



UV damage-induced phosphorylation of HBO1 triggers CRL4DDB2-mediated degradation to regulate cell proliferation

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 浜松医科大学 公開日: 2016-08-20 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 松沼, 亮一 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/3039

博士(医学) 松沼 亮一

論文題目

UV damage-induced phosphorylation of HBO1 triggers CRL4^{DDB2}-mediated degradation to regulate cell proliferation

(紫外線損傷により誘導される HBO1 のリン酸化は CRL4^{DDB2} による分解のトリガーとなり細胞増殖を調整する)

論文の内容の要旨

[はじめに]

Histone acetyltransferase Binding to ORC-1 (HBO1)は複製起点での複製前複合体 (Pre-RC)の形成に重要なヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)である。Pre-RC 形成は、DNA 複製においてヘリカーゼとして機能する MCM 2-7 複合体がローディングすることで完了する。CDT1 によって複製起点にリクルートされた HBO1 はヒストン H4 をアセチル化し、クロマチン構造を弛緩させることで、MCM 複合体の複製起点へのローディングを容易にする。HBO1 は無ストレス下では細胞増殖を促進する役割を果たすが、DNA 損傷下では HBO1 の細胞増殖を規制するメカニズムがあるかどうかは十分には理解されていない。この研究では、HBO1 が DNA 損傷後に ATM/ATR 依存的に E3 リガーゼである CRL4^{DDB2} によってユビキチン化され、プロテアソームにより分解されることにより細胞増殖を抑制していることを示した。

[材料と方法]

細胞株には HeLa 細胞と HEK293 細胞を用いた。HBO1 と DDB2 のノックダウンは HeLa 細胞から樹立し、HBO1 ノックダウン細胞から野生型 HBO1 と変異型 HBO1 のトランスジェニック細胞を樹立した。ウェスタンブロット法と免疫沈降反応で HBO1 のユビキチン化分解を検討した。細胞周期は FACS で解析し、DNA 損傷修復の検討はコメットアッセイを行い、アポトーシスアッセイは Annexin V を測定した。

[結果]

HBO1 は DNA 損傷によってユビキチン・プロテオソーム系の分解が促進された。この分解はセリン 50(S50)とセリン 53(S53)のアラニン(A)変異体では抑制された。これらのセリンは ATM/ATR によってリン酸化が促されることも確認できた。以上より、DNA 損傷によって ATM/ATR 依存的に HBO1 の S50/S53 がリン酸化され、ユビキチン化分解が促進されることが示された。

HBO1 に対する E3 リガーゼの検討では、CUL4 のノックダウンで HBO1 のユビキチン化が抑制された。CUL4 を含む E3 リガーゼの基質結合部位として DDB2 を過剰発現させることで HBO1 のユビキチン化が促進され、DDB2 ノックダウンにより UV 依存的な HBO1 の分解が抑制された。HBO1 と DDB2 との結合も認められ、HBO1 をユビキチン化する E3 リガーゼは CRL4^{DDB2} と同定した。HBO1 の S50/S53A 変異体では DDB2 との結合は抑制されたため、DNA 損傷下でのユビキチン化には S50/S53 のリン酸化が

必要ということも示唆された。

HBO1 の S50/53 のリン酸化と DNA 損傷後の細胞増殖の関係を検討したところ、S50/53A 変異型は野生型よりも増殖した。ヒストンのアセチル化レベルはヒストン H3K14 では UV 照射後 24 時間は S50/53A 変異型、野生型とも減少したが、48 時間では HBO1 のタンパク量とアセチル化レベルが相関し変異型のほうが高かった。ヒストン H4 のアセチル化レベルに両者の違いはどの時点でも認められなかった。DNA 損傷修復を検討したところ S50/53A 変異型の修復に遅延が認められた。FACS による細胞周期の検討では S50/53A 変異型において UV 照射後 G1 期から S 期に移行する細胞が野生型よりも有意に増加していた。UV 照射後のアポトーシス細胞は S50/53A 変異型のほうが野生型よりも有意に出現していた。

[考察]

DNA 損傷後の細胞増殖はチェックポイントを含む多様な制御機構によってコントロールされている。HBO1 の S50 と S53 は IR 照射後に ATM/ATR によりリン酸化される部位であることは示されていたが、他の DNA 損傷ストレスによりリン酸化されるか、またその生物学的意義については明らかにされていなかった。

本研究では UV を含む様々な DNA 損傷ストレスにより ATM/ATR 依存的に HBO1 の S50 と S53 がリン酸化され、CRL4^{DDB2} による HBO1 のユビキチン化が促進し分解へと進むことが示された。細胞周期では UV 照射後 S50/53A 変異型は野生型よりも S 期に移行した。これは UV 照射に抵抗性でユビキチン化されない S50/53A 変異体が MCM 複合体の複製起点へのローディングを促進していることを示唆する。

ヌクレオソームのヒストンアセチル化に関しては、ヒストン H4 のアセチル化レベルは S50/53A 変異型と野生型間で違いは認められなかった。一方ヒストン H3K14 アセチル化レベルは UV 後 24 時間では両者とも同じように減少したが、48 時間では S50/53A 変異型のアセチル化レベルは回復した。これは UV 照射後 24 時間ではヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)が S50/53A 変異型および野生型細胞内でも活性化したことが、48 時間では HDAC の活性化は終了し、HBO1 のタンパク量とアセチル化レベルが相関する結果になったことを示しているのかもしれない。

CRL4^{DDB2} はヌクレオチド除去修復(NER)において XPC をユビキチン化することが知られている。我々の結果では HBO1 は UV 照射後、速やかにリン酸化され DDB2 との複合体を形成するが、ユビキチン化されるまでに約 2 時間を要した。このため UV 照射後、HBO1 は DDB2 とともに損傷部位にリクルートされ、近傍のヒストンのアセチル化を促進しクロマチン構造を変化させることが可能だろう。これは修復関連タンパクが機能しやすい環境を作り上げることに寄与するかもしれない。このため HBO1 は NER 経路に関与するという仮説が考えられる。

[結論]

HBO1 は UV 照射による DNA 損傷後に ATM/ATR 依存的に S50/53 がリン酸化される。このリン酸化は E3 リガーゼである CRL4^{DDB2} との結合を促しユビキチン化を促進

し、HBO1の分解へと導く。HBO1の分解はヒストンH3K14の低アセチル化を維持することで細胞増殖を抑制し、DNA修復を促進する。このようにして細胞の恒常性維持に関わっていると考えられる。