

Title	Fine-Tuning of DNA Damage-Dependent Ubiquitination by OTUB2 Supports the DNA Repair Pathway Choice
Author(s)	中嶋, 一裕
Citation	大阪大学, 2017, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/61555
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について＜/a> をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中嶋 一裕
論文題名 Title	Fine-Tuning of DNA Damage-Dependent Ubiquitination by OTUB2 Supports the DNA Repair Pathway Choice (適切なDNA修復経路の選択にはOTUB2によるDNA損傷依存性ユビキチン化の抑制が必要である)
論文内容の要旨 〔目 的(Purpose)〕 DNA2本鎖切断(DSB)応答では、ユビキチン化によるシグナル伝達が行われる。DSB部位では、ヒストンリン酸化から始まるシグナリングによってまずE3ユビキチンリガーゼRNF8がリクルートされる。RNF8が形成するK63ポリユビキチン鎖にはE3ユビキチンリガーゼRNF168が結合し、DSB部位におけるユビキチン化を促進する。これに続いて、53BP1などのDNA修復制御因子が集積する。このようなユビキチン依存性シグナリングは、脱ユビキチン化によって抑制される。所属研究室では、脱ユビキチン化酵素であるOTUB1とOTUB2が53BP1のDSB部位への集積を抑制することを発見していた。OTUB1はN末端に存在するアミノ酸配列を介してE2ユビキチン結合酵素に結合し、ユビキチン化反応を抑制する。OTUB2はOTUB1に最も近いパラログだが、OTUB1のN末端アミノ酸配列と相同性のある配列を有していない。このことから、OTUB2はOTUB1と異なる機構で53BP1リクルートを抑制すると予想した。そこで、OTUB2によるユビキチン依存性シグナリングの抑制機構とDNA修復制御機構について研究を行った。 〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕 ①OTUB2は脱ユビキチン化によってDSB応答シグナリングを抑制する 53BP1には、ユビキチン化ヒストンH2Aとの結合部位とジメチルヒストンH4との結合部位が存在する。53BP1がDSB部位に集積するには、1)RNF168によりヒストンH2Aがユビキチン化されることと 2)ジメチルヒストンH4結合分子のL3MBTL1がRNF8によりユビキチン化されることでクロマチンから排除され、ジメチルヒストンH4が露出することが必要である。そこで、OTUB2がこれら2つのユビキチン化を抑制するかを検討した。まず、ネオカルチノスタチンを用いてDSBを発生させたU2OS細胞の蛍光免疫染色を行い、DNA修復制御因子の集積を解析した。OTUB2を過剰発現させたところ、RNF8は正常にDSB部位へと集積したがRNF168の集積は抑制された。<i>In vitro</i>の実験では、RNF168のリクルートに必要なK63ポリユビキチン鎖をOTUB2が切断することが確認された。次に<i>in vivo</i>および<i>in vitro</i>の脱ユビキチン化アッセイを行ったところ、OTUB2がL3MBTL1を脱ユビキチン化することが示された。以上の結果から、OTUB2は脱ユビキチン化によって 1)RNF168のDSB部位への集積と 2)L3MBTL1のクロマチンからの排除を抑制していると考えられた。 ②OTUB2によるDNA修復制御因子の局在制御は修復経路選択に影響を与える OTUB2ノックダウン細胞でのDNA修復制御因子の集積を解析したところ、DSB部位でのユビキチン化や53BP1の集積が急速に進行することが示された。このことから、OTUB2がDSB発生直後に起こる応答を制御していると考えられた。53BP1はDSBの修復経路選択に関わっており、相同組換え(HR)による修復を抑制して非相同末端結合(NHEJ)による修復を促進する。そこで、OTUB2ノックダウン細胞におけるDNA修復効率を測定した。DR-GFPアッセイでHR効率を測定したところ、OTUB2ノックダウンによりHR効率は低下した。一方で、DNA損傷のマーカーであるリン酸化ヒストンH2AXの蛍光免疫染色によりDSB量を測定したところ、全体的なDSB修復はOTUB2ノックダウンにより促進されていた。また、OTUB2ノックダウン細胞はHRでの修復が必須であるカンプトテシン誘導性のDSBに対して高感受性であったが、HR、NHEJのどちらでも修復可能なネオカルチノスタチン誘導性のDSBに対してはコントロール細胞と同等の抵抗性を示した。以上よりOTUB2ノックダウン細胞では、主にHR以外の修復経路によりDSB修復が行われていると考えられた。 〔総 括(Conclusion)〕 本研究により、DSB部位での過剰なユビキチン化をOTUB2が抑制することでHRが誘導されることが示された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名)		中嶋 一裕	
論文審査担当者	(職)	氏	名
	主 査	大阪大学准教授	中田 慎一郎
	副 査	大阪大学教授	藤堂 剛
	副 査	大阪大学教授	南 池 章

論文審査の結果の要旨

DNA2 本鎖切断 (DSB) 部位では、E3 ユビキチンリガーゼ RNF8・RNF168 依存的なユビキチン化が行われ、非相同末端結合による DNA 修復が誘導される。過剰なユビキチン化は他の DNA 修復経路の選択を困難にするため、脱ユビキチン化による抑制的な制御機構が存在すると予想された。本研究では、DSB 応答初期に機能する脱ユビキチン化酵素の候補として挙げられた OTUB2 の機能解析が行なわれた。

- 1) OTUB2 は RNF8-UBC13 が産生する Lys 63-linked ユビキチン鎖を切断する
- 2) OTUB2 は RNF8 によりユビキチン化された L3MBTL1 を脱ユビキチン化する
- 3) 上記の機能により、OTUB2 は RNF168 およびその下流因子 53BP1 の DSB への過剰集積を抑制し、相同組換えによる DNA 修復を促進する

ことなどが解明された。ユビキチン依存性の DNA 損傷応答の精密制御により DNA 修復が制御されることを初めて示した研究であり、本論文は博士(医学)の学位授与に値するものと認める。