

Title	脱ユビキチン化酵素によるDNA損傷応答抑制機構の解明
Sub Title	Inhibition of the DNA damage response by deubiquitinating enzymes
Author	中田, 慎一郎(Nakada, Shinichiro)
Publisher	
Publication year	2011
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2010.)
Abstract	DNA二本鎖損傷応答に必須の翻訳後修飾であるヒストンユビキチン化を抑制する分子としてOTUB1を同定した.OTUB1がヒストンユビキチン化を抑制する分子機構は, 驚くべきことに脱ユビキチン化ではなく, ヒストンユビキチン化を担うE3であるRNF168とともに機能するE2ユビキチン結合酵素UBC13の活性阻害による抑制であると判明した.また, OTUB1はヒストンユビキチン化の調節によりDNA修復を制御していることも明らかとした.この研究によりOTUB1がDNA損傷応答を制御することを世界で初めて示すとともに, 脱ユビキチン化酵素による脱ユビキチン活性非依存生のユビキチン化反応抑制という新たな分子機構を世界で初めて示した.また, OTUB1とUBC13との結合がDNA損傷応答を増強するための薬剤標的となり得ることも示した.
Notes	研究種目: 研究活動スタート支援 研究期間: 2009 ~ 2010 課題番号: 21870033 研究分野: DNA損傷応答 科研費の分科・細目: 分子生物学
Genre	Research Paper
URL	http://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_21870033seika

機関番号：32612

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870033

研究課題名（和文）

脱ユビキチン化酵素による DNA 損傷応答抑制機構の解明

研究課題名（英文）

Inhibition of the DNA damage response by deubiquitinating enzymes

研究代表者

中田 慎一郎 (NAKADA SHINICHIRO)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70548528

研究成果の概要（和文）：

DNA 二本鎖損傷応答に必須の翻訳後修飾であるヒストンユビキチン化を抑制する分子として OTUB1 を同定した。OTUB1 がヒストンユビキチン化を抑制する分子機構は、驚くべきことに脱ユビキチン化ではなく、ヒストンユビキチン化を担う E3 である RNF168 とともに機能する E2 ユビキチン結合酵素 UBC13 の活性阻害による抑制であると判明した。また、OTUB1 はヒストンユビキチン化の調節により DNA 修復を制御していることも明らかとした。この研究により OTUB1 が DNA 損傷応答を制御することを世界で初めて示すとともに、脱ユビキチン化酵素による脱ユビキチン活性非依存生のユビキチン化反応抑制という新たな分子機構を世界で初めて示した。また、OTUB1 と UBC13 との結合が DNA 損傷応答を増強するための薬剤標的となり得ることも示した。

研究成果の概要（英文）：

I reported that OTUB1, a deubiquitinating enzyme, was an inhibitor of DSB-induced chromatin ubiquitination. Surprisingly, we found that OTUB1 suppressed RNF168-dependent poly-ubiquitination independently of its catalytic activity. OTUB1 did so by binding to and inhibiting UBC13, the cognate E2 enzyme for RNF168. This unusual mode of regulation was unlikely to be limited to UBC13 because analysis of OTUB1-associated proteins revealed that OTUB1 bound to E2s of the UBE2D and UBE2E subfamilies. Finally, OTUB1 depletion mitigated the DSB repair defect associated with defective ATM signalling, indicating that pharmacological targeting of the OTUB1-UBC13 interaction might enhance the DNA damage response.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010 年度	1,010,000	303,000	1,313,000
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：DNA 損傷応答

科研費の分科・細目：分子生物学

キーワード：DNA 損傷応答，ユビキチン，ヒストン，脱ユビキチン化酵素

1. 研究開始当初の背景

細胞の活動はゲノム情報に支配されており、その正常な機能を保つために、細胞はゲノムの恒常性を保たなくてはならない。ゲノム恒常性維持において、重要な役割を果たしてい

るのが DNA damage checkpoint と DNA 損傷修復機構である。DNA 損傷応答の異常は、DNA damage checkpoint の活性化や DNA 損傷修復を妨げ、ゲノム不安定性を誘導する。ゆえに、両者の制御機構を解明することは、発癌や老

化といった普遍的な生物学的医学的問題の理解に重要である。DNA 損傷がそれほど深刻でなければ、DNA 損傷応答は可逆性であり、DNA 損傷修復が完了すると、DNA 損傷応答は沈静化する。このことから、DNA 損傷応答には抑制系が存在すると推定される。抑制系機構が異常亢進した場合、DNA 損傷応答の活性化が妨げられることになり、これもまた、ゲノム不安定性を誘導すると考えられる。また、抑制系がうまく機能しない場合には、DNA 損傷修復完了後にも DNA 損傷応答の活性化が遷延することとなり、細胞生存に不利に働くと予想される。このように、DNA 損傷応答抑制系の解明も重要な研究課題であるが、DNA 損傷応答活性化機構の詳細が解明されるまでは、その研究を進めることができなかった。しかし、ここ数年で DNA 損傷応答関連の研究が劇的に進み、ヒストンのリン酸化に加えて、ヒストンのユビキチン化が DNA 損傷応答の活性化に重要であることが解明された。これにより、脱ユビキチン化に着目して、DNA 損傷応答抑制系の研究を進めることが可能となった。

2. 研究の目的

当研究では、脱ユビキチン化酵素 OTUB1 が DNA 損傷応答抑制において果たす役割を解明することを目的とした。当研究の成果は、DNA 損傷応答に「抑制」という新たな視点を提供し、これにより、細胞のゲノム恒常性維持機構の理解が大きく進むと期待できる。

3. 研究の方法

- (1) RNA 干渉法により OTUB1 の発現を抑制し、そのヒストンユビキチン化に対する影響を蛍光抗体染色法により評価した。
- (2) 発現ベクターを培養細胞に導入し、OTUB1 もしくはその変異体を高発現させることで、OTUB1 のどのような機能がヒストンユビキチン化の抑制に重要であるかを決定した。
- (3) 共免疫沈降法の後に質量分析を行い、OTUB1 が結合する分子を決定した。
- (4) (3) で決定した分子との結合に必要な OTUB1 のドメインを共免疫沈降法で確認した。
- (5) E3 である RNF168 を培養細胞に強制発現させ、ヒストンをユビキチン化させる系において、OTUB1 を強制発現させ、ヒストンユビキチン化の抑制効果の確認を行った。
- (6) リコンビナントタンパクを用い、細胞内で起こる現象を試験管内で再現した。
- (7) DNA 修復効率を検出するために DR-GFP アッセイを行い、OTUB1 が相同組み換え修復に与える影響を確認した。

4. 研究成果

DNA 損傷の中でも最も危険な DNA 二本鎖損傷では、E3 ubiquitin ligase RNF8, RNF168, E2 conjugating enzyme UBC13 などによるクロマチンユビキチン化を介したシグナリングにより、DNA 修復や DNA damage checkpoint の制御がおこなわれている。当研究では、脱ユビキチン化酵素 OTUB1 が脱ユビキチン化活性を使わずに UBC13 の機能を阻害し、クロマチンユビキチン化を抑制的に制御することを解明した。

タンパクのユビキチン化反応は、ATP 依存性に行われる E1 ubiquitin activating enzyme へのユビキチンの thioester 結合、E2 ubiquitin conjugating enzyme へのユビキチンのトランスファー（このときも thioester 結合）そして E3 ubiquitin ligase を介した基質へのユビキチンのトランスファー（このときは isopeptide 結合）というカスケードにより行われる。タンパク分解の目印となるユビキチン鎖は、ユビキチン分子の Lys48 に別のユビキチン分子の C 末端 Gly67 が isopeptide 結合することをくりかえした Lys48 結合型ユビキチン鎖であるが DNA 二本鎖損傷時にはヒストン H2A に Lys63 結合型ユビキチン鎖が付加される。ユビキチン化ヒストン H2A は分解されずに BRCA1 や 53BP1 といった DNA 損傷応答関連タンパクの DNA 二本鎖損傷部位への局在を促すシグナルとなる。

DNA 損傷依存性のクロマチンユビキチン化抑制因子を発見するために、我々は RNA 干渉法を用いてさまざまな脱ユビキチン化酵素の発現抑制を試みた。その結果、OTUB1 をノックダウンすると、DNA 損傷部位におけるユビキチン鎖形成やその下流となる 53BP1 の DNA 損傷部位への集積が長時間遷延することがわかった（図 1）。

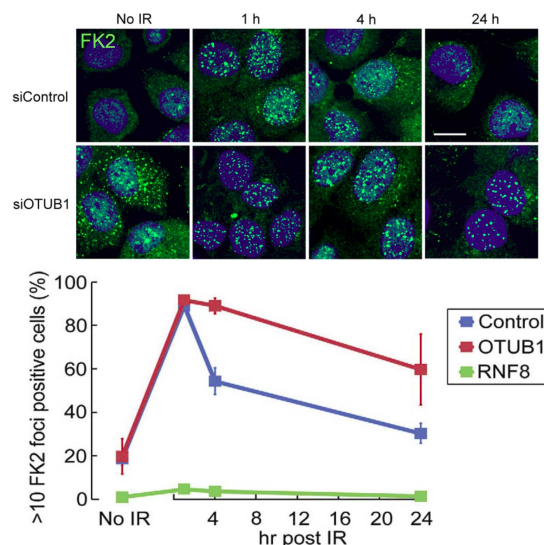


図 1 : OTUB1 の発現を抑制した細胞では放射線照射後に生じる DNA 損傷部位におけるユ

ユビキチン鎖の形成 (FK2 foci) が長時間遷延した。

一方, OTUB1 を一過性高発現すると, 放射線照射によるユビキチン鎖形成 (図 2) および 53BP1 (図 3) や BRCA1 (図 4) の DNA 損傷部位への集積が阻害された。

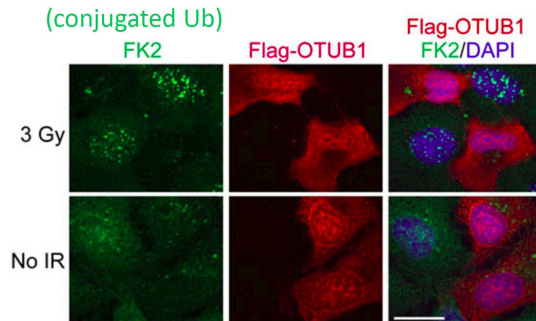


図 2 : OTUB1 の過剰発現で DNA 損傷部位におけるユビキチン鎖の形成が阻害された。

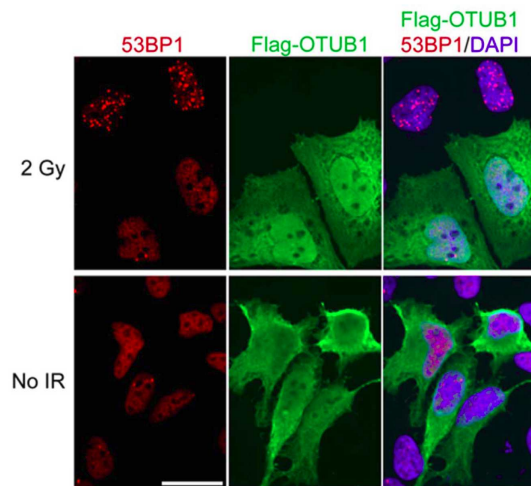


図 3 : OTUB1 の過剰発現で DNA 損傷部位における 53BP1 foci の形成が阻害された。

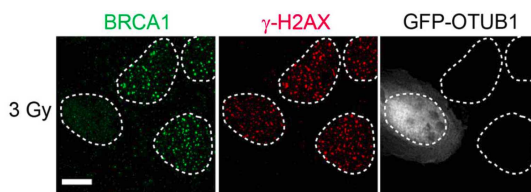


図 4 : OTUB1 の過剰発現で DNA 損傷部位における BRCA1 foci の形成が阻害された。

驚くべきことに, 脱ユビキチン化酵素の活性中心を破壊した C91S を過剰発現しても野生型を過剰発現させたときと同様にヒストンユビキチン化が阻害された。一方, OTUB1 の脱ユビキチン活性を担う OTU ドメインの catalytic triad の変異体 D88A C91S H265A (ASA: 脱ユビキチン活性なし) および, OTU ドメインには含まれない N 末を欠く変異体 (N: 脱ユビキチン活性あり) にはヒストンユビキチン化の阻害効果は認められな

かった (図 5)。これらの結果は, OTUB1 が脱ユビキチン活性非依存性に, しかし N 末および完全な形の OTU ドメインに依存してヒストンユビキチン化を抑制的に制御していることを示していた。

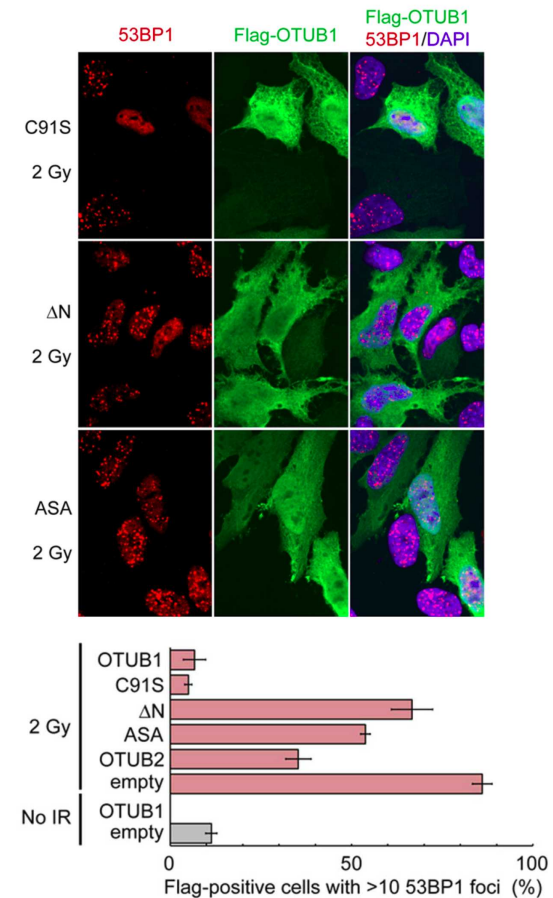


図 5 : OTUB1 の変異体による 53BP1 foci の抑制

OTUB1 が直接結合し, その機能を制御しているタンパクを同定するため, 我々は, 免疫沈降-液体クロマトグラフィ-タンデムマススペクトロメトリー (IP-LC-MS/MS) を用いて, OTUB1 結合タンパクを検索した。その解析結果から, OTUB1 は UBE2D ファミリー, UBE2E ファミリー, UBC13 (UBE2N) といった E2 ubiquitin conjugating enzyme やユビキチンと複合体を形成していることが判明した。そこで, RNF168 とともにクロマチンポリユビキチン化を担っていることが知られている UBC13 に焦点を当て, 解析を進めた。免疫沈降やリコンビナントタンパクを用いたプルダウンアッセイにより, OTUB1 は UBC13 と直接結合し, さらにユビキチンがチャージした UBC13 と N 末を用いて強く結合することが明らかとなった (図 6)。

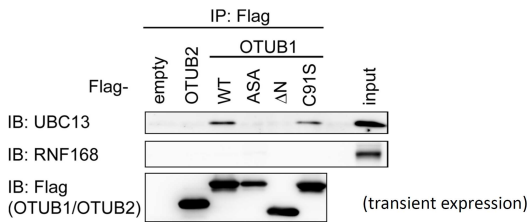


図 6 : OTUB1 と UBC13 との結合

さらに、リコンビナントタンパクのみを用いて RNF168-UBC13 によるユビキチン鎖形成反応を *in vitro* で再現したところ、OTUB1 は RNF168 の存在下でも非存在下でも、UBC13 依存性のユビキチン鎖形成反応を抑制した (図 7)。

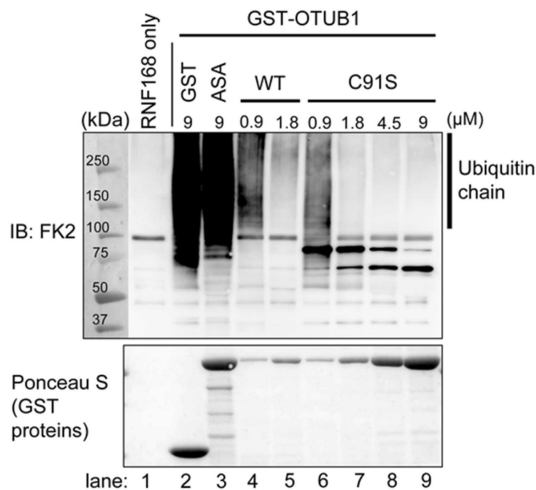


図 7 : リコンビナントタンパクを用いたユビキチン化実験。脱ユビキチン活性のない C91S もユビキチン化反応を抑制した。

そして、さらに詳細な *in vitro* 実験により、OTUB1 は UBC13 から discharge されるユビキチン分子が他のユビキチン分子と isopeptide 結合を起こす過程を阻害することが判明した。また、(DNA 損傷応答とは直接関係ないが) OTUB1 は *in vitro* において UBE2D2、UBE2D3 (ともに IP-LC-MS/MS で OTUB1 結合タンパクとして検出された分子) 依存性のユビキチン鎖形成反応も抑制した。DNA 二本鎖損傷応答は最上流で機能するセリン・スレオニンキナーゼ ATM に依存している。ATM を薬剤的に阻害すると、53BP1 の DNA 損傷部位への局在が減弱する。このとき OTUB1 の発現抑制を行うと、53BP1 の DNA 損傷部位への局在が回復する。また、ATM 阻害剤により悪化する相同組み換え修復 (BRCA1 依存性と考えられている) の効率も OTUB1 の発現抑制により回復した (図 8)。

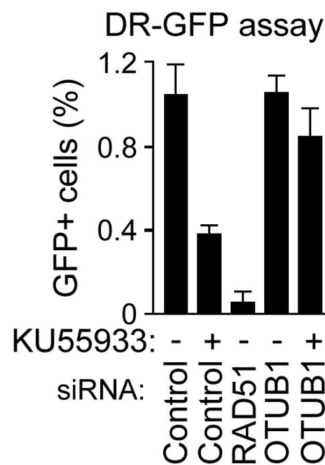


図 8 : OTUB1 の発現を抑制することにより、ATM 抑制下において減弱した相同組み換え修復の効率を回復することができた。

反対に、OTUB1 を過剰発現した場合には相同組み換えは強く抑制された。これらのことから、OTUB1 は DNA 損傷修復の制御に関与することが示された。

以上、まとめると、OTUB1 は UBC13 に結合し、脱ユビキチン活性非依存性に DNA 損傷依存性ユビキチン化反応を制御しており (図 9)、OTUB1 と UBC13 の結合は DNA 損傷応答を人為的に調節するための標的となりうる。OTUB1 は DNA 損傷応答以外のユビキチン反応の調節や UBC13 以外の E2 の機能制御にも関与する可能性があり、また、脱ユビキチン化酵素 (特に脱ユビキチン活性部位が機能しないと知られているもの) が、脱ユビキチン化以外の方法でユビキチン化を制御する機能を備えている可能性を示している。

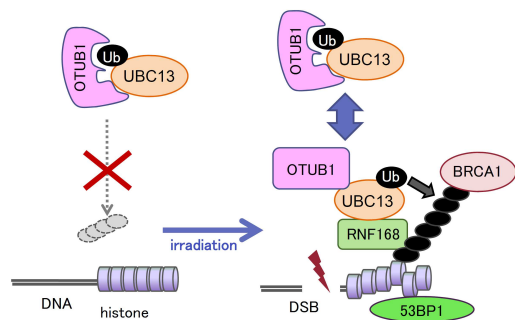


図 9 : 当研究成果から考えられるモデル

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1件)

Nakada S, Tai I, Panier S, Al Hakim A, Iemura S, Juang YC, O'Donnell L, Kumakubo A, Munro M, Sicheri F, Gingras AC, Natsume T, Suda T, Durocher D. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. *Nature*. 466(7309):941-6, 2010. (査読あり)

[学会発表](計6件)

中田慎一郎 DNA double strand break and chromatin ubiquitination. 第115回小児血液腫瘍懇話会, 東京, 2011年1月21日

中田慎一郎 OTUB1によるATM依存性DNA損傷応答の調節 (招聘) 第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会合同大会 ワークショップ: 2W18 ATMファミリータンパク質をターゲットとしたDNA損傷応答研究の新たな展開 神戸, 2010年12月8日

中田慎一郎 脱ユビキチン化酵素OTUB1によるDNA損傷依存性クロマチンユビキチン化の制御 (招聘、英語発表) 日本放射線影響学会 第53回大会 シンポジウム5 DNA damage response and disease 京都, 2010年10月21日

Nakada S, Durocher D. OTUB1 sequesters UBC13 and inhibits DNA damage dependent ubiquitination.)3R meeting, Toyama, Japan, October 27, 2010

中田慎一郎 脱ユビキチン化酵素OTUB1による脱ユビキチン活性非依存的DNA損傷応答抑制 (招聘) 第69回日本癌学会学術総会 シンポジウム: 15. DNA修復応答とゲノム不安定性 大阪 2010年9月22日

Nakada S, Durocher D. Non-canonical inhibition of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB1. EMBO workshop. The interface between the ubiquitin family and the DNA damage response. Rovinj, Croatia, September 1-5, 2010

[その他]

ホームページ等

<http://www.careerpath-prj.keio.ac.jp/kanrinmaru/scholar/nakada/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中田 慎一郎 (SHINICHIRO NAKADA)
慶應義塾大学・医学部・講師
研究者番号: 70548528

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし