

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20H04331

研究課題名（和文）ヒストンH2AXによる遺伝子発現制御機構と新規ゲノム安定性機構ネットワークの解明

研究課題名（英文）Novel function of H2AX in maintenance genome integrity through the regulation of gene expression.

研究代表者

中村 麻子（Nakamura, Asako）

茨城大学・基礎自然科学野・教授

研究者番号：70609601

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：DNA二本鎖切断修復において重要な役割を有するヒストンH2AXによる遺伝子発現制御機構が近年着目されている。本研究ではH2AX欠損細胞における遺伝子発現レベルの変化を網羅的に解析したところ、非損傷誘発時でもDNA損傷の相同組み換え修復に関与する遺伝子の発現が有意に上昇していること、細胞の増殖・接着・分化に係るシグナル経路関連遺伝子の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。これらの結果はH2AXがDNA損傷発生時にゲノム安定性に機能するだけでなく、DNA損傷の有無にかかわらず生物の恒常性を維持するために遺伝子発現制御をしているという、新しいH2AXの機能を提唱するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、H2AXによるこれまでに知られていなかった新しい遺伝子発現制御機能が明らかとなった。特に増殖シグナル制御、上皮間葉転換制御、DNA損傷修復制御、という生物の恒常性に重要なシグナル経路の遺伝子発現制御機能を明確にする本研究成果は、将来的にがん予防や様々な疾病に対する新規治療標的の提言につながると期待される。さらに特筆すべき点として、H2AXは多くの真核生物で進化的に高く保存されていることから、本研究の完遂は生物に共通した遺伝子発現制御機構の新たな発見につながる。

研究成果の概要（英文）：Several studies revealed the novel regulatory mechanism of gene expression by histone H2AX, one of the proteins that play an important role in DNA double-strand break repair. In this study, we comprehensively analyzed the gene expression pattern in H2AX-deficient cells by RNA sequencing and found that the expression of genes involved in homologous recombination repair and the genes of signaling pathways for cell proliferation, adhesion, and differentiation were found was significantly upregulated even in non-damage-induced cells. These results propose a new function for H2AX, in which H2AX not only functions in genome stability during the occurrence of DNA damage, but also regulates gene expression to maintain homeostasis of the organism regardless DNA damage.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ヒストン 遺伝子発現制御 相同組換え修復 DNA損傷

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

H2AX は DNA 二本鎖切断 (double-strand break: DSB) 修復の初期反応に重要なタンパク質としてよく知られているが、ヒト結腸がん細胞において H2AX の欠損が遺伝子発現変化を介して上皮間葉系転換を誘導することが報告された (Weyemi et al. *Nat. Communi.* 2016)。そこで、我々は予備的な研究として H2AX 野生型と H2AX 欠損型のマウス胎児線維芽細胞の mRNA 量を RNA シークエンスで網羅的に解析したところ、H2AX 欠損細胞では DSB 修復経路の一つである相同組換え修復に関連する遺伝子の発現が上昇することが明らかになった。このことは、H2AX が DSB 修復における足場の役割だけでなく、DSB 修復関連遺伝子や上述の上皮間葉系転換関連遺伝子などの発現制御にも関与することを示している。H2AX による遺伝子発現制御は、正常細胞においては正確かつ確実な DNA 損傷修復を維持するために働く一方で、がん細胞ではがん悪性度につながる上皮間葉系転換を抑制するために働いていることを示唆しており、H2AX がこれまで考えられていた以上にゲノム安定性を維持するための重要な役割を有していると考え本研究計画を着想した。

2. 研究の目的

ヒストン H2AX は、DNA 二本鎖切断 (double-strand break: DSB) が生じた際に直ちにリン酸化 (リン酸化 H2AX は γ -H2AX と呼ばれる) されることで DNA 損傷応答を活性化させる、いわば DNA 損傷応答の初期応答マーカーである。H2AX のリン酸化は DSB 部位の周辺でのみ発生することから、多くの DNA 損傷修復タンパク質が γ -H2AX を足場タンパク質として DSB 部位に局在し、正確な DNA 損傷修復を行っている。H2AX の迅速な修飾が DNA 損傷応答において重要であることは疑う余地もない一方で、H2AX タンパク質の DNA 損傷修復機構への直接的な関与はこれまで知られていなかった。

そうした中、最近、H2AX が遺伝子発現制御に関わることを示唆するデータが報告された (Weyemi et al. *Nat. Communi.* 2016)。Weyemi らの論文では、H2AX 依存的なクロマチン構造制御によって、複数の転写活性化因子の発現が制御されている可能性が報告されており、H2AX タンパク質が足場的機能だけでなく、クロマチン制御による遺伝子発現制御機能も有することを示唆するものである。そこで我々は先行研究として、H2AX の欠損細胞における遺伝子発現レベルの変化を、RNA シークエンスによる網羅的な解析によって評価した。その結果、多くの遺伝子発現が H2AX 欠損によって変化していたが、中でも驚くべきことに、DNA 損傷の相同組換え修復に関与する複数の遺伝子の発現が有意に上昇していることが明らかとなった (未発表データ)。さらに、我々はデータベースを用いた転写因子同定解析を行った結果、これら相同組換え修復関連遺伝子の発現制御を行う候補転写因子として、上皮間葉系転換経路の転写因子として知られる ZEB1 やクロマチンリモデリング因子としての機能が示唆される ARID3A の関与が示された (未発表データ)。がん細胞が運動性や浸潤性などの形質を獲得する上皮間葉系転換機構は、がん転移において重要であり、ZEB1 を中心とした転写因子によって誘導されることが知られている。興味深いことに、前述の Weyemi らの研究では、H2AX によって ZEB1 のプロモーター領域が制御されており、がん細胞の上皮間葉系転換に H2AX が関与していることを示している。

つまり、我々の予備的な実験データは、①H2AX が遺伝子発現制御に関わっていること、②H2AX によって相同組み換え修復タンパク質の遺伝子発現が制御されていること、③H2AX による修復タンパク質の発現制御は上皮間葉系転換関連転写因子 ZEB1 に依存する可能性があること、そして④H2AX が ZEB1 制御を介して上皮間葉系転換に関わる遺伝子を発現制御していること、という、これまでに全く考えられなかった新しい遺伝子発現制御システムの存在を示唆する非常に重要なデータであることがわかる。そこで、本研究計画では、“H2AX はどのようにして遺伝子発現制御を行っているのか”、この間に答えることを最終目的として、H2AX による遺伝子発現制御と DNA 損傷応答機能および上皮間葉系転換機能の分子メカニズムを解明することを目指した。

3. 研究の方法

先行研究として、H2AX の欠損細胞における遺伝子発現レベルの変化を、網羅的に解析した結果、DNA 損傷の相同組換え修復に関与する遺伝子の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。そこで、H2AX による遺伝子発現制御のメカニズムを解明するために本研究では以下の方法で研究を行った。

(1) H2AX 欠損によって発現上昇する相同組換え因子の特定

野生型 H2AX を有するマウス胎児線維芽細胞および H2AX をノックアウトした MEF 細胞を用いて RNA シークエンスで発現変化が見られた遺伝子のタンパク質レベルでの発現変化をウェスタンブロット法により評価した。相同組換えは姉妹染色分体の存在する S 期から G2 期に限定される修復経路であることから、細胞周期を同調した細胞でのタンパク質発現を検討した。同様の実験は、マウス細胞だけでなくヒト大腸がん細胞 HCT116 についても行い、H2AX による

遺伝子発現制御機構の特異性や普遍性について検討した。タンパク質発現変化が確認された因子については、それぞれの遺伝子プロモーター領域のクロマチン構造についてクロマチン免疫沈降法を用いて評価した。

(2) H2AX 依存的遺伝子発現制御による上皮間葉転換誘導メカニズムの検討

H2AX 欠損によって相同組換え修復経路のほかに、上皮間葉転換にかかわる遺伝子の発現レベルに変化が認められたことから、H2AX 依存的に発現制御を受ける上皮間葉転換経路因子および細胞接着制御因子の特定を行った。H2AX 野生型細胞およびノックアウト細胞を用いてタンパク質の発現レベルを評価した。

4. 研究成果

(1) H2AX 欠損によって発現上昇する相同組換え因子の特定

野生型 H2AX を有するマウス胎児線維芽細胞および H2AX をノックアウトした MEF 細胞を用いて、相同組換え修復に関わる BRCA2, BLM, RAD51, RPA2 のタンパク質レベルを評価した。その結果、いずれのタンパク質も H2AX 欠損によって発現が上昇していた (図 1)。同様の結果は HCT116 細胞でも認められたことから、H2AX による相同組換え修復因子の発現制御機能は少なくともヒト細胞とマウス細胞では共通した機能であるといえる。また、H2AX を過剰発現させた細胞では、BLM タンパク質等の発現が抑制されていることが確認された。これらの結果は、H2AX が相同組換え修復因子を遺伝子レベルだけでなく、タンパク質レベルでも下方制御していることを示している。

相同組換え修復因子は細胞周期依存的に発現制御されると考えられていることから、次に細胞周期を G1 期、S/G2 期に同調した細胞を用いて、相同組換え修復関連タンパク質の発現レベルの評価を行った。その結果、H2AX 欠損細胞では G1 期、early S 期における BLM タンパク質の発現が上昇傾向にある一方で、S/G2 期では発現が抑制される傾向が認められた。このことは、H2AX が細胞周期依存的な BLM タンパク質の発現制御に重要であることを示している。また、BLM および RAD51 遺伝子のプロモーター領域について、ヒストン H3K9 のアセチル化レベルをクロマチン免疫沈降法によって検討したところ、H2AX 欠損細胞ではアセチル化レベルの上昇が認められた。先行研究と同様に、相同組換え関連遺伝子においても H2AX 依存的なクロマチン制御を介した遺伝子発現制御機構の存在が確認された。今後は、定量的リアルタイム PCR などにより、細胞周期依存的な遺伝子発現変化についてより詳細な解析を行う必要がある。



図 1 H2AX 欠損 MEF 細胞での相同組換え修復関連因子の発現変化

(2) H2AX 依存的遺伝子発現制御による上皮間葉転換誘導メカニズムの検討

上皮間葉転換および細胞接着や分化に関わるシグナルタンパク質の発現レベルを H2AX 野生型 MEF 細胞および H2AX 欠損 MEF 細胞を用いて評価した結果、Wnt 経路に関わるタンパク質の発現が有意に上昇していることが明らかとなった。特に細胞接着因子である β -catenin は H2AX 欠損細胞では顕著にその分解が抑制され、核内転写因子として機能していることが示唆された。興味深いことに、H2AX のリン酸化部位である 139 番目の Ser を Ala に置換した変異体細胞においても欠損細胞同様の現象が認められたことから、H2AX のリン酸化が遺伝子発現制御に重要な機能を有する可能性が示された。H2AX が Wnt 経路に関与することを示した本成果は、H2AX が DNA 損傷発生時のゲノム安定性維持に重要であるだけでなく、DNA 損傷の有無にかかわらず細胞・生物の恒常性を維持するために重要な機能を有していることを示すものである。今後、キナーゼ阻害剤などの影響を検討することで、H2AX によるクロマチン構造制御を介した遺伝子発現制御メカニズムの詳細を検討していく予定である。

<引用文献>

Weyemi U, Redon CE, Choudhuri R, Aziz T, Maeda D, Boufraquech M, Parekh PR, Sethi TK, Kasoji M, Abrams N, Merchant A, Rajapakse VN, Bonner WM. The histone variant H2A.X is a regulator of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun.* 2016 Feb 15;7:10711.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Sakama Sae, Kurusu Keisuke, Morita Mayu, Oizumi Takashi, Masugata Shinya, Oka Shohei, Yokomizo Shinya, Nishimura Mayumi, Morioka Takamitsu, Kakinuma Shizuko, Shimada Yoshiya, Nakamura Asako J.	4. 巻 12
2. 論文標題 An Enriched Environment Alters DNA Repair and Inflammatory Responses After Radiation Exposure	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.760322	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柳澤竜輝、大泉昂之、高橋昭久、中村麻子
2. 発表標題 模擬微小重力下におけるH2AX依存的Wntシグナル経路制御メカニズムの解析
3. 学会等名 日本宇宙生物科学会第37回大会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

茨城大学理工学研究科中村麻子研究室ホームページ http://asakolab.sci.ibaraki.ac.jp/index.html
--

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	田内 広 (Tauchi Hiroshi)		
研究協力者	村谷 匡史 (Muratani Masafumi)		

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