

令和元年6月9日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04625

研究課題名(和文)核内アクチンファミリーのゲノム安定性維持への寄与解明と結合ペプチドによる機能操作

研究課題名(英文) Analysis of roles of nuclear actin family in the maintenance of genome stability and operation of their functions using peptides

研究代表者

原田 昌彦 (Harata, Masahiko)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：70218642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母のArp4の変異体の解析により、細胞核内のアクチンファミリーが、クロマチンリモデリング複合体の構成因子として、DNA損傷修復のエピジェネティック制御に関与することを示した。また、核内アクチンファミリーに結合する二重環状ペプチドのスクリーニングにより、単量体アクチン(G-actin)および重合アクチン(F-actin)、さらに核内アクチン関連タンパク質Arp5、Arp8に高親和結合する二重環状ペプチドを取得した。さらにこれらを生細胞内に導入することで、これらの核内アクチンファミリーの機能解析と操作を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロマチン・細胞核によるゲノム機能制御は「エピジェネティクス」とよばれ、発生・分化・老化・疾病などの高次生命現象と密接に関連しており、またエピジェネティクス機構の破綻はガンなどの疾病を引き起こすことから、その解明が急がれている。本研究において、細胞核内のアクチンファミリーのエピジェネティック制御への関与の一端が明らかとなり、またその操作の可能性が示されたことは、エピジェネティック制御機構の解明や応用に貢献する。最近では、農畜水産物の生産や育種や、食品機能性評価にエピジェネティクスを応用することも進んでおり、将来的な農学分野への本研究成果の応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：By using mutants of the nuclear actin-related protein Arp4, we showed that the nuclear actin family member plays important roles in epigenetic regulation of DNA damage repair. Then, we obtained bicyclic peptides binding to G-actin, F-actin, Arp5, and Arp8. We successfully introduced these bicyclic peptides into living cells and analyzed functions of these actin family members in living cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：アクチンファミリー 細胞核 クロマチン 遺伝子機能

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷に伴うゲノム不安定化は、細胞のがん化の引き金となり、またがん化の促進にも関わる。DNA 損傷の中でも二重鎖 DNA 切断(double-strand break; DSB)は最も危険性が高く、染色体異常や遺伝情報の欠失などを引き起こす。現実には、放射線による DSB による発癌リスクの上昇が懸念されている。しかし、DNA 損傷修復機構には不明な点が多く、そのため分子レベルでの解明が急がれていた。DNA は細胞核内で、ヒストンなどと結合したクロマチンを形成して収納されており、DNA 修復にあたってはクロマチン構造を弛緩させる必要があることが知られていた。このようなゲノム不安定に加えて、がんおよび他の悪性疾患の特徴として挙げられるのが、エピジェネティックな遺伝子発現パターンの変化である。DNA とヒストンを中心とした複合体であるクロマチンが遺伝子発現制御に関わることが知られているが、このエピジェネティックと呼ばれるクロマチン構造の変化に起因した遺伝子発現変化が、悪性疾患に結びついている。このクロマチン構造の変化は、クロマチン構造を変換する複合体(クロマチンリモデラー)によって制御されている。クロマチンリモデラーの構成因子の多くが、がん遺伝子やがん抑制遺伝子産物として同定されていることは興味深い。DSB 損傷修復においても、クロマチン構造変化が重要な役割を果たしている。

さらに、転写、複製、修復などの様々なゲノム機能は、細胞核の様々な内部構造と結びついて起っていることが知られていた。例えば、DNA 損傷修復においては、DSB、あるいは短小化した染色体末端テロメアが核周辺部の核膜近傍に移動することが観察されており、その場で不適切な組み換え(転座)が抑制され、適切な修復が行われることが示されていた。

このように、クロマチンの構造や核内空間配置を制御する機構が DNA 修復には必要であるが、その解明は遅れていた。特に、クロマチンを核内で移動させる分子機構については、クロマチンの動きが細胞内の ATP 濃度によって影響されることから、何かしらの ATP 加水分解酵素がこの動きに関わると推測されていたが、分子機構は不明のままであった。しかし我々は、海外研究協力者 Susan Gasser との共同研究により、クロマチンリモデラーが、クロマチン構造の変換に加えて、クロマチンの核内空間配置にも寄与することを見出していた(Horigome et al., *Mol Cell*, 2014)。

我々は、このクロマチン構造形成や核内移動性に関わるクロマチンリモデラーの特徴として、その多くがアクチン関連タンパク質(actin-related protein; 以下 Arp と略称)を複合体中に含んでいることに注目した。Arp は、アクチンに進化的・構造的に関連性を有する一群のタンパク質であり、アクチンと共にアクチンファミリーを形成する。Arp のサブファミリー(Arp1 ~ Arp10)は、当初、細胞質で機能すると考えられていた。しかし申請者は Arp4, 5, 6, 7, 8, 9 が細胞核に局在して機能していることを世界で初めて明らかにした(*PNAS*, 1994; *Mol Biol Cell*, 1995)。また、転写制御や DNA 修復におけるこれらの核内 Arp の重要性を明らかにした(*Mol Biol Cell*, 1999; *Nucl Acids Res*, 2002, 2004, 2007)。さらに、核内 Arp が DNA 損傷修復などを介してゲノム安定性維持にも重要な役割を果たすことを見出していた(*Curr Biol*, 2008; *Nucl Acids Res*, 2010)。さらに、研究分担者・太田と共同で、Arp が細胞核内でのクロマチン空間配置にも重要な役割を果たすことを見出した(*PLoS Genet*, 2010; *Nucleus*, 2011)。特筆すべき点として、これらの Arp の構造や機能が、酵母から脊椎動物まで進化的に保存されていることが挙げられ、この特徴は、出芽酵母などのモデル系での実験結果をヒトなどに応用する上での大きな利点となる。

さらに、核内アクチンが、ゲノム修復のエピジェネティック制御に関与することを示した。この研究は、海外研究協力者である Prof. Susan Gasser との共同研究および単独の研究によって、広く世界に受け入れられるようになった(Shimada et al., *Cell*, 2012; Horigome et al., *Mol Cell*, 2014; Osakabe et al., *PLoS One*, 2014)。また我々は、核内のアクチンおよび Arp の機能を人為的に制御するための基盤を開発してきた。

遺伝子発現のエピジェネティック制御についての研究の進展が著しいが、DNA 修復・ゲノム安定性維持におけるエピジェネティック制御の研究は始まったばかりであり、解析の実験系も十分には確立されていない。本研究では、Arp の解析によって、DNA 修復におけるエピジェネティック制御機構の解明を目指すことに特徴がある。また、DNA 修復や遺伝子発現に重要なクロマチンリモデラーの機能を制御する化合物はこれまでに報告がないが、Arp に結合する化合物の同定により、エピジェネティック研究の重要なツールが得られるばかりでなく、ゲノム不安定性の異常によって引き起こされる疾病の治療薬の開発につながることを期待される。さらにこの化合物によって、遺伝子発現のエピジェネティック制御を人為的に調節することで、細胞の脱分化・再分化のコントロールを介した再生医療などへの応用展開も可能となる。

### 2. 研究の目的

(1) DNA 修復に必要なクロマチン・細胞核機能構造形成への Arp の役割を明らかにする。Arp が様々なクロマチンリモデラーの機能を制御していることが示されている。DNA 修復を効率的かつ安全に進行させるためには、特徴的なクロマチンや細胞核機能構造が形成されることが必要であり、このような DNA 修復のエピジェネティック制御に Arp がどのように関与するかを明らかにする。

(2) Arp に結合してエピジェネティック制御に影響を与える化合物を検索し、その解析によって

創薬への応用展開を図る。アクチンに結合する化合物やその類似体の研究が広く行われている。Arp とアクチンの立体構造が類似していることから、これらの化合物には Arp に結合するものも含まれると予想される。Arp に結合することでクロマチンリモデラーの機能に影響を与える化合物を同定し、がんや悪性疾患治療、再生医療における今後の創薬の基礎とする。

### 3. 研究の方法

(1) DNA 修復に必要なクロマチン・細胞核機能構造形成への Arp の関与：ARP 遺伝子を破壊した酵母株・ヒト培養細胞を利用し（既に樹立済）DNA 損傷部位のクロマチン構造や核内空間配置を解析する。

(2) Arp によるエピジェネティクス制御機能に影響を与える化合物の検索と解析：アクチンと Arp の立体構造の保存性を利用し、Arp に結合する化合物を検索し、DNA 修復や遺伝子発現におけるエピジェネティック制御に対する効果を解析する。

### 4. 研究成果

DNA 損傷を正確・かつ速やかに修復することは、ゲノムの安定性維持において極めて重要であり、その破綻は細胞のがん化などにつながる。クロマチン構造および核構造を介したエピジェネティックな機構が、DNA 損傷の制御に関わっている。我々は、細胞核内のアクチンファミリーがこの DNA 損傷のエピジェネティック制御に関与することを見出してきた。これらは、クロマチンリモデリング複合体の構成因子として、また細胞核の骨格タンパク質として機能すると考えられる。そこで本研究では、次世代の人工抗体として注目されている二重環状ペプチドに注目し、核内アクチンファミリーに結合する二重環状ペプチドのスクリーニングおよび、それをういた機能解析を行なった。単量体アクチン (G-actin) および重合アクチン (F-actin) をスクリーニングにより、これらのアクチンに対する二重環状ペプチドの候補が得られた。また、Arp5, Arp8 などを用いたスクリーニングによって、これらの Arp に結合する二重環状ペプチドの候補も取得できた。これらを生きた培養細胞中に導入することを試みた。試薬による導入、電気穿孔法などによる導入を検討し、後者を用いて効率的な導入が行なえることを明らかにした。アクチンファミリーに結合する bicyclic peptide を生細胞に導入し、細胞内で bicyclic peptide が細胞内でアクチンファミリーに結合することを免疫沈降によって明らかにした。さらに、これらのアクチンファミリーを含む INO80 クロマチンリモデリング複合体の活性が、bicyclic peptide によって抑制されることを示した。さらに、これらの二重環状ペプチドを導入した細胞の表現形を観察することにより、これらの二重環状ペプチドが細胞の中においても、ターゲットタンパク質に結合し、ターゲットタンパク質の機能を抑制していることを明らかにした。今後、さらに二重環状ペプチドの評価を続ける。

また我々は、細胞核内のアクチンファミリーが、クロマチンリモデリング複合体の構成因子として、細胞核構造を構築する分子として、DNA 損傷修復のエピジェネティック制御に関与することを示した。まず、ATP 結合部位に変異を導入した Arp4 を酵母細胞中で発現することにより、INO80 クロマチンリモデリング複合体の機能に変化が生じることを示した。また、核移行シグナルを付加したアクチンを培養細胞で発現させた際に、細胞核内にアクチン繊維が形成されると共に、DNA 損傷修復能や gamma-H2AX の核内局在に変化が生じることを示した。また、核内のアクチン繊維形成を人為的に抑制することにより、ゲノムの不安定化が誘導されることを見出した。これらの結果は、アクチンや Arp4 などの核内のアクチンファミリーが、クロマチン機能制御や細胞核の機能構造形成を介して、ゲノムの安定性に寄与することを示唆するものであり、今後さらにこの実験系を用いた解析を進める。これらの研究により、核内に存在するアクチンファミリーがゲノム安定性維持に関与する分子機構の一端を明らかにした。

### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Yamazaki S\*, Harata M\*, Idehara T, Konagaya K, Yokoyama G, Hoshina H, Ogawa Y\* (\*corresponding authors), Actin polymerization is activated by terahertz irradiation. Scientific Reports 8, 9990 (2018), 10.1038/s41598-018-28245-9 (査読有)

Pünzeler S, Link S, Wagner G, Keilhauer EC, Kronbeck N, Spitzer RM, Leidescher S, Markaki Y, Mentele E, Regnard C, Schneider K, Takahashi D, Kusakabe M, Vardabasso C, Zink LM, Straub T, Bernstein E, Harata M, Leonhardt H, Mann M, Rupp RA, Hake SB\*, Multivalent binding of PWWP2A to H2A.Z regulates mitosis and neural crest differentiation. EMBO Journal, 36, 2263-2279 (2017), 10.15252/embj.201695757 (査読有)

Yamazaki S, Yamamoto K, de Lanerolle P, Harata M\*, Nuclear F-actin enhances the transcriptional activity of  $\beta$ -catenin by increasing its nuclear localization and binding to chromatin. *Histochemistry and Cell Biology*, 145, 389-399 (2016), 10.1007/s00418-016-1416-9 (査読有)

Kusakabe M, Oku H, Matsuda R, Hori T, Muto A, Igarashi K, Fukagawa T, Harata M\*, Genetic complementation analysis showed distinct contributions of the N-terminal tail of H2A.Z to epigenetic regulations. *Genes to Cells*, 21, 122-135 (2016), 10.1111/gtc.12327 (査読有)

Kitamura H, Matsumori H, Kalendova A, Hozak P, Goldberg IG, Nakao M, Saitoh N, Harata M\*, The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 464, 554-560 (2015), 10.1016/j.bbrc.2015.07.005 (査読有)

〔学会発表〕(計 126 件)

Harata M., Functional Interactions between actin, ARPs and chromatin, ASCB-EMBO 2018 Meeting, San Diego (USA), Dec 8 (2018)

Harata M., Cross-talk of histone and actin families affect chromosome dynamics in mitotic and interphase cells, 22nd International Chromosome Conference, Prague (Czech), September 2 (2018)

Modulating gene functions for immunity and susceptibility to diseases: Towards epigenetic control of innate immunity, Harata M., Lorentz Center Workshop “Innate Immunity of Crops, Livestock and Fish: The Dawn of Agricultural Immunology”, Leiden (Netherlands), September 19 (2016)

〔図書〕(計 3 件)

原田昌彦、遺伝子の機能解析における放射光利用 - クロマチン構造から農学への応用まで -、放射光利用の手引き - 農水産・医療、エネルギー、環境、材料開発分野などへの応用 - p13-p19、アグネ技術センター (2019)

原田昌彦、ゲノム第4版 (GENOME Fourth Edition) 第7章 p159-p185、メディカル・サイエンス・インターナショナル (2018)

原田昌彦、アクチンファミリーによるクロマチン・細胞核機能の制御、ナノバイオ・メディシン 宇理須恒雄編 p61-p72、近代科学社 (2017)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.harata-lab.org/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：太田 邦史

ローマ字氏名：(OHTA, kunihiro)

所属研究機関名：東京大学

部局名：総合文化研究科

職名：教授

研究者番号 (8 桁)：90211789

(2)研究協力者

研究協力者氏名：田代 聡

ローマ字氏名：(TASHIRO, satoshi)

研究協力者氏名：清田 洋正

ローマ字氏名：(KIYOTA, hiromasa)

研究協力者氏名：Susan M. Gasser

ローマ字氏名：(Susan M. Gasser)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。