

136. DSB 修復に伴う転写抑制における核内構造体の機能解明

西 良太郎

立命館大学 生命科学部 生命医科学科 病態細胞生物学研究室

Key words : DNA 二重鎖切断修復, 脱ユビキチン化, 核内構造体

緒 言

細胞毒性の高い DNA 損傷の一つである DNA 二重鎖切断 (DNA double-strand breaks: DSBs) は哺乳類細胞においては、主に非相同末端再結合 (non homologous end joining: NHEJ) あるいは、相同組換え修復 (homologous recombination: HR) により修復される。DSB を適切な修復経路により修復すること (DSB 修復経路選択と呼ばれる) はゲノム恒常性を維持する上で不可欠である。また、DSB に対する適切な細胞応答には修復経路の選択に加えて、細胞周期チェックポイントや、転写抑制等の他の DSB 応答とのクロストークの厳密な制御が必須である。現在までに、DSB 修復の分子機構についてはこれに関与するタンパク質の同定に始まり、エピジェネティックな制御を含むクロマチンレベルにおける制御が解明されてきた。その一方でゲノム DNA は核内において PML body 等の多様な核内構造体と混在しているが、これらの核内構造体が DSB 修復及び、応答に果たす役割には解明すべき点が多く残されている。Nuclear speckle は転写因子、スプライシング因子及び、RNA から構成され、転写が活発に行われているゲノム領域に隣接して存在する核内構造体である。哺乳類細胞の核内では免疫染色によりおよそ 25-50 個の不定形なドット状の構造体として認められる¹⁾。これまでに転写が活発に行われているゲノム領域に生じた DSB は HR によって修復される傾向が存在することが報告されており²⁾、転写と DSB 修復経路選択の関連が示唆されていた。その一方で、DSB 依存的な DSB 近傍の転写抑制も DSB 応答に重要であることが知られている³⁾。従って、DSB 応答と転写とのクロストークを明らかにすることは DSB 修復及び、応答を理解する上で重要であるが、核内構造体の関与については未解明な点が多い。

そこで、本研究では我々のヒト脱ユビキチン化酵素 (deubiquitylating enzymes: DUBs) の細胞内局在解析から⁴⁾、nuclear speckle に局在することを見出した USP42 の機能解析により nuclear speckle と DSB 修復及び、応答のクロストークを明らかにすることを目的とした。

方法および結果

1. USP42 は相同組換え修復に促進的に機能する

これまでにヒト骨肉腫由来細胞 (U2OS) に一過性に過剰発現させた GFP タグを融合した USP42 が nuclear speckle に局在することを見出していたが、内在性 USP42 も同様の細胞内局在を示すか免疫蛍光染色法により検討したところ、内在性 USP42 は nuclear speckle のマーカーである sc35 と共局在を示した (図 1A)。そこで、USP42 が DSB 応答に寄与するか検討する為に、内在性 USP42 を small interference RNA (siRNA) によりノックダウン後、細胞に電離放射線 (ionizing radiation: IR) を照射し、細胞生存率を測定した。コントロール細胞と比較して、USP42 をノックダウンした細胞では有意に細胞生存率が低下した (図 1B)。さらに、HR による DSB 修復を特異的に検出する Direct-repeat GFP アッセイ⁵⁾ により、USP42 は HR に促進的に機能することが示唆された (図 1C)。これらの結果により、USP42 が核内の局所、nuclear speckle に存在しながら、HR に促進的に機能する新規因子であることが示唆された。

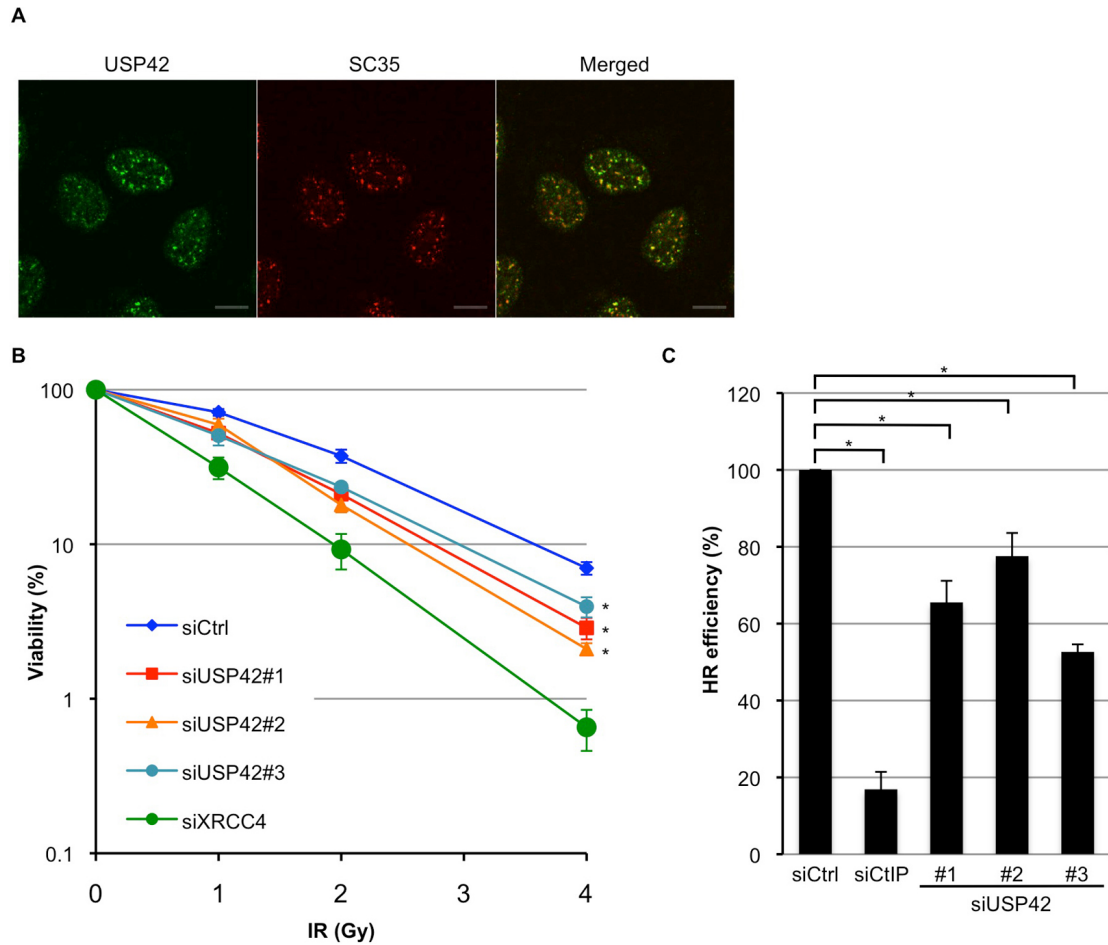


図 1. USP42 は相同組換え修復を促進する

A) U2OS 細胞における内在性 USP42 (緑) 及び sc35 (赤) の細胞内局在。Scale bar: 10 μ m.

B) 図中に示した siRNA をトランスフェクションした U2OS 細胞に IR を照射し、コロニーフォーメーションアッセイを行った。エラーバーは標準誤差を示す (n = 4)。*:p < 0.05, Student's t-test.

C) U2OS-DR-GFP 細胞に図中に示した siRNA 及び, I-SceI 発現プラスミドをトランスフェクションし、GFP 陽性細胞の割合を flow cytometry を用いて解析した。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。*:p < 0.05, Student's t-test.

そこで、USP42 と相互作用する既知の HR 因子を探索した。USP42 あるいは、MRE11 を U2OS 細胞に一過性に過剰発現させ共免疫沈降を行ったところ USP42 は内在性の MRE11 及び RAD50 と、MRE11 は内在性の USP42 との相互作用が其々認められた (図 2A)。USP42 における MRN 複合体との相互作用部位を同定する目的で、様々な USP42 ドメイン欠失変異体を用いて同様に共免疫沈降実験を行ったところ、USP42 は USP ドメインを含む N 末端領域及び、USP ドメイン以外の部位で MRN 複合体と相互作用することが明らかになった (図 2B、C)。

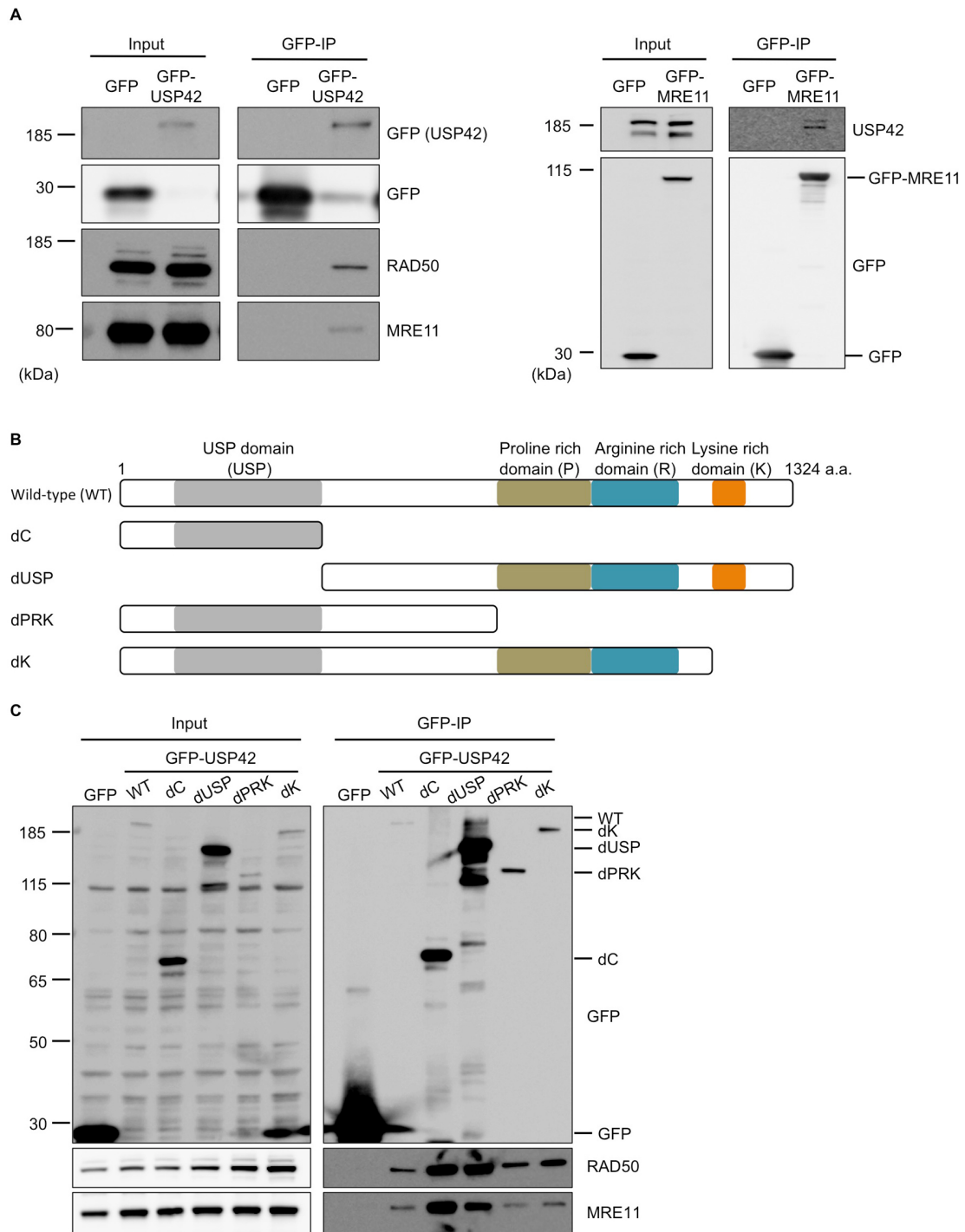


図 2. USP42 は MRN 複合体と複数ドメインで相互作用する

A) U2OS 細胞に GFP 融合 USP42 (左) あるいは、MRE11 (右) をトランスフェクションし、抗 GFP 抗体を用いて免疫沈降後、図中に示す抗体でイムノブロッティングを行った。

B) ヒト USP42 のドメイン構造と用いた欠失変異体の模式図。

C) GFP タグを融合した図中に示す USP42 欠失変異体を用いて A と同様に免疫沈降を行った。

2. USP42 は HR の初期反応である DNA end-resection を促進する

より詳細に USP42 による HR 制御機構を理解する為に、U2OS 細胞において USP42 を siRNA によりノックダウンし、HR によって修復される DSB を生じる薬剤である camptothecin (CPT) による処理後、イムノブロッティングに

より HR に伴うタンパク質翻訳後修飾を検討した。USP42 のノックダウンにより HR の初期反応である一本鎖 DNA の形成 (DNA end-resection) に伴うと考えられている RPA2 のリン酸化⁶⁾に減弱が認められた (図 3A)。さらに、ゲノム DNA をあらかじめ BrdU でラベルし、一本鎖 DNA が形成された場合にのみ抗 BrdU 抗体によって認識されるアッセイ系⁴⁾を用いて DNA end-resection を検討したところ、イムノプロットングの結果と一致して、USP42 のノックダウンにより DNA end-resection が有意に減弱していた (図 3B)。

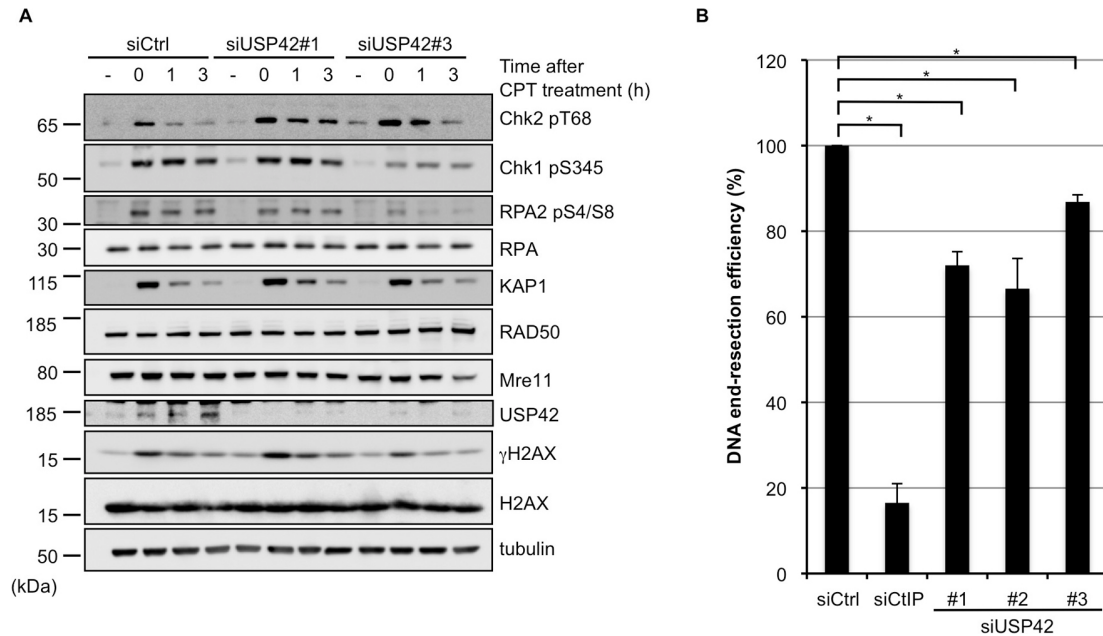


図 3. USP42 は DNA end-resection に機能する

U2OS 細胞に図中に示した siRNA をトランスフェクションし、CPT (1 μ M) 処理後、イムノプロットング (A) あるいは、DNA end-resection アッセイ (B) を行った。エラーバーは標準誤差を示す (n = 3)。*:p < 0.005, Student's t-test.

3. USP42 の発現は細胞周期依存的に制御される

HR は修復過程で姉妹染色分体を DNA 複製の鋳型として必要とする為、細胞周期の S 期及び、G2 期のみに機能する修復経路である。これまでに BRCA1 や CtIP 等の HR タンパク質の発現が S 期及び、G2 期に高く、G1 期に低下する細胞周期依存的な制御を受けることが報告されており⁷⁾、この発現制御が HR の細胞周期特異的な機能の発揮に寄与していると考えられている。そこで、USP42 の発現も細胞周期によって制御されているかを検討した。U2OS 細胞をダブルチミジンブロック法により G1/S 期境界に同調し、チミジン除去後経時的にサンプルを調製した。イムノプロットングにより USP42 の発現を検討したところ、USP42 の発現は S 期後期から G2 期にかけて最も高く、G1 期には低下していた (図 4A、B)。さらに同様の手法でサンプルを調製し、qRT-PCR により USP42 の mRNA 量の変化を検討したところ、タンパク質量の変動と一致して S 期後期から G2 期にかけて USP42 の mRNA 量の増加が認められた (図 4C)。

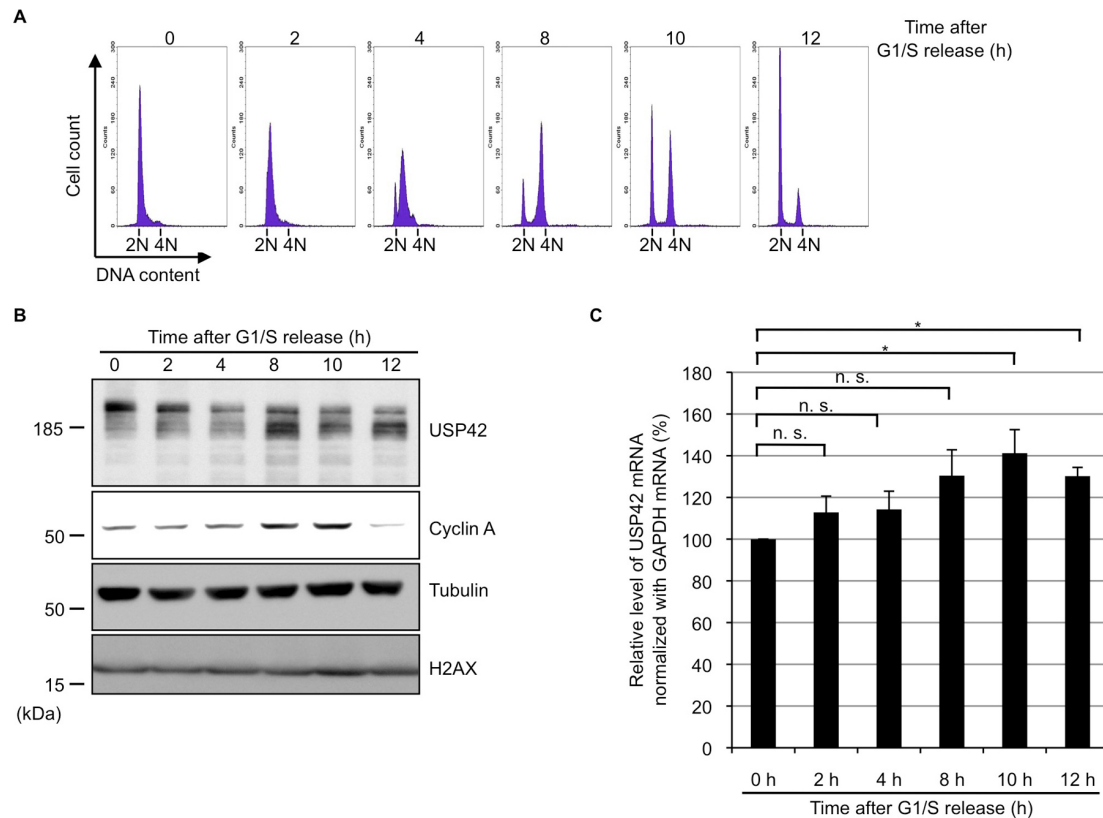


図 4. USP42 の発現は細胞周期依存的な制御を受ける

G1/S 期境界に細胞周期を同調後に細胞周期を flow cytometry (A)、USP42 のタンパク質発現をイムノブロットィング (B)、あるいは USP42 の mRNA の発現を qRT-PCR (C) により其々解析した。エラーバーは標準誤差を示す ($n = 3$)。*: $p < 0.05$, Student's t-test, n.s.: not significant.

考 察

我々の研究により、USP42 が HR 及び、その初期反応である DNA end-resection に促進的に機能し、S 期後期から G2 期にかけて高発現を示す細胞周期依存的な発現制御を受けることが示された。これらの結果から、USP42 は新規の HR 因子である可能性が示唆された。分子機構の点からは、USP42 が HR の開始に必須の因子である MRN 複合体と相互作用を示したことから、MRN 複合体の機能が USP42 によって制御される可能性が考えられる。DSB の発生に应答して、MRN 複合体のうち NBS1 は SKP2-SCF ユビキチン E3 リガーゼ及び、RNF8 によりユビキチン化を受け、これらのユビキチン化が ATM キナーゼの活性化、HR 及び、NBS1 の DSB 部位への保持に其々重要であることが報告されている^{8,9)}。従って、脱ユビキチン化酵素である USP42 がこれらのユビキチン化に対して拮抗することにより機能しているかの検討が今後の課題であると考えられる。これに加えて、USP42 はヒストン H2B の 120 番目のリジン残基を脱ユビキチン化し、転写を促進することが報告されており¹⁰⁾、USP42 は転写の促進を介して HR に寄与する可能性がある。特に USP42 は転写が活発なゲノム領域の近傍に存在する nuclear speckle に局在することから、USP42 はゲノム領域特異的な HR による DSB 修復の促進あるいは、DSB 修復経路の選択に関与しているかもしれない。この仮説と一致して、予備的なデータではあるが USP42 のノックダウンにより NHEJ を促進する因子である 53BP1 の foci が巨大化するデータを得ており、今後 USP42 と 53BP1 による DSB 修復経路選択の可能性について検討する予定である。本研究により、nuclear speckle 因子の DNA 修復への関与が明らかにされたが、その分子機構には未解明な点が多い。今後はより詳細な USP42 のドメイン解析を進めることに加えて、転写制御と DSB 修復のクロストークを検討する予定である。

共同研究者

本研究の共同研究者は Gurdon Institute, University of Cambridge の Stephen P. Jackson 教授、立命館大学大学院生命科学研究科の松井美咲、木村祐輔、立命館大学生命科学部生命医科学科の堀利行教授である。最後に、本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Spector DL, Lamond AI. Nuclear speckles. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(2). doi: 10.1101/cshperspect.a000646. PubMed PMID: 20926517; PubMed Central PMCID: PMC3039535.
- 2) Aymard F, Bugler B, Schmidt CK, Guillou E, Caron P, Briois S, et al. Transcriptionally active chromatin recruits homologous recombination at DNA double-strand breaks. *Nat Struct Mol Biol.* 2014;21(4):366-74. doi: 10.1038/nsmb.2796. PubMed PMID: 24658350; PubMed Central PMCID: PMC3039535.
- 3) Shanbhag NM, Rafalska-Metcalf IU, Balane-Bolivar C, Janicki SM, Greenberg RA. ATM-dependent chromatin changes silence transcription in cis to DNA double-strand breaks. *Cell.* 2010;141(6):970-81. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.038. PubMed PMID: 20550933; PubMed Central PMCID: PMC2920610.
- 4) Nishi R, Wijnhoven P, le Sage C, Tjeertes J, Galanty Y, Forment JV, et al. Systematic characterization of deubiquitylating enzymes for roles in maintaining genome integrity. *Nat Cell Biol.* 2014;16(10):1016-26. doi: 10.1038/ncb3028. PubMed PMID: 25194926; PubMed Central PMCID: PMC4183562.
- 5) Pierce AJ, Hu P, Han M, Ellis N, Jasin M. Ku DNA end-binding protein modulates homologous repair of double-strand breaks in mammalian cells. *Genes Dev.* 2001;15(24):3237-42. doi: 10.1101/gad.946401. PubMed PMID: 11751629; PubMed Central PMCID: PMC312854.
- 6) Gravel S, Chapman JR, Magill C, Jackson SP. DNA helicases Sgs1 and BLM promote DNA double-strand break resection. *Genes Dev.* 2008;22(20):2767-72. doi: 10.1101/gad.503108. PubMed PMID: 18923075; PubMed Central PMCID: PMC2569880.
- 7) Lafranchi L, de Boer HR, de Vries EG, Ong SE, Sartori AA, van Vugt MA. APC/C(Cdh1) controls CtIP stability during the cell cycle and in response to DNA damage. *EMBO J.* 2014;33(23):2860-79. doi: 10.15252/emboj.201489017. PubMed PMID: 25349192; PubMed Central PMCID: PMC4282561.
- 8) Wu J, Zhang X, Zhang L, Wu CY, Rezaeian AH, Chan CH, et al. Skp2 E3 ligase integrates ATM activation and homologous recombination repair by ubiquitinating NBS1. *Mol Cell.* 2012;46(3):351-61. doi: 10.1016/j.molcel.2012.02.018. PubMed PMID: 22464731; PubMed Central PMCID: PMC3518281.
- 9) Lu CS, Truong LN, Aslanian A, Shi LZ, Li Y, Hwang PY, et al. The RING finger protein RNF8 ubiquitinates Nbs1 to promote DNA double-strand break repair by homologous recombination. *J Biol Chem.* 2012;287(52):43984-94. doi: 10.1074/jbc.M112.421545. PubMed PMID: 23115235; PubMed Central PMCID: PMC3527981.
- 10) Hock AK, Vigneron AM, Vousden KH. Ubiquitin-specific peptidase 42 (USP42) functions to deubiquitylate histones and regulate transcriptional activity. *J Biol Chem.* 2014;289(50):34862-70. doi: 10.1074/jbc.M114.589267. PubMed PMID: 25336640; PubMed Central PMCID: PMC4263885.