

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K12321

研究課題名(和文)線量率効果におけるアセチル化シグナルの多様性とエピジェネティクス制御

研究課題名(英文) Diversity of acetylation signaling and epigenetic regulation for radiation dose rate effects.

研究代表者

井倉 正枝 (Ikura, Masae)

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：40535275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：H2AXのアセチル化は、主に低線量率のゲノムストレスの対応に重要であり、H2AXのリン酸化は、低線量率および高線量率のゲノムストレスの両方に重要であること、さらにH2AXのリン酸化の低線量率および高線量率の役割の違いをH2AXのアセチル化が規定していることが今回明らかになった。TRRAPは、その担い手であり、低線量率のDNA損傷においては、DNA-PKcsをH2AXのアセチル化に導き、相同組み換え修復(HR)を促す。一方、高線量率のDNA損傷時には、DNA-PKcsは、TRRAPには依存せずにH2AXのリン酸化に関与し、非同末端結合修復(NHEJ)の促進に関わることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同一の吸収線量であるのに、その線量率の違いで生物学的効果が大きく異なる線量率効果に着目して研究を進めてきた。今回、H2AXのリン酸化の低線量率および高線量率の役割の違いをH2AXのアセチル化が規定していることが、TIP60複合体の構成因子であるTRRAPに着目することで、明らかにした。生物が、多様で複合的なストレスに対応している様が、次第に明らかになりつつあり、エピジェネティクス制御の担い手であるヒストンの化学修飾の分子機構について検討することは、次世代への影響や多様な個々の放射線応答も明らかにすることに繋がることから、学術的、社会的に意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have shown that acetylation of H2AX is primarily important in response to low-dose-rate genomic stress, while phosphorylation of H2AX is crucial for both low-dose-rate and high-dose-rate genomic stress. In the present study, we found that acetylation of H2AX defines the differential role of H2AX phosphorylation at low and high dose rates. TRRAP, which is the component of TIP60 histone acetylase complex, leads DNA-PKcs to acetylation of H2AX and promotes homologous recombination repair (HR) in low-dose-rate DNA damage. On the other hand, at high dose rate DNA damage, DNA-PKcs is involved in the phosphorylation of H2AX independently of TRRAP, and promotes non-homologous end joining repair (NHEJ).

研究分野：放射線生物学

キーワード：線量率効果 アセチル化シグナル 多様性 エピジェネティクス TRRAP

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノムストレスに伴う損傷応答シグナルは、損傷部位に集積したチェックポイント蛋白質によって発動し、細胞増殖の停止とその間に DNA 修復が行われることは、すでに明らかになっている。興味深いことに、DNA 損傷を与えなくても、人為的に DNA 損傷を感知するチェックポイント蛋白質 NBS1 をクロマチンに結合させるだけで、ゲノムストレス応答シグナルを活性化させることが可能であるという報告など、最近では、損傷応答シグナルの活性化におけるクロマチン制御の重要性が数多く報告されるようになった。実際、申請者らも、TIP60 ヒストンアセチル化酵素による H2AX のアセチル化が、ポリ ADP-リボシル化酵素 PARP-1 のポリ ADP-リボシル化活性を制御し、DNA 損傷のセンサー蛋白質 NBS1 の損傷クロマチンへの結合を制御していることを報告した(Ikura, M., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 2015. Ikura, M., *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 2016)。チェックポイント蛋白質とクロマチンとの結合が、ゲノムストレス応答シグナルの活性化に如何に重要かがこれらの知見から伺える。またクロマチンの構成蛋白質であるヒストンの化学修飾は、エピジェネティック制御の担い手でもあることから、線量率効果の違いをクロマチンレベルで解明することは、低線量率放射線の次世代影響を見定める上で極めて重要である。

Transformation/Transcription Domain Associated Protein (TRRAP)は、PCAF に代表される GCN5 ファミリーと TIP60 に代表される MYST ファミリーに分類されるヒストンアセチル化酵素のコファクターとして知られ、その構造的特徴からリン酸化酵素 ATM スーパーファミリーに属する。興味深いのは、リン酸化酵素活性を担う活性中心に変異があり、TRRAP そのものには、リン酸化活性は存在しない。これまでの申請者の研究により、TRRAP は、アセチル化シグナルの過剰な働きを抑制する、言わば、アセチル化シグナルのチューナーとしての働きがあることが明らかになり、TRRAP が、損傷領域のアセチル化と H2AX のリン酸化の絶妙なバランスを取っている可能性が見出された。今回、申請者は、放射線照射後のヒストン H2AX のリン酸化の責任酵素である ATM と DNA-PKcs の H2AX を含むクロマチンに対する結合カイネティクスが、高線量率あるいは低線量率で互いに異なることを明らかにした。興味深いことにヒストンアセチル化の制御因子である TRRAP を細胞内でノックダウンすると、これらの結合カイネティクスにそれぞれ異なるインパクトをもたらすことが見出された。TRRAP に着目することで、アセチル化シグナルと H2AX のリン酸化の連携機構における線量率効果の違いを見定めることが可能であることを示唆している。今回は、これらの知見を踏まえ、線量率効果における生体応答の仕組みについて TRRAP を介したアセチル化制御の視点から解明したいと考えている。

## 2. 研究の目的

本課題では、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子である TRRAP を介したアセチル化シグナルに着目して、放射線の異なる線量率の違いによって、いかにゲノムストレス応答の多様性が生み出されるのかについて、その分子基盤をヒストン H2AX のアセチル化とリン酸化に視点をおいて明らかにすることが目的である。

## 3. 研究の方法

高線量率と低線量率で H2AX のリン酸化に対する ATM と DNA-PKcs の優位性が異なり、高線量率では、主に ATM が、一方、低線量率では、DNA-PKcs が、H2AX のリン酸化を担うことを示

唆する結果を得た。この優位性が生まれる仕組みについて TRRAP に着目して研究を展開する。

1) TRRAP のノックダウン細胞において低線量率の場合は、H2AX のリン酸化が亢進し、照射後 60min では、DNA-PKcs のクロマチンへの結合が増強する。GFP-DNA-PKcs は、活性化状態になるとクロマチンへの結合と離脱がダイナミックになることが報告されている。従って、この増強は、DNA-PKcs の活性が阻害されたことにより生じた可能性も考えられる。そこで、GFP-DNA-PKc を発現させた野生型および TRRAP のノックダウン細胞に低線量率放射線照射 (1.33mGy/min, total 3Gy) を施して、FRAP を用いたバイオイメーシング解析で比較検討する。すでに酵素活性をバイオイメーシングで解析するシステムおよび低線量率放射線照射後のダイナミクス解析は、GFP-PARP1 を用いて検証、セットアップ済みである。GFP-DNA-PKcs の細胞内発現系はすでに完了し、405nm レーザーによる集積は確認済みである。

2) TRRAP をノックダウンした細胞で低線量率の放射線を細胞に照射し、H2AX のアセチル化およびリン酸化への影響を western blotting 法により検討する。

3) DNA-PKcs は、アセチル化結合に関与するプロモドメインを持っている。そこで H2AX のアセチル化に結合する活性化があるか否かを生体分子間相互作用解析システムであるバイオレイヤー干渉法により検討する。結合が確認できれば、結合ドメインに変異を導入し、H2AX のアセチル化に結合しない DNA-PKcs の変異体を作製する。

#### 4) ASHRA (Assay for site-specific HR activity)

細胞内の相同組み換え活性は Crispr/Cas9 システムで ACTB 遺伝子座に二本鎖 DNA 切断を導入し、切断部位への組み込み効率を定量 PCR で測定により算出する ASHRA 法を用いた (Yoshino Y et al., Sci. Reports, 2019)。まず、ACTB 遺伝子座の Cas9/gRNA 発現ベクター、ACTB 遺伝子座のドナーベクター (pBS-ACTB-GFP-DV) を細胞に共トランスフェクションさせ、48 時間後に、細胞を採取し、赤血球ゲノム DNA 抽出キット (SciTrove) を用いて、ゲノム DNA を採取した。回収したゲノム DNA を組み換えの可否の違いを見分けるプライマーセットを用い、Eco リアルタイム PCR システム (イルミナ社製) と KAPA SYBR Fast PCR キットを用いて、リアルタイム PCR により解析する。

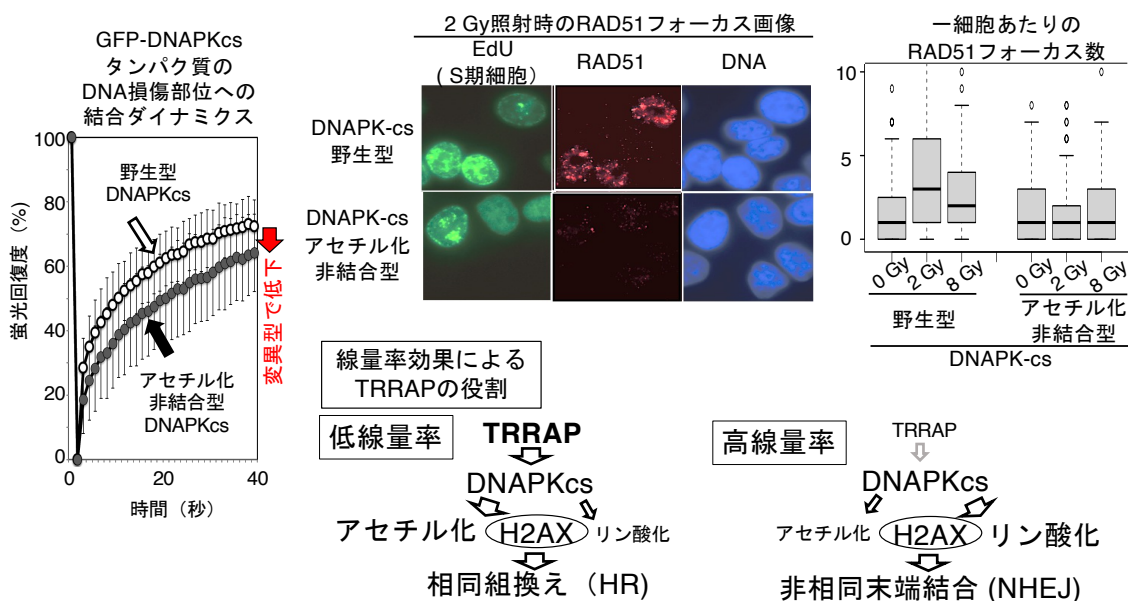
## 4. 研究成果

本課題では、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子である TRRAP に着目して、放射線の線量率の違いによって、いかにゲノムストレス応答の多様性が生み出されるのかについて解析した。これまでの研究によって TIP60 を介した H2AX のアセチル化は、主に低線量率で DNA 損傷に関与することが明らかになりつつある。TRRAP は、ヒストンアセチル化酵素 TIP60 複合体のみならず、同じくヒストンアセチル化酵素 PCAF および MOF の構成因子でもある。TRRAP は、これらアセチル化酵素をクロマチンに誘導し、ヒストンのアセチル化を促すことがすでに報告されている。今回、TRRAP をノックダウンした細胞では、放射線による DNA 損傷によるガンマ H2AX(リン酸化 H2AX)へのインパクトは、低線量率の方が、高線量率の DNA 損傷よりも大きい。この結果は H2AX のアセチル化が、主に低線量率の DNA 損傷応答に関与することと合

致している。

アセチル化シグナルと H2AX のリン酸化との関係については、H2AX のアセチル化は、主に低線量率のゲノムストレスの対応に重要であり、H2AX のリン酸化は、低線量率および高線量率のゲノムストレスの両方に重要であること、さらに H2AX のリン酸化の低線量率および高線量率の役割の違いを H2AX のアセチル化が規定していることが今回明らかになった。低線量率においては、H2AX のリン酸化は、主に DNA-PKcs が担い、その際の DNA 修復は相同組換え修復 (HR) が誘導されることが示唆された。さらに今回、H2AX のアセチル化に結合する DNA-PKcs のドメインを同定し、そのドメインに変異を導入し、H2AX のアセチル化との結合を阻害した DNA-PKcs 変異体を導入した細胞では、DNA-PKcs のダイナミックな挙動および HR が抑制されることを明らかにした。

TRRAP をノックダウンした細胞では、放射線照射による DNA 損傷によるガンマ H2AX(リン酸化 H2AX)へのインパクトは、低線量率の方が、高線量率の DNA 損傷よりも大きい。このことは H2AX のアセチル化が、主に低線量率の DNA 損傷応答に関与することと合致している。我々は、TIP60 による H2AX のアセチル化は、H2AX が損傷クロマチンから放出されてから起きることを数理モデルで実証した (投稿中)。一方、TRRAP をノックダウンした細胞に低線量率での放射線を暴露させると、H2AX のアセチル化は、コントロールの細胞と比較してむしろ亢進しているという結果を得た。この結果は、TRRAP が、損傷クロマチンへの TIP60 の結合を促し、H4 のアセチル化を促進させる、言わば、損傷クロマチンへのリクルーターとして機能があるという先行研究の結果と一致しない。今回、我々は、TRRAP を細胞内でノックダウンすると DNA-PKcs のクロマチンとのダイナミックな結合が抑制され、さらに H2AX のアセチル化が亢進し、HR が抑制されることを見出した。この結果は、先に述べた DNA-PKcs の H2AX のアセチル化への結合ドメインに変異を導入した時の結果と一致する。これらの実験結果を総合的に考え合わせると、これまでの研究では非相同組換え修復(NHEJ)にのみ関与すると考えられてきた DNA-PKcs は、線量率の違いによって異なった役割があり、TRRAP は、低線量率の DNA 損傷においては、DNA-PKcs を H2AX のアセチル化に導き、HR を促す。一方、高線量率の DNA 損傷時には、H2AX のリン酸化に関与し、NHEJ の促進に関わることを明らかにした (図参照)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furuya Kanji, Ikura Masae, Ikura Tsuyoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Machine learning extracts oncogenic specific H2AX foci formation pattern upon genotoxic stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 237 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13005	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 Ikura Masae, Furuya Kanji, Matsuda Tomonari, Ikura Tsuyoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Impact of Nuclear De Novo NAD Synthesis via Histone Dynamics on DNA Repair during Cellular Senescence To Prevent Tumorigenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mcb.00379-22	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 Sakai W, Yuasa-Sunagawa M, Kusakabe M, Kishimoto A, Matsui T, Kaneko Y, Akagi JI, Huyghe N, Ikura M, Ikura T, Hanaoka F, Yokoi M, Sugasawa K.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 Functional impacts of the ubiquitin-proteasome system on DNA damage recognition in global genome nucleotide excision repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76898-2	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 Kanji Furuya, Masae Ikura, Tsuyoshi Ikura	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. Biochemistry	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 古谷 寛治、井倉 正枝、井倉 毅
2. 発表標題 ゲノムストレス下におけるがん異常増殖の仕組みの分子理解への取り組み
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第65回大会
4. 発表年 2022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 予測不可能なゲノム損傷に対応する多様なヒストン化学修飾の役割とその頑強性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会シンポジウム
4. 発表年 2022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 融合研究への挑戦：動的細胞老化を司るヒストン蛋白質の新知見
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021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 多様なストレスに対峙するゲノムストレス応答蛋白質複合体の揺らぎ
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古谷 寛治、井倉 正枝、井倉 毅
2. 発表標題 オートファジーを介したリン酸化シグナル調節によるがん細胞のゲノムDNA損傷ストレス抵抗性獲得戦略
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井倉 毅 古谷 寛治 井倉 正枝
2. 発表標題 NAD代謝変動から見たゲノムストレス応答ダイナミクス
3. 学会等名 第93回日本生化学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古谷 寛治 井倉 毅 井倉 正枝
2. 発表標題 オートファジー機構によるがん増殖におけるリン酸化シグナル経路の調節
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 ワークショップ2PW-05
4. 発表年 2020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
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
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 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
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
4. 発表年 2019年



〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------