

令和 2 年 7 月 3 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19290

研究課題名(和文) エピジェネティックな発現制御による新規放射線耐性獲得メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of novel radiation resistance mechanism by Epigenetic regulation

研究代表者

沖 昌也 (Oki, Masaya)

福井大学・学術研究院工学系部門・教授

研究者番号：60420626

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、出芽酵母をモデル生物に用い、DNA配列に依存しないエピジェネティックな発現制御機構の破綻が及ぼす影響を幅広くスクリーニングする過程で新規のX線耐性機構の存在を明らかにした。このエピジェネティックな発現制御機構の破綻により獲得したX線耐性能は非常に強く、既知のDNA修復機構では説明出来ないレベルであった。興味深いことに、異なるコロニー間でX線耐性と非耐性の酵母が混在することも見出し、この結果も従来までの知見では説明できない新たな現象であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、現状では接点のない、「エピジェネティクスの研究分野」と「放射線耐性獲得メカニズム研究分野」を繋ぎ、新たな視点から新規の放射線耐性獲得メカニズムの解明に貢献できる。また、本研究により、我々の予想とは全く違う新たな遺伝子発現調節機構の存在を見出す可能性も秘めている。本研究は酵母を対象にしているが、従来、酵母を対象にしたDNA修復機構の研究の多くがヒトのDNA修復機構研究に繋がったように、本研究による研究成果は、ヒト細胞をはじめとする他の生物種への応用も期待出来る。

研究成果の概要(英文)：My research is analysis about epigenetic gene expression mechanism that occur in different characteristics in individual cells independent of DNA sequence. In *Saccharomyces cerevisiae*, Sir2, Sir3 and Sir4 proteins form a Sir complex and silenced chromatin that repress gene expression result from binding between Sir complex and chromatin. In this study, I analyzed the effect on irradiating X-rays to strains lacking the sir gene involved in silenced chromatin formation. I irradiated to sir2-del, sir3-del, sir4-del strain deleted respectively Sir2, Sir3, Sir4 gene with X rays. As a result, the sir3-del strain and the sir4-del strain showed high survival rate, although the survival rate of the sir2-del strain was as low as that of the WT. This suggested that each Sir protein has a different function by X-ray irradiation. Moreover, the survival rate of sir4-del differed among the colonies.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 放射線耐性 ヘテロクロマチン 出芽酵母

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

同じ DNA 配列から多様な遺伝子発現制御を生み出すエピジェネティックな制御機構は、ヒトなどの細胞分化・発生や疾患のほか、多能性幹細胞“iPS 細胞形成”においても重要な役割を担うとして注目を集めている。我々がモデル生物として用いている出芽酵母では、DNA 上に Sir2、Sir3、Sir4 タンパク質複合体が結合し、ヘテロクロマチン構造を形成することにより、内部の遺伝子の発現をエピジェネティックに抑制する。我々は独自に、世代を越えた 1 細胞追跡システムを確立し、ヘテロクロマチン領域は分裂を繰り返す過程で一定の規則性を持って伸縮を繰り返し、近傍に存在する遺伝子の発現状態を調整していることを見出した (Mano Y et al., (2013) PLO Biol.)。上記結果から、「ヘテロクロマチン領域の伸縮により制御される新規転写抑制機構が存在する」と予測し解析を行ったところ、通常は Sir 複合体により発現を抑制されているが、DNA 損傷が起こると、ヘテロクロマチン領域が変動し発現する遺伝子を見出した。そこで、*sir2*、*sir3*、*sir4* 破壊株を用い、X 線を照射したところ、コントロールとして測定していた生存率が、*sir3* または *sir4* 破壊株では上昇し、*sir2* 破壊では変化しないという予想しなかった結果が得られた (図 1)。微生物のディノコッカスラジオデュランスに代表されるように、既知の放射線耐性の生物は、放射線照射により生じた DNA の 2 本鎖切断を効率的かつ正確に修復出来る特別な修復システムを持っている

(Narumi I (2003) Trends Microbiol.)。しかし、真核生物では上記のような放射線による DNA 損傷が起こった時のみ、特別な修復能力を発揮するような修復機構は見付かっていない。一般的に放射線により DNA が損傷を受けた場合、DNA 修復機構が働くが、我々がモデル生物として用いている出芽酵母では修復に関わる遺伝子は、全遺伝子破壊株ライブラリーを用いたスクリーニングをはじめとして、長年の研究により既にほぼ全て同定されたと考えられている。しかし、従来の DNA 損傷修復に関わる遺伝子のスクリーニングでは、欠損株や変化株を用い、野生株と比較して生存率が下がる方に注目していたため、耐性に関与する遺伝子は見落とされていた可能性がある。今回我々が見出した *SIR3* 及び *SIR4* 遺伝子の

ように直接修復には関わらない 1 つの遺伝子の欠損が原因で、劇的に生存率が変化する報告例はない。上記理由から、新規の放射線耐性獲得メカニズムの存在が示唆され、その存在を明らかにすることを目的とし、本研究の構想に至った。

本研究は、現状では接点のない、「エピジェネティクスの研究分野」と「放射線耐性獲得メカニズム研究分野」を繋ぎ、新たな視点から新規の放射線耐性獲得メカニズムの解明を目指す挑戦的な提案である。通常はヘテロクロマチンの内部に存在するために発現が抑制されている遺伝子が、*SIR3* または *SIR4* の破壊により発現するようになり、X 線の耐性獲得に関わっていることが推測される。X 線耐性を獲得する際のどの段階で作用したかは不明であるが、上記したように、酵母でこれだけ高い修復能力を持つ新規遺伝子とは考えにくいので、直接 DNA 修復機構に関わっている可能性は少ないと考えている。従って、現在までに報告されている「DNA 損傷修復機構」とは全く違う新規のシステムで *sir3* 及び *sir4* 破壊株は X 線耐性を獲得している可能性が考えられる。この原因を解明することは、生物の持つ新たな放射線耐性を獲得するメカニズムの存在の発見に繋がる。本研究は酵母を対象にしているが、従来、酵母を対象にした DNA 修復機構の研究の多くがヒトの DNA 修復機構研究に繋がったように、本研究による研究成果は、ヒト細胞をはじめとする他の生物種への応用も期待出来る。

2. 研究の目的

出芽酵母において Sir2、Sir3、Sir4 は、複合体を形成し、クロマチンに結合することにより、クロマチンの凝集を引き起こし、結果として DNA 配列の変化を伴わずエピジェネティックに遺伝子の発現を抑制するタンパク質として知られている。現在までに *sir3* あるいは *sir4* 遺伝子の破壊により、X 線に対し非常に強い耐性を獲得するという全く予想していなかった結果を得た (図 1)。真核生物において、1 つの遺伝子の破壊により放射線に対して、これほど大きな耐性を獲得した報告はない。X 線に対して非常に高い耐性を示す酵母を獲得出来たことは、新規の X 線耐性獲得のメカニズム解明に大きく貢献できる可能性を示唆した。

また、真核生物における DNA 修復機構の分子レベルでのメカニズム解明は、いち早く全塩基配列が解明されたこともあり出芽酵母が先導している。事実、出芽酵母を用いて様々なアプローチにより DNA 修復機構の解明を目指し多方面から詳細に研究されており、DNA 修復に関わる遺伝子は、全て同定されたとと言っても過言ではなく、X 線損傷特異的な新たな DNA 修復機構が

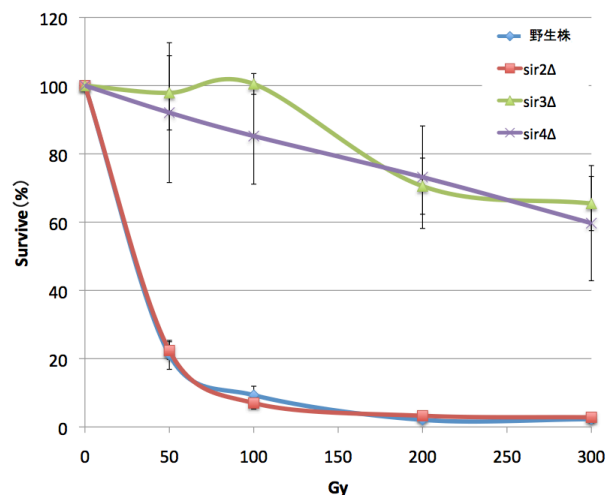


図 1: *sir2*、*sir3*、*sir4* 破壊株に X 線を照射した際の生存率

存在するとは考えにくい。従って、現在までに報告されている「DNA 損傷修復機構」とは全く違う新規のシステムで *sir3* 及び *sir4* 破壊株は X 線耐性を獲得している可能性が考えられる。例えば、「損傷を受けた後に修復する」という従来の概念ではなく、視点を変えて「X 線損傷を受けにくくする」、言い換えれば、「X 線の損傷から DNA を守る」システムが存在するのではないかなど、本研究では斬新なアイデアで多方面からのアプローチを試み *sir3* 及び *sir4* 破壊株における X 線耐性獲得メカニズムの解明を目指す。

3. 研究の方法

- (1) マイクロアレイを用いた発現量解析: 野生株、*sir2Δ* 株、*sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株において X 線照射前と照射後の発現量の変化を、マイクロアレイ法を用いて解析する。
- (2) 候補遺伝子の絞り込み: 本研究においてマイクロアレイの結果をもとに候補遺伝子を絞り込む作業が最も重要となる。そこで以下に記載したように、様々な視点から候補遺伝子の絞り込みを行う。解析には独自に作成したソフトを使用する。
 - (a) X 線照射前の発現量変動遺伝子の同定
 - (b) X 線照射後の発現量変動遺伝子の同定
 - (c) ChIP on chip の解析をもとにした候補遺伝子の絞り込み
 - (d) 既知の修復関係遺伝子を排除した候補遺伝子の絞り込み
- (3) 破壊株を用いた X 線照射後の生存率の確認: (2)-(a)、(b)、(c)、(d) で絞り込んだ遺伝子に関してそれぞれの破壊株を作製し、X 線照射後の生存率を測定する。また、*sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株との 2 重破壊株も作製し、同様に X 線照射後の生存率を測定する。
- (4) 過剰発現株を用いた X 線照射後の生存率の確認: 過剰発現株を作製し、X 線照射後の生存率を測定する。*SIR3* 及び *SIR4* 存在下で、過剰発現により X 線耐性を獲得していれば、その遺伝子が X 線耐性獲得の原因遺伝子である。

4. 研究成果

X 線照射時に野生株と比較して *sir2Δ* 株では生存率に変化はなく、*sir3Δ*、または *sir4Δ* 株では高い耐性を示した。最初に、発現量の変動した遺伝子をピックアップするために、野生株、*sir2Δ* 株、*sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株において X 線照射前と X 線を 100Gy 照射した際の発現量の変化を、マイクロアレイ法を用いて解析した。得られた結果をもとに、X 線照射の前後、ChIP on chip の解析結果との比較、独自で開発したソフトを用いた機能別分類により候補遺伝子を絞り込んだ。絞り込んだ遺伝子と *sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株それぞれとの 2 重変異株を作製し、X 照射を行い、生存率を測定し、放射線耐性能を失った遺伝子を同定した。更に確認のため、同定した遺伝子の過剰発現株を作製し、X 線照射を行い、生存率が上昇するか確認した。

○ 平成 30 年度

(1) マイクロアレイを用いた発現量解析

X 線照射時に野生株と比較して *sir2Δ* 株では生存率に変化はなく、*sir3Δ* 株、または *sir4Δ* 株では高い耐性を示した。野生株、*sir2Δ* 株、*sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株において X 線照射前と X 線を 100Gy 照射した際の発現量の変化を、マイクロアレイ法を用いて解析した。

(2) 候補遺伝子の絞り込み

マイクロアレイの結果をもとに候補遺伝子を絞り込んだ。解析には独自に作成したソフトを使用した。

(a) X 線照射前の発現量変動遺伝子の同定

X 線照射による耐性の獲得には、照射前から *sir3* または *sir4* の欠損により遺伝子が発現し事前に耐性獲得に必要なタンパク質が生体内に存在している、あるいは逆に欠失している可能性が考えられた。そこで、X 線照射前の野生株、*sir2Δ* 株、*sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株の発現量を比較し、野生株と *sir2Δ* 株では発現量の変化がなく、*sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株でのみ発現量変動する遺伝子を選別した。選別した遺伝子に関して、RT-PCR を行い、リアルタイム PCR を用いマイクロアレイの結果と一致するか発現量変化を正確に定量した。発現量の変化に関してマイクロアレイと RT-PCR の結果が一致することを確認し、それぞれに関して Flag-tag を融合したタンパク質を作る酵母株を作製し、抗 Flag 抗体を用いたウエスタンブロッティング法により、*sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株におけるタンパク質量の変化を定量した。

(b) X 線照射後の発現量変動遺伝子の同定

(a) とは逆に、X 線照射前には変動がなく、X 線照射後にのみ耐性獲得に関わる遺伝子の発現量が増加した可能性も考えられたため、X 線照射後に発現量の増減が得られた遺伝子を選別した。その後、(a) 同様に、RT-PCR とリアルタイム PCR を用いた定量、ウエスタンブロッティング法によるタンパク質量の変化を定量した。

(c) ChIP on chip の解析をもとにした候補遺伝子の絞り込み

Sir2、Sir3、Sir4 複合体はテロメア、性決定に必要な *HMR*、*HML* 領域に存在することが知られている (Rusche LN et al., (2003) Ann. Rev. Biochem.). 我々は、抗 Sir3 抗体を用いた ChIP

on chip 解析により上記以外で染色体上における Sir3 新規存在量領域を同定した (Mitsumori R et al., (2016) J. Biochem.)。また、G1 期で同調後、同様に ChIP on chip 解析を行なったところ、Sir3 の存在が細胞周期依存的に変動する領域を見出した。今回我々が分離した X 線耐性株も *sir3Δ* 株で耐性を獲得したことから、ChIP on chip 解析によって同定された新規 Sir3 タンパク質存在領域の内部あるいは近傍に存在することが予測されたため (a)、(b) で絞り込んだ遺伝子の中で、Sir3 タンパク質存在領域の内部あるいは近傍に存在する遺伝子を更に絞り込んだ。

(d) 既知の修復関係遺伝子を排除した候補遺伝子の絞り込み

我々は DNA 損傷修復機構ではない新たな X 線耐性獲得機構が存在すると考えているため、(a)、(b)、(c) で絞り込んだ遺伝子のうち、既知の修復遺伝子は排除した。また、分離した候補遺伝子群の中で、既に報告されている機能 (in vivo 及び in vitro での結合実験、Two-hybrid assay、変異株を用いた合成致死スクリーニング、質量分析による結合解析、マイクロアレイ解析等) に注目し相関関係があるか独自に作成したソフトを用い様々な視点から解析し、機能的に分類し、同じ機能に関わる遺伝子に注目し更に解析を進めた。

○ 平成 31 年度 (令和元年度)

(3) 破壊株を用いた X 線照射後の生存率の確認

平成 30 年度 (2) - (a)、(b)、(c)、(d) で絞り込んだ遺伝子に関してそれぞれの破壊株を作製し、X 線照射後の生存率を測定した。また、*sir3Δ* 株、*sir4Δ* 株との 2 重破壊株も作製し、同様に X 線照射後の生存率を測定した。

(4) 過剰発現株を用いた X 線照射後の生存率の確認

SIR3 及び *SIR4* 存在下で、過剰発現により X 線耐性を獲得していれば、その遺伝子が X 線耐性獲得の原因遺伝子であると言えるため過剰発現株を作製し、X 線照射後の生存率を測定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Motoki Tanaka, Wataru Kobayashi, Masanori Hatashita and Masaya Oki
2. 発表標題 Analysis of X-ray resistance mechanism by epigenetic gene expression
3. 学会等名 American Society for Cell Biology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mana Kaneda, Ayane Yagishita, Wataru Kobayashi, Motoki Tanaka, Masanori Hatashita, Hiroyuki Uchida and Masaya Oki
2. 発表標題 Analysis of resistance mechanism in different radiations by using sir 2, 3, 4 deletion strain
3. 学会等名 American Society for Cell Biology Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中元基、畑下昌範、内田博之、沖昌也
2. 発表標題 Aft1、Aft2を介した鉄制御システムによる放射線耐性機構の解析
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第36回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中元基、畑下昌範、内田博之、沖昌也
2. 発表標題 エピジェネティックな発現制御による X 線耐性機構の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第61回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 金田真奈、田中元基、畑下昌範、内田博之、沖昌也
2. 発表標題 sir 遺伝子破壊に伴うX線耐性機構の解明
3. 学会等名 第5回北陸エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoki Tanaka, Mana Kaneda, Masanori Hatashita, Masaya Oki
2. 発表標題 Analysis of X-ray resistance mechanism shown by sir deficient strains.
3. 学会等名 Future of biomedicine 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mana Kaneda, Motoki Tanaka, Masanori Hatashita, Masaya Oki
2. 発表標題 Analysis of X-ray resistance mechanism by using SIR2, SIR3 and SIR4 deletion strains.
3. 学会等名 Future of biomedicine 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金田真奈、田中元基、畑下昌範、沖昌也
2. 発表標題 SIR 遺伝子破壊と再導入による X 線耐性獲得機構の解析
3. 学会等名 第6回北陸エビジェネティクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金田真奈、田中元基、畑下昌範、沖昌也
2. 発表標題 SIR 遺伝子を破壊及び戻すことによる X 線耐性への影響
3. 学会等名 第37回YEASTWORKSHOP
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 沖昌也、金田真奈、田中元基、畑下昌範
2. 発表標題 一度壊れたヘテロクロマチン領域の機能はすぐには回復しない
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中元基、金田真奈、畑下昌範、沖昌也
2. 発表標題 Sir 複合体の構成因子によって異なる X 線耐性とそのメカニズム解析
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金田真奈、田中元基、畑下昌範、沖昌也
2. 発表標題 SIR 遺伝子破壊及び再導入に伴う X 線耐性への影響
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金田真奈、田中元基、畑下昌範、沖昌也
2. 発表標題 X 線耐性獲得における SIR 遺伝子の影響
3. 学会等名 ライフサイエンスイノベーションセンター研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 金田真奈、田中元基、畑下昌範、沖昌也
2. 発表標題 SIR 欠損株における X 線耐性機構の解明
3. 学会等名 日本生化学会北陸支部第37回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

ホームページ https://sites.google.com/view/biochem-hp/

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