

令和 2 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H01875

研究課題名(和文) 損傷クロマチンを制御するアセチル化を介したNAD代謝ネットワークの解明

研究課題名(英文) The role of acetylation-dependent nuclear NAD metabolism in damaged chromatin dynamics

研究代表者

井倉 毅 (Ikura, Tsuyoshi)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：70335686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、TIP60によるH2AXのアセチル化が如何なるメカニズムでPARP-1のポリADPリボシル化酵素活性を高めるのかについて検討した。H2AX複合体の精製によって同定したNAD合成酵素NADS1は、TIP60によるH2AXのアセチル化によってDNA損傷部位に誘導される。さらにこの細胞核内のNADS1は、NADの産生を介してPARP-1のDNA損傷領域でのダイナミクスを制御する。またNADS1のノックダウン細胞では、DNA損傷後の相同組換え修復が抑制されることが示され、NADS1がPARP-1を介したゲノムストレス応答シグナルの活性化に関与していることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題により細胞核内のde novo NAD産生系がゲノムストレス損傷応答に関与することが明らかになった。これまでNAD産生系は、細胞質にのみ存在すると考えられていたが、今回の発見は、NAD代謝系とTIP60によるH2AXのアセチル化によるH2AXの交換反応が細胞核内で密接に連携していることを示しており、クロマチン制御に対しての新たな視点を提供でき、学術的に意義深い。また本研究は、エネルギー代謝との関連から将来的には生活習慣病、老化シグナルについてクロマチン制御を介したゲノムストレス応答研究の視点からのアプローチが可能となり、社会的貢献度の高い研究としての発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have previously shown that the acetylation of histone H2AX by TIP60 is required for the ADP ribosylation activity of PARP-1 for H2AX exchange at DNA damage sites. However, it remains unknown how the acetylation of H2AX by TIP60 activates the ADP ribosylation activity of PARP-1. In this time, we identified NAD synthetase 1 (NADS1), which is responsible for de novo NAD production, in the purified H2AX complex. Chromatin immunoprecipitation analysis revealed that the acetylation of H2AX by TIP60 is required for the accumulation of NADS1 at DNA damage sites. When NADS1 mutant, which lacks its enzymatic activity, was overexpressed in only cell nucleus, dynamic binding of PARP-1 to damaged chromatin was reduced. It suggests that the NADS1 contributes to local production of NAD for PARP-1 dynamics at DNA damage sites. The depletion of NADS1 in cells failed to homologous recombination repair. Our results indicate the importance of nuclear NADS1 in damaged chromatin dynamics.

研究分野：放射線生物学

キーワード：TIP60 NAD代謝 H2AX アセチル化

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線によるゲノム損傷応答の研究は、蛋白質複合体のプロテオミクス解析などの網羅的な解析手法の発展に伴い、DNA 修復、転写、複製、組換え反応間の連携や代謝反応との連携が、浮き彫りになってきた。さらに真核生物の DNA の特徴であるクロマチンに着目したゲノム損傷応答シグナルの研究により、それら連携によってクロマチンを介した蛋白質ネットワークが形成されることが明らかになっている。我々は、TIP60 アセチル化酵素複合体によってアセチル化されたヒストン H2AX が、損傷クロマチン領域からシグナル因子のように放出され、ストレス応答関連因子、クロマチン構造変換因子などと複合体を形成しながら損傷部位に取り込まれること(H2AX 交換反応)を見出し、ヒストンが、単なるバリアーではなく、active player として積極的に DNA 代謝反応に関与することを提示した。

最近、我々は、TIP60 と共に H2AX の交換反応に関与する因子としてポリ ADP リボシル化酵素 PARP-1 を同定し、TIP60 による H2AX のアセチル化は、PARP-1 のポリ ADP リボシル化酵素活性を高め、H2AX の交換反応を介して損傷領域のヒストンのアセチル化が亢進することを見出している(*Mol. Cell. Biol.* 2016)。しかしながら TIP60 による H2AX のアセチル化が如何なるメカニズムで PARP-1 のポリ ADP リボシル化酵素活性を高め、ゲノムストレス応答シグナルに貢献するのかについて未だ明らかにされていない。

これまでに我々は、クロマチン転写におけるヒストンアセチル化酵素複合体やヒストンメチル化酵素複合体の研究から、アセチル化酵素の基質であるアセチル CoA やメチル化酵素の基質である SAM の合成酵素が、クロマチン上に局在する、地産地消の仕組みが存在することを見出し、これら代謝システムが、クロマチン転写制御機構に積極的に関わることを報告した(*Mol. Cell.*, 2011., *NAR*, 2015)。そこで我々は、損傷領域で TIP60 による H2AX のアセチル化が PARP-1 の ADP リボシル化酵素活性を高めるメカニズムを探るために H2AX 複合体の構成因子についてさらなる解析を進め、NAD を合成する酵素(NADS1)を同定した。さらにクロマチン免疫沈降実験を行い、TIP60 のアセチル化活性に依存して NADS1 が損傷領域に集積することを明らかにし、地産地消の仕組みの存在が示唆された。これらの知見から、NADS1 による DNA 損傷部位での NAD の局所産生が、PARP-1 の活性を高め、H2AX の交換反応が促進され、その結果、損傷領域でのヒストンアセチル化の亢進が引き起こされると推測される。

### 2. 研究の目的

本申請課題では、放射線によるゲノム損傷ストレス応答における TIP60 によるアセチル化シグナルと NAD 代謝の関係について検討し、既存の H2AX のリン酸化シグナルとの関わりを示しながら、アセチル化と NAD 代謝の連携機構のメカニズムとその意義を明らかにする。また放射線照射前後の H2AX のアセチル化の状態が、放射線感受性に影響を与えている可能性を示唆する我々の実験結果を受けて、TIP60-PARP-1 複合体による H2AX のアセチル化-NAD 代謝シグナルの連携と放射線感受性との関係を明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

- a. TIP60 による H2AX のアセチル化が、NADS1 のゲノム損傷領域への誘導に関与しているのか、あるいは維持に関与しているのかについて TIP60 による H2AX のアセチル化を細胞内で阻害し、クロマチン免疫沈降あるいは Micro-irradiation 法で明らかにする。
- b. TIP60 による H2AX のアセチル化を介した H2AX の交換反応と NADS1 との関係を検討する。
- c. NADS1 の DNA 損傷部位に局在が確認できれば、実際に NAD が、損傷部位で産生されるか否かについて円順列変異蛍光蛋白質型バイオセンサーを用いて検証する。
- d. ゲノム損傷後の H2AX のアセチル化の度合いと放射線感受性が HeLa 細胞より高い U2OS 細胞において NADS1 ノックダウンを行い、放射線感受性の低下が起こるか否かを検討する。

### 4. 研究成果

H2AX の複合体の構成因子をさらに詳細に解析し、de novo 経路の NAD 産生の律速酵素である NADS1 を同定し、TIP60 のアセチル化酵素活性に依存的にこの NADS1 が DNA 損傷部位に誘導されることを明らかにしている。そこでまず我々は TIP60 による H2AX のアセチル化が、その誘導に関与しているのかについてクロマチン免疫沈降法により検討し、その結果、TIP60 による H2AX のアセチル化が、NADS1 の DNA 損傷部位に誘導もしくは維持に関与していることが明らかになった。さらに NADS の DNA 損傷部位に局在が、実際に損傷部位で NAD の産生に寄与しているのかを示す為円順列変異蛍光蛋白質型バイオセンサーを用いて検証したが、この系

は結果的に良好な結果を得ることができなかった。このことを打開する為に細胞核内でのみ NADS1 の酵素活性を阻害する NADS1 の変異体遺伝子を細胞核内でのみ発現させると、GFP-PARP-1 のダイナミクスが抑制された。GFP-PARP-1 のダイナミクスの亢進は、ADP-リボシル化酵素活性を反映していることから NADS1 によって産生された細胞核内の NAD が、PARP-1 によって消費されていることが示された。さらに細胞で NADS1 をノックダウンすると相同組換え修復が阻害されることそして放射線感受性が亢進することを見出し、細胞核内の *de novo* NAD 産生系がゲノムストレス損傷応答に関与することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Furuya, K., Ikura, M., Ikura, T	4. 巻 165
2. 論文標題 Epigenetic interplays between DNA demethylation and histone methylation for protecting oncogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Biochem	6. 最初と最後の頁 297-299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jb/mvy124.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sun, J., Shi, L., Kinomura, A., Fukuto, A., Horikoshi, Y., Oma, Y., Harata, M., Ikura, M., Ikura, T., Kanaar, R., Tashiro, S	4. 巻 7
2. 論文標題 Distinct roles of ATM and ATR in the regulation of ARPB phosphorylation to prevent chromosome translocations	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 elife	6. 最初と最後の頁 e32222
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.32222.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Arimura, Y., Ikura, M., Fujita, R., Noda, M., Kobayashi, W., Horikoshi, N., Sun, J., Shi, L., Kusakabe, M., Harata, M., Ohkawa, Y., Tashiro, S., Kimura, H., Ikura, T., Kurumizaka, H	4. 巻 46
2. 論文標題 Cancer-associated mutations of histones H2B, H3.1 and H2A.Z.1 affect the structure and stability of the nucleosome	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Res	6. 最初と最後の頁 10007-10018
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gky661.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Fukuto Atsuhiko, Ikura Masae, Ikura Tsuyoshi, Sun Jiyong, Horikoshi Yasunori, Shima Hiroki, Igarashi Kazuhiko, Kusakabe Masayuki, Harata Masahiko, Horikoshi Naoki, Kurumizaka Hitoshi, Kiuchi Yoshiaki, Tashiro Satoshi	4. 巻 9
2. 論文標題 SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Nucleus	6. 最初と最後の頁 87 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/19491034.2017.1395543	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Wakida Takeshi, Ikura Masae, Kuriya Kenji, Ito Shinji, Shiroiwa Yoshiharu, Habu Toshiyuki, Kawamoto Takuo, Okumura Katsuzumi, Ikura Tsuyoshi, Furuya Kanji	4. 巻 6
2. 論文標題 The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell proliferation and tolerance to genotoxic stress	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e29953
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.29953	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 五十嵐和彦、井倉 毅	4. 巻 72
2. 論文標題 エビジェネティック代謝物の地産地消	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 685-692
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計26件 (うち招待講演 8件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 井倉 毅
2. 発表標題 生物らしさ”に視点を置いたストレス応答研究の新たな挑戦
3. 学会等名 筑波大学生存ダイナミクス研究センター (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井倉 毅、古谷寛治、白木琢磨、井倉正枝
2. 発表標題 細胞の生き残り戦略：ゲノムストレス応答蛋白質間相互作用の揺らぎ
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古谷寛治、井倉正枝、井倉 毅
2. 発表標題 ロジスティックモデルの更新：老化研究における新たな視点
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会 ワークショップ（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井倉 毅
2. 発表標題 環境ストレス応答研究における決定論的考察から確率論的考察への変遷
3. 学会等名 東北大学加齢医学研究所セミナー（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋優喜、古谷寛治、井倉正枝、井倉 毅
2. 発表標題 ロジスティックモデルの更新に伴う老化研究の新たな視点
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古谷寛治、井倉正枝、井倉 毅
2. 発表標題 データベース解析から紐解くがん細胞のゲノムDNA損傷ストレス抵抗性獲得戦略
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 古谷寛治、井倉正枝、井倉 毅
2. 発表標題 オートファジー機構によるがんシグナル経路の調節
3. 学会等名 日本放射線影響学会第62回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井倉 毅 古谷 寛治 井倉 正枝
2. 発表標題 ゲノムストレス応答研究における知の創成
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 孫 継英、時 林、木野村 愛子、福戸 敦彦、堀越 保則、尾間 由佳子、原田 昌彦、井倉 正枝、井倉 毅、Roland Kanaar、田代 聡
2. 発表標題 ATM regulates ARP8 phosphorylation to prevent etoposide-induced chromosomal translocations
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 古谷 寛治 井倉 正枝 井倉 毅
2. 発表標題 オートファジー機構によるがんシグナル経路の調節
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井倉 毅 古谷 寛治 井倉 正枝
2. 発表標題 ヒストンアセチル化を介した損傷クロマチンダイナミクス
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第61回大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井倉 毅
2. 発表標題 “生物らしさ”に視点を置いた環境ストレス応答研究の将来展望
3. 学会等名 日本環境変異原学会第47回大会、大会特別講演賞受賞講演 京都大学桂キャンパス 船井哲良記念講堂 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井倉 毅
2. 発表標題 ゲノムストレス応答における機能的タンパク質複合体のゆらぎに着目した 生化学研究の新たな展望
3. 学会等名 第91回日本生化学会大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 井倉 毅
2. 発表標題 機能的蛋白質複合体のゆらぎを支配するヒストン化学修飾の新たな理念
3. 学会等名 第20回生命科学研究所シンポジウム
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 井倉 毅、古谷寛治、田代聡、井倉正枝
2. 発表標題 ヒストンH2AXの交換反応を介した損傷クロマチンダイナミクス
3. 学会等名 新学術領域「クロマチン動構造」第5回班会議
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井倉 正枝、福戸 敦彦、古谷 寛治、井倉 毅
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレスにおけるTIP60ヒストンアセチル化酵素とポリADP-リボシル化酵素PARP-1の連携機構の役割
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第60回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷 寛治、井倉 正枝、井倉 毅
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障するCDK-PLK1経路によるDNA損傷シグナリングの調節
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第60回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jiyong SUN, Masahiko HARATA, Aiko KINOMURA, Tsuyoshi IKURA, Satoshi TASHIRO
2. 発表標題 INO80 chromatin remodeling complex prevents 11q23 chromosomal translocations
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第60回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kanji FURUYA, Masae IKURA, Tsuyoshi IKURA
2. 発表標題 CDK-PLK1 axis targets DNA checkpoint sensor protein RAD9, Promoting tolerance to genotoxic stress and cell proliferation
3. 学会等名 The 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, "Cutting Edge of Radiation and Cancer biology" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomohiko HARA, Yusuke SHIMA, Yuzo WATANABE, Masae IKURA, Tsuyoshi IKURA, Fuyuki ISHIKAWA
2. 発表標題 CST complex, telomeric ssDNA-binding proteins, is associated with Nucleotide Excision Repair in whole genome
3. 学会等名 The 33rd International Symposium of Radiation Biology Center, "Cutting Edge of Radiation and Cancer biology" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Jiying SUN, Masahiko HARATA, Tsuyoshi IKURA, Roland KANAAR, Satoshi TASHIRO
2. 発表標題 ATM regulates phosphorylation of ARP8 to repress the loading of INO80 and RAD51 to chromosome translocation breakpoint hotspots
3. 学会等名 The 33rd International Symposium of Radiation Biology Center "Cutting Edge of Radiation and Cancer biology" (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 井倉 毅、白木 琢磨、古谷 寛治、井倉 正枝
2. 発表標題 ゲノムストレス応答における機能的蛋白質複合体フラクチュエーション
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷 寛治、井倉 正枝、井倉 毅
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障する CDK-PLK1経路による DNA損傷シグナリングの調節
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 孫 継英、原田 昌彦、木野村 愛子、井倉 毅、田代 聡
2. 発表標題 11q23染色体転座形成における INO80クロマチン転換複体の関与
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会 ConBio 2017
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 古谷寛治、井倉正枝、井倉毅
2. 発表標題 ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障する CDK-PLK1 経路による DNA 損傷シグナリングの調節
3. 学会等名 第35回 染色体ワークショップ・第16回 核ダイナミクス研究会 合同開催
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomohiko Hara, Yusuke Shima, Yuzo Watanabe, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura, and Fuyuki ishikawa
2. 発表標題 Telomeric ssDNA-binding proteins of CST Complex are associated with Nucleotide Excision Repair
3. 学会等名 16th International Student Seminar, Kyoto University
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 京都大学大学院生命科学研究科	4. 発行年 2018年
2. 出版社 講談社	5. 総ページ数 325
3. 書名 京大発！ フロンティア生命科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	松田 知成  (Matsuda Tomonari)		
研究協力者	今村 博臣  (Imamura Hiromi)		