

DNA 損傷応答におけるヘテロクロマチン因子の役割

北海道大学大学院 先端生命科学研究院 分子細胞生物学研究室

小布施 力史

1. はじめに 目的

生命現象の根幹である遺伝情報を担う DNA を、正確に継承、維持するために、DNA 修復機構は必須である。ヘテロクロマチンは、細胞周期をとおして DNA 密度が高い凝縮した構造をとる。その凝縮した構造故に、DNA 損傷が発生した場合、I) DNA 損傷部位の迅速な発見、II) ヘテロクロマチン構造の解除、III) DNA 修復タンパク質の集積と修復反応、IV) ヘテロクロマチンの再構成、などユークロマチンに生じた損傷応答には必要のない一連の反応が行われると考えられている¹。

近年、ヘテロクロマチン構成タンパク質の HP1 が、DNA 損傷部位に集まることが知られるようになった^{2,3}。また、HP1 に依存して、53BP1 や修復タンパク質の BRCA1、Rad51 が損傷部位に集積することが報告されている³。これらの知見から、HP1 と 53BP1 は、ヘテロクロマチンにおける DNA 修復機構の理解に重要なキープクターであると考えられている。しかし、HP1 が促進する DNA 修復メカニズムと HP1 が関与する 53BP1 に関与するイベントとの分子リンクは不明な点が多く、どのようにして凝縮したヘテロクロマチンに DNA 修復タンパク質がリクルートされるのか、ヘテロクロマチンの再構成をどのように制御しているのかは、分子レベルでは未だ理解が進んでいない。

われわれは、HP1 と結合するタンパク質として機能未知タンパク質 HPB66 を同定した⁴。興味深いことに、このタンパク質は 53BP1、Rev3、Dot1 など、DNA 損傷修復や損傷応答に関与するタンパク質と相互作用することを見いだした(未発表)。本課題では、これらの結合因子のうち 53BP1 と HPB66 との相互作用に着目し、HP1 およびヘテロクロマチンと、損傷応答との関係について明らかにすることを目的とする。そのために、HP1、HPB66 および 53BP1 との物理的な相互作用を明らかにしながら、その上下関係やクロマチンとの相互作用を解析する。これにより、これまで不明であった、ヘテロクロマチン領域がその凝縮した構造を保ちエピゲノムのエフェクターとしての機能を果たしながら、様々な損傷修復タンパク質のアクセスを如何に可能としているのかについて、明らかになるものと思われた。さらに、DNA 損傷の防止、ひいてはがんをはじめとする様々な疾患の防止に、これらのヘテロクロマチン因子が如何に関与しているのかについて、議論できるレベルまで研究を推進することを目指した。

2. 方法

I) HPB66 と 53BP1 が関わる DNA 二重鎖切断修復経路の相互作用の解明：HPB66 は、どのようなタンパク質の制御を受け、53BP1 依存的な DNA 修復経路にどのような影響を与えるのか解析した。具体的には、53BP1 に依存性があるタンパク質の DNA 損傷部位への集積が、RNA 干渉法を用いた HPB66 ノックダウンによりどのような影響を受けるかを免疫染色法、修飾特異的抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。また、53BP1 の上流にあたる ATM キナーゼなどのノックダウンや酵素阻害剤を用いて、HPB66 の損傷部位集積への影響を調べ、HPB66 の 53BP1 が関わる既知の損傷経路の上流、下流との依存性を解析した。

II) HPB66 ノックダウンによる DNA 損傷感受性の評価：HPB66 と DNA 修復経路の相互作用が、細胞の生存にどのように関わるのかを解析した。具体的には、HPB66 ノックダウンにより、放射線照射や、DNA 損傷薬剤による感受性が増大するのかをコロニーファーメーションアッセイで定量化し、姉妹染色分体交換の頻度の変化を分裂期染色体スプレッドと BrdU 染色で、細胞周期チェックポイントは働いているのかをフローサイトメトリーなどにより解析することで行った。

III) HPB66、53BP1 間の相互作用を破壊したときの DNA 修復への影響：HPB66 と 53BP1 との物理的な相互作用は、ヘテロクロマチン上の DNA 修復にどのように寄与しているのかを知るために、相互作用に必要なアミノ酸の同定と相互作用できなくなる変異体の作製を行った。具体的には、酵母 2 hybrid 法、免疫沈降法により、部位欠損変異体を用いて、結合部位の探索を行い、責任アミノ酸を置換した変異体を作製する。作製した変異体を、内在性タンパク質と入れ替える実験と、前述の実験 I) ~ III) を組み合わせることで、HPB66 を介したヘテロクロマチンと 53BP1 の物理的な相互作用の DNA 修復への寄与を調べることができると考えた。

3. 結果 研究成果

HPB66は53BP1と結合すること、放射線を細胞に照射してDNA損傷を引き起こすとその相互作用がより強くなることがわかった。また、HPB66は損傷部位に特異的な集積が見られるgamma-H2AXや53BP1と共局在すること、この損傷依存的な局在は53BP1に依存することが分かった。さらに、HPB66をノックダウンすることにより細胞は放射線感受性を示すことから、このタンパク質は損傷応答に関与する新規因子であることが示唆された。

DNA二本鎖切断はDNA複製後に相同な鋳型配列が存在する場合、相同組換え修復 (homologues recombination; HR)により損傷が修復される一方で、G1期など相同な鋳型配列がない場合、非同末端結合 (non-homologues end joining)により切断部位末端がDNA ligase IVの働きによって直接繋ぎ合わせて修復する⁵。2013年、53BP1と結合するRif1が、DNA二本鎖切断損傷をHR、NHEJいずれの方法で修復するかを選択 (パスウェイチョイス)に関与することが報告された⁶⁻¹⁰。具体的には、53BP1と結合するRif1は、HRの促進に重要なBRCA1の損傷部位への集積を抑制することにより、NHEJ修復を促進していることが示されている。HPB66も53BP1と結合するため、パスウェイチョイスに関与するか調べたところ、HPB66をノックダウンするとHR進行に重要なBRCA1とRad51の損傷部位への集積が低下した。このことは、HPB66はRif1とは反対にHRを促進する機能があることを示すものである。興味深いことに、53BP1をノックダウンすると、HPB66は前述のようにDSBに集積できないにもかかわらず、BRCA1のDSB集積低下が見られなかった。この結果と、遺伝学的な解析とを組み合わせることにより、HPB66は、単にBRCA1、Rad51の集積を単に促進するのではなく、53BP1-Rif1がBRCA1の損傷部位への集積を抑制する機能を、阻害していることが示めされた。

Rif1と53BP1との結合には、53BP1がDNA損傷依存的なATMによるリン酸化が必要であることが知られている。53BP1とHPB66との相互作用を詳細に調べたところ、53BP1上のCDK (Cell cycle dependent kinase)サイトのリン酸化に依存していることがわかった。実際に、53BP1の野生型の代わりにATMのリン酸化サイトに変異を導入した変異体に置き換えた細胞では、HPB66は損傷部位に集積するが、Rif1の集積は見られなかった。一方、CDKのリン酸化サイトに変異を導入した変異体に置き換えた細胞では、Rif1は損傷部位に集積するが、HPB66の集積は見られなかった。

4. 考察 まとめ

DNA損傷依存的なATMによる53BP1のリン酸化により、損傷部位に集積した53BP1上にRif1が結合し、BRCA1を阻害することにより、HRを抑制し、NHEJを促進することが提唱されている。しかしながら、S期やG2期において相同鋳型配列が存在するか否かを識別して、NHEJかHRかのパスウェイチョイスをしているのかについては不明な点が多かった。今回の解析により、CDK依存的な53BP1のリン酸化によりHPB66が53BP1に結合することが示された。CDK活性はS期からG2期にかけて増大することから、相同鋳型鎖のあるS期からG2期にかけてHPB66が53BP1上にリクルートされ、Rif1の機能を抑制することにより、HRを促進すると考えられる。このように、53BP1のリン酸化に依存したRif1とHPB66の結合により、DNA二本鎖切断の細胞周期依存的なパスウェイチョイスが如何に制御されているのかについて合理的に説明できると思う。HPB66が制御するBRCA1については、変異を保持した女性は乳がん、卵巣がんの発症リスクが著しく高いことが知られている。本研究の知見は、これらががんの病因・病態の解明の一助になると考えられる。また、これらの知見はヘテロクロマチンと損傷応答との関係を明らかにするための基盤となる知見と思われる。

4. 発表論文、参考文献

・本課題の成果については現在投稿中

- (1) Shi, L. & Oberdoerffer, P. *Biochim Biophys Acta* **1819**, 811-819 (2012).
- (2) Luijsterburg, M. S. *et al. J Cell Biol* **185**, 577-586 (2009).
- (3) Baldeyron, C., Soria, G., Roche, D., Cook, A. J. & Almouzni, G. *J Cell Biol* **193**, 81-95 (2011).
- (4) Nozawa, R. S. *et al. Nat Cell Biol* **12**, 719-727 (2010).
- (5) Symington, L. S. & Gautier, J. *Annu Rev Genet* **45**, 247-271 (2011).
- (6) Chapman, J. R. *et al. Mol Cell* **49**, 858-871 (2013).
- (7) Di Virgilio, M. *et al. Science* **339**, 711-715 (2013).
- (8) Escribano-Diaz, C. *et al. Mol Cell* **49**, 872-883 (2013).
- (9) Feng, L., Fong, K. W., Wang, J., Wang, W. & Chen, J. *J Biol Chem* **288**, 11135-11143 (2013).
- (10) Zimmermann, M., *et al. Science* **339**, 700-704 (2013).