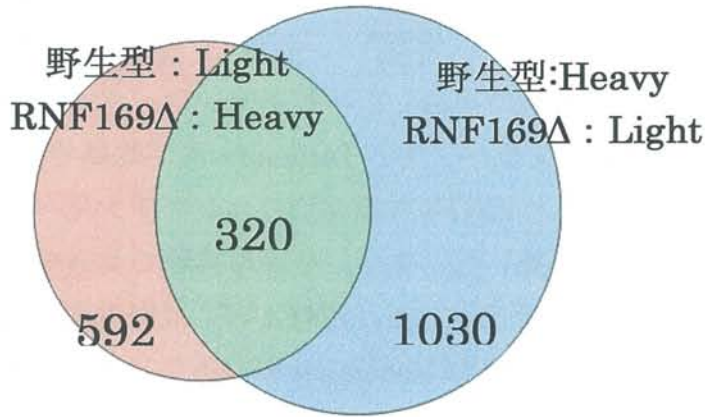


図 8 SILAC で検出された野生型 vs *RNF169Δ*のユビキチン化ペプチド数

#### 4.1.7 【RNF4 の解析結果】

質量分析にかけた結果、野生型細胞 (Heavy) と *RNF4* 欠損細胞(Light)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 570 個検出された。一方、野生型細胞 (Light) と RNF4(Heavy)を混ぜたものではユビキチン化ペプチドは 957 個検出された。共通するユビキチン化ペプチドは 283 個だった。(図 9)

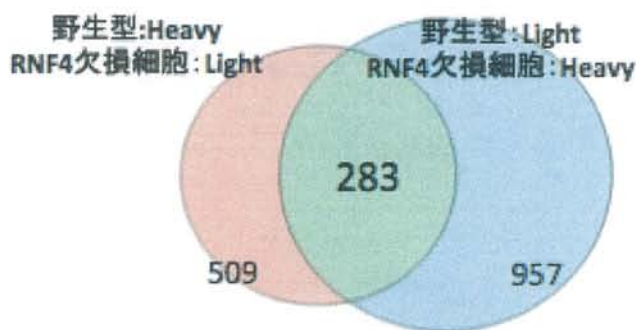


図 9 SILAC で検出されたユビキチン化ペプチド数

KPAGPSVTEIITK(gl) AVSASK	1.1435	Histone H1	Histone H1.01	Histone H1.03	Histone H1.10	Histone H1.11L	Histone H1.11R
SAPATGGV K(g)KPHR	1.0840	Histone H3.2-like					
ATIAGGGVIPH IHK(g)SIIGK	0.8281	Histone H2A.Z(H2AFZ)			Histone H2A.Z(H2AFV)		
SIVSK(gl) GTIVQTK	0.7894	Histone H1	Histone H1.01	Histone H1.03	Histone H1.10	Histone H1.11L	Histone H1.11R
IGIK(g)SIVSK	0.7834	Histone H1	Histone H1.01	Histone H1.03	Histone H1.10	Histone H1.11L	Histone H1.11R

同位体ラベルをスイッチした2つの実験で共通したユビキチン化ペプチドをグラフにプロットした。縦軸はユビキチン化ペプチド Intensity の平均値であり、横軸は2つの実験における野生型細胞と *RNF4* 欠損細胞のユビキチン化ペプチドの比(Normalized)を平均し、対数で表した。また、2回の実験で共通するユビキチン化ペプチド 283 個のデータを全て示した。*RNF4*/WT は野生型細胞と *RNF4* 欠損細胞のユビキチン化ペプチドの比(Normalized)であり、2回の実験の平均値である。

SILAC ratio 値が高いものが *RNF4* 欠損細胞でユビキチン修飾の低下がみられたタンパク質である。従って、*RNF4* の標的タンパク質の候補として Histone H1、Histone H2A、Histone H3 が同定された。さらに、既知である SUMO2 のユビキチン修飾の低下も同様にみられた。また、Blast を用いて質量分析で検出された Ub 化ペプチドを含むヒストンを特定した。(図 10)

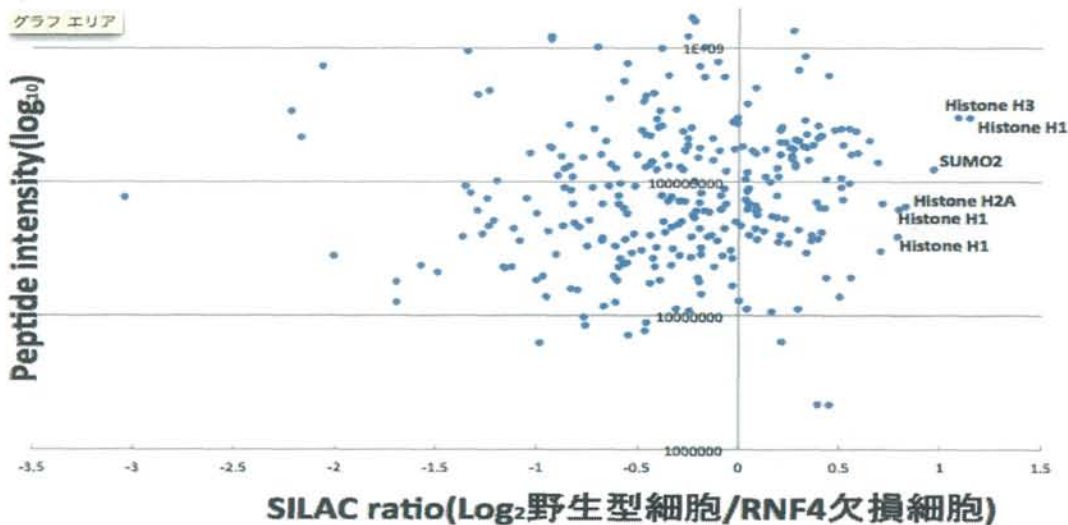


図 10 *RNF4* 欠損細胞においてユビキチン化が低下しているタンパク質

【283 個のユビキチン化ペプチド】

WT/ΔRNF4	gene	protein	sequence
1.143580995		Histone H1.11L	KPAGPSVTEIITK(g)AVSASK
1.084056371	LOC417953	Histone H3	SAPATGGVK(g)KPHR
0.963312933	SUMO2	Small ubiquitin-related modifier 2	HTPISK(g)IMK
0.828125221	H2AFV	Histone H2A.V	ATIAGGGVIPHIHK(g)SIIGK
0.789475571		Histone H1.11L	SIVSK(g)GTIVQTK
0.783400477		Histone H1.11L	IGIK(g)SIVSK
0.768496904	HIST2H2AC	Histone H2A	VTIAQGGVIPNIQAVIIPKK(g)TD SHK
0.707931575	RPL36	60S ribosomal protein L36	AIK(g)FIK
0.683193282	LOC417953	Histone H3	VTIMPK(g)DIQIAR
0.648179109	RPS16	Uncharacterized protein	TIQYK(g)IIEPVIIIIGK(g)ER
0.586793093	H2B-VII	Histone H2B	IIIPGEIAK(g)HAVSEGTK
0.580752648	TRIP12	Uncharacterized protein	GSQAIK(g)FFNTHQIK
0.558345394	RPS25	Uncharacterized protein	GIIK(g)IVSK
0.557193991	RPL15	Ribosomal protein L15 R	GIGK(g)GHK(g)FHHTIGGSR
0.550518577	POLH	Uncharacterized protein	TIDFFFK(g)R
0.548796524	LOC417953	Histone H3	YQK(g)STEIIIR
0.517929297	RPL10	60S ribosomal protein L10	YMVK(g)SCGK



	gene	protein	sequence
0.515581879	USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	YVDKIEK(gl)IFQSAPSDP TQDFSTQVAK
0.509091349	RPL15	Ribosomal protein L15 R	IGYK(gl)AK(gl)QGYVIYR
0.509071159	RPS16	Uncharacterized protein	VK(gl)GGGHVAQIYAIR
0.50576611	H2B-VII	Histone H2B	SRK(gl)ESYSIYVYK
0.502275293	FBXO38	Uncharacterized protein	NCAGPTNSIK(gl)YVPIVTGIASA R
0.501793128	H2B-VII	Histone H2B	HAVSEGTKAVTK(gl)YTSSK
0.471180045	RPS13	40S ribosomal protein S13	K(gl)GITPSQIGVIIR
0.442490236	H2AFV	Histone H2A.V	SIIGK(gl)K(gl)GQQK
0.435977094	RPL26	60S ribosomal protein L26	ANGTTVHVGIHPK(gl)VVITR
0.432246517	H2B-VII	Histone H2B	PEPAK(gl)SAPAPK
0.426978519	ERH	Enhancer of rudimentary homolog	(ac)SHTIIIVQPTK(gl)RPEGR
0.411865425	H4	Histone H4	GVIK(gl)VFIENVIR
0.409898048	RPL13	60S ribosomal protein L13	IAGINK(gl)R
0.404587632	DNAJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6	IIK(gl)PHKPASSPR
0.394973147	RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	HYCGK(gl)CCITYCFNKPEDK
0.394623848	RPL10	60S ribosomal	INK(gl)M(ox)ISCAGADR

		protein L10	
	gene	protein	sequence
0.394579482	RPL27A	Uncharacterized protein	YHPGYFGK(gl)VGMR
0.389683886	RPL37	50S ribosomal protein L37e	STCGK(gl)CGYPAKR
0.386762568	MRPL20	Uncharacterized protein	TFK(gl)SIAAIAQR
0.366068248	TK1	Thymidine kinase, cytosolic	IGAEREVEVIGGADK(gl)YHSVC R
0.360771868	RPL27A	Uncharacterized protein	SGYYK(gl)VIGK
0.358613993	RPS14	Uncharacterized protein	EIGITAIHIK(gl)IR
0.345487353	SLC6A9	Transporter	IFNATQK(gl)R
0.338610054	RPL7	60S ribosomal protein L7	K(gl)IIYER
0.337979505	RPL35	60S ribosomal protein L35	VITVINQTQK(gl)ENIR
0.336371153	RPL7	60S ribosomal protein L7	K(gl)VIQIIR
0.333188506	RPL15	Ribosomal protein L15 R	FFEVIIDPFHK(gl)AIRR
0.331351337	MYC	myc proto-oncogene protein	VVSEK(gl)IATYQASRR
0.328776685	RPL3	Uncharacterized protein	K(gl)IYKIGQGYQIK
0.318569603	CMIP	Uncharacterized protein	TFISK(gl)IITSK
0.298393856	LOC41795 3	Histone H3	K(gl)IPFQR

0.296005649	CNPPD1	Protein CNPPD1	K(gl)YVSHVSR
	gene	protein	sequence
0.295735673	RPL24	Uncharacterized protein	AITGASIAEIMAK(gl)R
0.293694281	RPL10A	Ribosomal protein	K(gl)VICIAVAVGHVK
0.2760252	RPL4	Uncharacterized protein	VMIK(gl)INPYAK
0.275879733	RPL13	60S ribosomal protein L13	GFSIEEIK(gl)IAGINKR
0.275283821	RPL27	60S ribosomal protein L27	SFVK(gl)VYNYNHIMPTR
0.274930455	LOC41795 3	Histone H3	K(gl)QIATK(gl)AAR
0.270202928	CUL5	Uncharacterized protein	TQEAIQIMK(gl)MR
0.264293459	C16orf5	Uncharacterized protein	AYIYTYK(gl)R
0.25899308	RPL14	Uncharacterized protein	RQAMPFK(gl)CMQITDFVIK
0.252676519	DPAGT1	Uncharacterized protein	INPTTGKIEMSYSK(gl)FK
0.245968233	RPL23	Uncharacterized protein	K(gl)VHPAVVIR
0.232615471	RPL30	60S ribosomal protein L30	TGVHHYSGNIEIGTACGK(gl)Y YR
0.227055959	RPS25	Uncharacterized protein	EVPNYK(gl)IITPAVVSR
0.213670659	RPS17	40S ribosomal protein S17	VIIK(gl)YYTR
0.208856645	HNRNPU	Uncharacterized protein	HAAANPGK(gl)YNIIGTNTIMDK
0.208798697	RPL7	60S ribosomal	QIFNGTFVK(gl)INK

		protein L7	
	gene	protein	sequence
0.207185303	RPL9	Uncharacterized protein	TVIVK(gl)GPR
0.202155378	BCORL1	Uncharacterized protein	RIIVNK(gl)NAGETIIQR
0.201022895	RPL19	Ribosomal protein L19	KIIK(gl)DGIIR
0.189577816	RPS13	40S ribosomal protein S13	FVTGNK(gl)IIR
0.188640011	DYNC2H1	Uncharacterized protein	TRIDEWTK(gl)SAGIEK
0.187845994	PES1	Uncharacterized protein	FIIHEPIVNK(gl)FR
0.165305372	RPL30	60S ribosomal protein L30	YVIGYK(gl)QTIK
0.165251133	PPP1R7	Uncharacterized protein	K(gl)IFIVNNK
0.156813409	ST7	Suppressor of tumorigenicity 7 protein homolog	SATICYTAAIIK(gl)AR
0.134690796	RPL10	60S ribosomal protein L10	ICANK(gl)YMVK
0.134367342	RPL4	Uncharacterized protein	KNPIK(gl)NIR
0.124324738	RPS23	Uncharacterized protein	ANPFGGASHAK(gl)GIVIEK
0.095010656	KLHL24	Uncharacterized protein	FADTHSIK(gl)TIFTK
0.090593279	SSRP1	FACT complex subunit SSRP1	VAIGHGIK(gl)IITK
0.089751609	FANCI	Uncharacterized	DSIIIVIQK(gl)AIFSR

		protein	
	gene	protein	sequence
0.086320869	TK1	Thymidine kinase, cytosolic	K(gl)AFGSIINIVPIAESVVK
0.084985463	DDI2	Uncharacterized protein	WAGIAK(gl)GVGTQK
0.082369401	CSTF2	Uncharacterized protein	IVDPEIAIK(gl)IIHR
0.080033011	RPS15A	Uncharacterized protein	INK(gl)CGVISPR
0.079621371	BIRC6	Uncharacterized protein	GSSYK(gl)IIVEQAK
0.069935525	PPP1CB	Serine/threonine -protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	AK(gl)YQYGGINSRPTPPR
0.052388807	LOC39593 3	Uncharacterized protein	IFAPNHVVAK(gl)SR
0.052022125	CHTOP	Uncharacterized protein	IGK(gl)SNIQAR
0.047296538	RPS23	Uncharacterized protein	AHIGTAIK(gl)ANPFGGASHAK
0.046052078	RPL26	60S ribosomal protein L26	GQQIGK(gl)VVQVYR
0.045263585	RPL24	Uncharacterized protein	TDGK(gl)VFQFINAK
0.041598938	NDUFA4	Uncharacterized protein	IAPNDQYK(gl)FYSVNVDYSK
0.040743506	RPS15	40S ribosomal protein S15	EAPPMEKPEVVK(gl)THIR

0.040092131	RPS17	40S ribosomal protein S17	NK(g)IAGYVTHIMK
	gene	protein	sequence
0.038009792	RPL4	Uncharacterized protein	NIPGITIIDVNK(g)INIIR
0.034763751	RPL15	Ribosomal protein L15 R	GATYGKPVHHGVNQIK(g)FAR
0.01694999	FAM208B	uncharacterized	DYINFTVTTK(g)RPGR
0.010558413	SETX	Uncharacterized protein	K(g)IFQSTIK
0.005414553	NCAPG	Uncharacterized protein	HIIVIIK(g)
0.001832578	TNPO1	Uncharacterized protein	SISGIIKNNVK(g)
-0.003119342	RACGAP1	Uncharacterized protein	IHDFVSK(g)TVIKPESCVPCGK
-0.008349073	RPL30	60S ribosomal protein L30	SGK(g)YVIGYK(g)QTIK
-0.014028114	POP5	Uncharacterized protein	TCQK(g)FIIQYNR
-0.024341263	YWHAG	14-3-3 protein gamma	NIISVAYK(g)NVVGAR
-0.029231354	CTNNB1	Uncharacterized protein	VIK(g)VISVCSSNKPAIVEAGG MQAIGIHITDPSQR
-0.034372014	OC426240	Uncharacterized protein	GIIYGPPGTGK(g)TIIAR
-0.038797361	RPL4	Uncharacterized protein	SQEIQK(g)AIRAPK
-0.06094515	LSS	Uncharacterized protein	FTQIPENPPDYQK(g)YYR
-0.061289294	ASNS	Asparagine synthetase	GIINIK(g)HSTSIFPK

-0.068738959	RPL21	Uncharacterized protein	K(g)HGVPVIATYMR
	gene	protein	sequence
-0.070712575	PSMC2	Uncharacterized protein	THIFK(g)IHAR
-0.074552516	RPS10	Uncharacterized protein	SAVPPGADK(g)K(g)AEAGAGA ATEFQFR
-0.083087586	SGTA	Uncharacterized protein	AAAYSK(g)IGNYAGAVR
-0.085784178	ATP1B3	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta-3	TFGYSK(g)GTPCVIVK
-0.086870176	LOC395933	Uncharacterized protein	VEQIAASK(g)CR
-0.087107288	RPS8	40S ribosomal protein S8	IASIIIEQFQQGK(g)IIACIASRP GQCGR
-0.099985517	RPL24	Uncharacterized protein	VEICSFSGYK(g)IYPGHGRR
-0.101039713	YWHAE	14-3-3 protein epsilon	NIISVAYK(g)NVIGAR
-0.107846821	PSMC3	Uncharacterized protein	ACAAQTK(g)ATFIK
-0.122118786	PSMC1	26S protease regulatory subunit 4	VVGSEIIQK(g)YIGDGPK
-0.122580024	RPL23	Uncharacterized protein	K(g)KVHPAVVIR
-0.128931739	MTCH2	Uncharacterized protein	AGIFK(g)GIAPR
-0.12982376	H4	Histone H4	DAVTYTEHAK(g)RK
	GPI	Glucose-6-phosp	IIPHK(g)VFEGNRPTNSIMFTK

-0.143705025		hate isomerase	
--------------	--	----------------	--

	gene	protein	sequence
-0.167314569	MTCH2	Uncharacterized protein	ICSSAIGTVVHGK(gl)VIQR
-0.167722312	CDCA7L	Uncharacterized protein	NARPPEK(gl)FAIEK
-0.168645288	TBC1D15	Uncharacterized protein	IFIK(gl)CIENHVIR
-0.184685848	CCT5	Thymidine kinase, cytosolic	IMGIEAIK(gl)SHIMAAK
-0.18758136	TK1	Integral membrane protein 2B	CIIVK(gl)YAK
-0.187622523	ITM2B	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	VKVSFNIAIAQK(gl)EAAK
-0.188610419	IMPDH	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	HGFCGIPITDNGK(gl)M(ox)GGK
-0.189933685	USP5	Uncharacterized protein	FASFPDYIVIQIK(gl)K
-0.190255037	RPL35A	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	NNTVTPGGK(gl)PNR
-0.195312132	USP5	Uncharacterized protein	SVAIK(gl)TTR
-0.195346406	TKT	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	K(gl)AYGIAIAK
-0.197844826	USP5	uncharacterized	MFK(gl)AIIGK



-0.199047529	PXMP4	Uncharacterized protein	AAIAVIK(gl)GFR
	gene	protein	sequence
-0.199428833	PABPC1	T-complex protein 1 subunit eta	TVPQYK(gl)YAAGVR
-0.209918361	CCT7	60S ribosomal protein L30	K(gl)TFSYAGFEMQPK
-0.215205344	RPL30	Uncharacterized protein	AK(gl)IVIIANNCPAIR
-0.215900453	RPS10	Uncharacterized protein	MIMPK(gl)K
-0.217686901	LOC395933	Uncharacterized protein	RPAVK(gl)QFHDSK
-0.218754923	ATXN3	Ataxin-3	VQQVQRPK(gl)IIGEETAQSR
-0.225277783	IMPDH	Inosine-5'-monophosphate dehydrogenase	GSIHK(gl)FIPYIIAGIQHSCQDIG AK
-0.234850594	HSPA8	Heat shock cognate 71 kDa protein	IQK(gl)IIQDFFNKEINK
-0.237511418	TOMM7	Uncharacterized protein	IQQIFK(gl)GGQFAIR
-0.238384631	PPAT	Amidophosphoribosyltransferase	K(gl)FGVISDNFK
-0.238883671	PABPC1	Uncharacterized protein	AIDTMNFDVIK(gl)GKPVR
-0.24488737	NAPRT1	Uncharacterized protein	IIAGPQMK(gl)IMEIGIR
-0.249674891	SCCPDH	Uncharacterized protein	IITK(gl)YPEFFSAGR

	gene	protein	sequence
-0.252396268	APLP2	Uncharacterized protein	HISK(g)MQNHGYENPTYK
-0.254353706	ATP6V0A 1	V-type proton ATPase 116 kDa subunit a isoform 1	K(g)HIGTHNFGGIR
-0.265562121	RPL10	60S ribosomal protein L10	IIPDGCGVK(g)YVPGRGPIDR
-0.265744023	HNRNPH1	uncharacterized protein	FFSDCK(g)IINGAIGIR
-0.277626515	VCP	Uncharacterized protein	VAIK(g)ANIR
-0.278018479	USP5	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	VCASEKPPK(g)DIGYIFYQR
-0.287828565	PSMC2	Uncharacterized protein	VIGSEIVQK(g)YVGEGAR
-0.288471172	PSMA3	Proteasome subunit alpha type	IVISK(g)IYEEGSNKR
-0.291901028	LSG1	Large subunit GTPase 1 homolog	NEIIEIFK(g)TIHSGPR
-0.294008519	AUP1	Uncharacterized protein	ITAADK(g)AEHMKR
-0.295117834	UBFD1	Uncharacterized protein	IHSITGIPPAMQK(g)VMFK
-0.298547342	UFD1L	Uncharacterized protein	RGIPNYDFK(g)IGR

-0.306883897	CLIC2	Uncharacterized protein	IHIK(g)IAAK
	gene	protein	sequence
-0.3085347	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAAQNIIPASTGAAK(g)AVGK
-0.324930511	ASNS	Asparagine synthetase	NGIEK(g)YIIR
-0.329957253	PSMB4	Proteasome subunit beta type	CMK(g)IYYR
-0.334297632	PPP1CB	Serine/threonine-phosphatase PP1-beta catalytic subunit	GCRPGK(g)IVQMTEAEVR
-0.335706859	CCT8	T-complex protein 1 subunit theta	AVDDGVNTFK(g)VITR
-0.347260427	MYC	myc proto-oncogene protein	HK(g)IEQIR
-0.350558888	GGA.4755 2	Uncharacterized protein	FAGK(g)QIEDGR
-0.351168271	POLR2E	uncharacterized protein	GQVVK(g)IIRPSETAGR
-0.362881594	RPL11	Uncharacterized protein	VIEQITGQTPVFSK(g)AR
-0.364953767	RPL10A	Ribosomal protein	AGK(g)FPSIITHNENIVAK
-0.369377131	OGT	Uncharacterized protein	IAYMPNTFFIGDHANMFPHIK(g) KK
-0.380532929	RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein	IIFAGK(g)QIEDGRTISDYNIQK

		S27a	
-0.380701976	ENO1	Alpha-enolase	(ac)SIIK(gl)IHAR
	gene	protein	sequence
-0.38455682	TPI1	Triosephosphate isomerase	IGVAAQNCYK(gl)VPK
-0.385256293	YARS	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic	NFITK(gl)IGSISCK
-0.386342137	IDH3A	Uncharacterized protein	SHVTAVHK(gl)ANIMR
-0.388242889	HK1	Uncharacterized protein	TVCGAVSK(gl)R
-0.394896952	RPS3	Uncharacterized protein	GCEVVVSGK(gl)IR
-0.406091784	VDAC2	Uncharacterized protein	DIFNK(gl)GYGFGIVK
-0.4079399	PKM	Pyruvate kinase muscle isozyme	HIK(gl)IISK
-0.409192749	ADRM1	Proteasomal ubiquitin receptor ADRM1	MSIK(gl)GSTVTPDKR
-0.418579228	SEC23A	Protein transport protein Sec23A	GAVQFVTQYQHSSTQK(gl)R
-0.420640003	NOP58	Uncharacterized protein	IITDNITYCK(gl)CVR
-0.422366312	RPS27A	Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	TISDYNIQK(gl)ESTIHIVIR
-0.422366312	GGA.4755 2	Uncharacterized protein	TISDYNIQK(gl)ESTIHIVIR
-0.426990329	UBE2J2	Uncharacterized protein	GPETTPYEGGYHKG(gl)IIFPR

-0.432908115	CTNNB1	Uncharacterized protein	NK(gl)M(ox)MVCQVGGIEAIVR
	gene	protein	sequence
-0.435390278	CUL1	Uncharacterized protein	FINNNAVTK(gl)MAQSSSK
-0.44120305	SMARCC1	Uncharacterized protein	AK(gl)HIAAVEER
-0.442417638	RPS3	Uncharacterized protein	IREITAVVQK(gl)R
-0.443153647	TNFAIP1	BTB/POZ domain-containing adapter for CUL3-mediated RhoA degradation protein 2	TCSFK(gl)VGSIGNK
-0.454238399	DCAF13	DDB1- and CUL4-associated factor 13	VFAK(gl)PFISSIDGHR
-0.46040938	IMPDH	Inosine-5'-mono phosphate dehydrogenase	YRGMGSIDAMDK(gl)NIGSQNR
-0.463522972	LOC42968 2	Uncharacterized protein	K(gl)AFISTITAQSITR
-0.467663211	SREBF2	Uncharacterized protein	K(gl)IAHGFRPAYR
-0.46821067	RPS3	Uncharacterized protein	TQNVIGEK(gl)GRR
-0.482192206	EIF4A2	Eukaryotic initiation factor 4A- II	AIIPCik(gl)GYDVIAQAQSGTGK
-0.482287722	PES1	Uncharacterized protein	ICIik(gl)GIYPHEPR

-0.505915871	RAN	GTP-binding nuclear protein Ran	AK(g)SIVFHR
	gene	protein	sequence
-0.515184285	METAP1	Methionine aminopeptidase 1	YREIGNIIQK(g)HAQANGFSVV R
-0.523930536	HMGCR	Uncharacterized protein	HIPAYK(g)IETIMETQER
-0.532223281	DIP2B	Uncharacterized protein	VSTK(g)IQQIINTIK
-0.55193848	AURKA	Uncharacterized protein	GK(g)FGNVYIAR
-0.555986348	ILK	Uncharacterized protein	ISMADVK(g)FSFQCPGR
-0.556073977	RHOT1	Mitochondrial Rho GTPase 1	EMKPACIK(g)AITR
-0.558986684	PLK1	Uncharacterized protein	HINPVAANIIQK(g)MIR
-0.57212902	GAPDH	Glyceraldehyde-3 -phosphate dehydrogenase	SIK(g)IVSNASCTTNCIPIAK
-0.572619048	EIF4A3	Eukaryotic initiation factor 4A-III	GIYAYGFEK(g)PSAIQQR
-0.582261219	IGJ	Uncharacterized protein	IIVPIK(g)SR
-0.589719074	U2AF1	U2snRNP auxiliary small subunit	GGFCNFMHIK(g)PISR
-0.591877117	AMFR	Uncharacterized protein	K(g)IPCGHIFHNSCIR

-0.59231982	PDIA4	Uncharacterized protein	KFDVTGYPTIK(gl)IFR
	gene	protein	sequence
-0.596991423	RFTN1	Raftlin	EGNISTK(gl)QIVFIQRPSIPQK
-0.604176395	EIF2B3	Uncharacterized protein	CYVHIMK(gl)EGICCR
-0.613000032	SREBF2	Uncharacterized protein	K(gl)VFIHEATVR
-0.613786869	OC426240	Uncharacterized protein	K(gl)YEMFAQTIQQSR
-0.615382578	FAM46C	FAM46C	GGGIK(gl)YSNIIVR
-0.635610594	PIK3AP1	Phosphoinositide 3-kinase adapter protein 1	RFVGHTK(gl)DVISVAFSSDNR
-0.642085629	RPS3	Uncharacterized protein	YK(gl)IIGGI AVR
-0.64397495	PABPC1	Uncharacterized protein	K(gl)EFSPFGTITSAK
-0.662514535	RABGEF1	Uncharacterized protein	K(gl)FFTASSR
-0.667349877	ATAD1	Uncharacterized protein	GVIIYGPPGCGK(gl)TIIAK
-0.677849814	NOP58	Uncharacterized protein	HPASTVQII GAEK(gl)AIFR
-0.678448671	EEF2	Elongation factor 2	VMK(gl)FSVSPVVR
-0.682559356	PABPC4	Uncharacterized protein	AK(gl)EFTNVYIK

-0.700526723	RPS10	Uncharacterized protein	PK(g)GIEGERPAR
--------------	-------	-------------------------	----------------

	gene	protein	sequence
-0.715905889	LSS	Uncharacterized protein	QVYIPM(ox)SYCYAK(g)R
-0.741615724	GNAI3	Uncharacterized protein	VKTTGIVETHFTFK(g)DIHFK
-0.748488858	EEF2	Elongation factor 2	STITDSIVCK(g)AGIIASAR
-0.754816045	VAMP1	Uncharacterized protein	VNVDK(g)VIER
-0.77244992	YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	NDTKEDVVFVHQTAIK(g)K
-0.783411854	MCM3	DNA replication licensing factor MCM3	TIIIACHIKQMSK(g)
-0.793514088	PCM1	Pericentriolar material 1 protein	AQIFNK(g)MR
-0.800988136	HMGCR	Uncharacterized protein	IQK(g)IISIAGR
-0.817146627	CYP51A1	Uncharacterized protein	MIK(g)TGINIAQFK
-0.822485483	HMGCS1	Hydroxymethylglutaryl-CoA synthase	IVQK(g)SVAR
-0.822753458	SCD	Uncharacterized protein	VSK(g)EVIIAR



-0.83156526	YBX1	Nuclease-sensitive element-binding protein 1	VIATK(gl)VIGTVK
	gene	protein	sequence
-0.83442056	HNRNPU	Uncharacterized protein	APQCIGK(gl)FIEIAAR
-0.836682295	RALYL	Uncharacterized protein	YGK(gl)IVGCSVHK
-0.83863781	HSPH1	Uncharacterized protein	GCAIQCAIISPAFK(gl)VR
-0.861942891	ELAVL1	Uncharacterized protein	FAANPNQNK(gl)NVAIISQICHSPAR
-0.863890138	DDX3X	Uncharacterized protein	RK(gl)QYPISIVIAPTR
-0.869122491	CSNK1A1	Casein kinase I isoform alpha	IEYVHTK(gl)NFIHR
-0.882242704	RIOK3	Uncharacterized protein	ISNQVFNAIK(gl)QHAYSEERR
-0.895879183	HSPH1	Uncharacterized protein	NHAAPFSK(gl)VITFYR
-0.906121516	SRP72	Uncharacterized protein	IAQGSVTK(gl)ACMIIR
-0.925973713	STT3A	Uncharacterized protein	FGQVYTEAK(gl)RPPGYDR
-0.926134552	RPL11	Uncharacterized protein	AAK(gl)VIEQITGQTPVFSK(gl)AR
-0.930929513	ACSBG2	Long-chain-fatty acid-CoA ligase ACSBG2	SVGAK(gl)SSTIRR

-0.939706896	RPSA	40S ribosomal protein SA	AVIK(g)FAAATGATPIAGR
-0.94133872	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	YDSTHGHFK(g)GTVK
	gene	protein	sequence
-0.971547344	HSD17B7	Uncharacterized protein	YHSCTSGIGK(g)NFVEPR
-1.002768831	DOCK8	Uncharacterized protein	TSAVSVGSK(g)IIQSR
-1.002789651	GBA2	Uncharacterized protein	TIFEK(g)NVMSFAGGK
-1.036976237	HSPH1	Uncharacterized protein	NQQITHAHNTVSNFK(g)R
-1.123726171	HNRNPU	Uncharacterized protein	MMVAGFK(g)R
-1.153808061	RAC1	Uncharacterized protein	KITPITYPQGIAMAK(g)EIGAVK
-1.169546008	EEF2	Elongation factor 2	YFDPATGK(g)FSK
-1.19844277	SREBF2	Uncharacterized protein	HRK(g)QADIDIAR
-1.215363412	ABCF2	Uncharacterized protein	TIQK(g)MMASGITER
-1.235591223		Tubulin alpha-1 chain	HGK(g)YMACCIIYRGDVVPK
-1.237976367	EIF3A	Uncharacterized protein	TVYEDK(g)IKQFQER
-1.250451536		Tubulin alpha-1 chain	VGINYQPPTVPPGGDIAG(g)VQR

-1.270493096		Actin,cytoplasmic type 5	K(gl)DIYANTVISGGTTMYPGIA DR
--------------	--	-----------------------------	--------------------------------

	gene	protein	sequence
-1.298619133	PABPC1	Uncharacterized protein	IVATK(gl)PIYVAIAQR
-1.298911154	TUBA3E	Uncharacterized protein	DVNAAIAAIK(gl)TKR
-1.328304499	TUBA3E	Uncharacterized protein	HGK(gl)YMACCOMIYR
-1.347485193		Ig mu chain C region	IETAIGK(gl)R
-1.353263929	MCM2	Uncharacterized protein	FVNNSHVK(gl)HHPGSK
-1.366604231	EIF5A2	Eukaryotic translation initiation factor 5A-2	GRPCK(gl)IVEM(ox)STSK
-1.477746948	LOC42602 3	Uncharacterized protein	IVVPASQCGSIIGK(gl)GGCK
-1.492723077	SNX3	Uncharacterized protein	VVPPPIPGK(gl)AIIR
-1.572019202	EEF1A	Elongation factor 1-alpha 1	KIEDGPK(gl)FIK
-1.697936494	CCT2	Uncharacterized protein	IIIANTGMDDKIK(gl)IFGSR

-1.698613122	CDK1	Cyclin-dependen t kinase1	GVIK(g)IADFGIAR
-2.003203073	IGF2BP3	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	FTEEIPIK(g)IIAHNNFVGR
	gene	protein	sequence
-2.063127482	PCGF	Uncharacterized protein	VSGEATIGHVEK(g)FIR
-2.221971324		Ig mu chain C region	VITPSFVDIFISK(g)SATITCR
-3.040309705		Tubulin beta-7 chain	ISVYYNEATGGK(g)YVPR

## 5 結論と展望

本研究によりユビキチン化酵素 RNF8、Rad18、RNF168、RNF169、RNF4 によってユビキチン化を受ける基質を同定した。このデータを基に、標的タンパク質の候補について、ウェスタンブロットなどの個別の実験を行い、ユビキチン化が変異体で低下しているのか、タンパク質の安定性に影響があるのかなど検討する必要がある。

## 6 参考文献

- Buerstedde, J.M., and Takeda, S. (1991). Increased ratio of targeted to random integration after transfection of chicken B cell lines. *Cell* *67*, 179-188.
- Doil, C., Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Menard, P., Larsen, D.H., Pepperkok, R., Ellenberg, J., Panier, S., Durocher, D., Bartek, J., *et al.* (2009). RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins. *Cell* *136*, 435-446.
- Fradet-Turcotte, A., Canny, M.D., Escribano-Diaz, C., Orthwein, A., Leung, C.C., Huang, H., Landry, M.C., Kitevski-LeBlanc, J., Noordermeer, S.M., Sicheri, F., *et al.* (2013). 53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark. *Nature* *499*, 50-54.
- Hirota, K., Sonoda, E., Kawamoto, T., Motegi, A., Masutani, C., Hanaoka, F., Szuts, D., Iwai, S., Sale, J.E., Lehmann, A., *et al.* (2010). Simultaneous disruption of two DNA polymerases, Poleta and Polzeta, in Avian DT40 cells unmasks the role of Poleta in cellular response to various DNA lesions. *PLoS Genet* *6*.
- Hirota, K., Tsuda, M., Murai, J., Takagi, T., Keka, I.S., Narita, T., Fujita, M., Sasanuma, H., Kobayashi, J., and Takeda, S. (2014). SUMO-targeted ubiquitin ligase RNF4 plays a critical role in preventing chromosome loss. *Genes Cells* *19*, 743-754.
- Hirota, K., Yoshikiyo, K., Guilbaud, G., Tsurimoto, T., Murai, J., Tsuda, M., Phillips, L.G., Narita, T., Nishihara, K., Kobayashi, K., *et al.* (2015). The POLD3 subunit of DNA polymerase delta can promote translesion synthesis independently of DNA polymerase zeta. *Nucleic Acids Res* *43*, 1671-1683.
- Kobayashi, K., Fujii, T., Asada, R., Ooka, M., and Hirota, K. (2015a). Development of a targeted flip-in system in avian DT40 cells. *PLoS One* *10*, e0122006.
- Kobayashi, S., Kasaishi, Y., Nakada, S., Takagi, T., Era, S., Motegi, A., Chiu, R.K., Takeda, S., and Hirota, K. (2015b). Rad18 and Rnf8 facilitate homologous recombination by two distinct mechanisms, promoting Rad51 focus formation and suppressing the toxic effect of nonhomologous end

joining. *Oncogene* *34*, 4403-4411.

Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., *et al.* (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* *318*, 1637-1640.

Komander, D., and Rape, M. (2012). The ubiquitin code. *Annu Rev Biochem* *81*, 203-229.

Lee, K.Y., and Myung, K. (2008). PCNA modifications for regulation of post-replication repair pathways. *Mol Cells* *26*, 5-11.

Li, L., Halaby, M.J., Hakem, A., Cardoso, R., El Ghamrasni, S., Harding, S., Chan, N., Bristow, R., Sanchez, O., Durocher, D., *et al.* (2010). Rnf8 deficiency impairs class switch recombination, spermatogenesis, and genomic integrity and predisposes for cancer. *J Exp Med* *207*, 983-997.

Marteijn, J.A., Lans, H., Vermeulen, W., and Hoeijmakers, J.H. (2014). Understanding nucleotide excision repair and its roles in cancer and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 465-481.

Nakada, S., Tai, I., Panier, S., Al-Hakim, A., Iemura, S., Juang, Y.C., O'Donnell, L., Kumakubo, A., Munro, M., Sicheri, F., *et al.* (2010). Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature* *466*, 941-946.

Okada, T., Sonoda, E., Yamashita, Y.M., Koyoshi, S., Tateishi, S., Yamaizumi, M., Takata, M., Ogawa, O., and Takeda, S. (2002). Involvement of vertebrate polkappa in Rad18-independent postreplication repair of UV damage. *J Biol Chem* *277*, 48690-48695.

Saberi, A., Hohegger, H., Szuts, D., Lan, L., Yasui, A., Sale, J.E., Taniguchi, Y., Murakawa, Y., Zeng, W., Yokomori, K., *et al.* (2007). RAD18 and poly(ADP-ribose) polymerase independently suppress the access of nonhomologous end joining to double-strand breaks and facilitate homologous recombination-mediated repair. *Mol Cell Biol* *27*, 2562-2571.

Stewart, G.S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A.K., Kolas, N.K., Miller, E.S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., *et al.* (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell* *136*, 420-434.

- van Cuijk, L., Vermeulen, W., and Marteijn, J.A. (2014). Ubiquitin at work: the ubiquitous regulation of the damage recognition step of NER. *Exp Cell Res* *329*, 101-109.
- Xie, J., Kim, H., Moreau, L.A., Puhalla, S., Garber, J., Al Abo, M., Takeda, S., and D'Andrea, A.D. (2015). RNF4-mediated polyubiquitination regulates the Fanconi anemia/BRCA pathway. *J Clin Invest* *125*, 1523-1532.
- Yamamoto, K.N., Kobayashi, S., Tsuda, M., Kurumizaka, H., Takata, M., Kono, K., Jiricny, J., Takeda, S., and Hirota, K. (2011). Involvement of SLX4 in interstrand cross-link repair is regulated by the Fanconi anemia pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* *108*, 6492-6496.
- Yamashita, Y.M., Okada, T., Matsusaka, T., Sonoda, E., Zhao, G.Y., Araki, K., Tateishi, S., Yamaizumi, M., and Takeda, S. (2002). RAD18 and RAD54 cooperatively contribute to maintenance of genomic stability in vertebrate cells. *EMBO J* *21*, 5558-5566.
- Zhao, G.Y., Sonoda, E., Barber, L.J., Oka, H., Murakawa, Y., Yamada, K., Ikura, T., Wang, X., Kobayashi, M., Yamamoto, K., *et al.* (2007). A critical role for the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13 in initiating homologous recombination. *Mol Cell* *25*, 663-675.



## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、ご指導ご鞭撻を頂きました、首都大学東京大学院 理工学研究科 分子物質化学専攻 生物化学研究室 廣田耕志教授、田岡万悟助教に心から深く感謝致しますとともに厚く御礼申し上げます。

最後に一方ならぬご協力を頂きました首都大学東京大学院 理工学研究科 分子物質化学専攻 磯辺俊明特任教授、山内芳雄博士、延優子氏、藤田千春氏、照喜名悟朗氏、田島愛実氏、中川万紀子氏、竹内藍子氏、加賀裕之氏、高橋尚史氏、早川健太郎氏、堀正之氏、添野公雄氏、浅田隆大氏、木下暁喜氏、高沢浩則氏、石川大輔氏、上原清孝氏、川澄遼太郎氏、小林香氏、高木季代氏、足立朗氏、梅田未来氏、大岡正人氏、清水直登氏に謝意を申し上げます。