

令和 6 年 5 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14751

研究課題名（和文）化学修飾を利用した二本鎖切断によるクロマチンの動的変化解析

研究課題名（英文）Novel chromatin dynamics analysis exploiting double strand cleavage on DNA

研究代表者

橋谷 文貴（Hashiya, Fumitaka）

名古屋大学・物質科学国際研究センター・助教

研究者番号：30846423

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は光照射によりヌクレオソーム上のDNAに二本鎖切断を誘導し、その挙動の確認を試みるものである。二本鎖切断は致命的なDNA損傷の一つであり細胞内でこれが起こった場合、直ちにDNA複製が停止し修復系が働くことが知られている。本研究ではこれについて詳細に調べるため、独自に開発した光切断修飾DNAを用いて任意のタイミングでDNA二本鎖切断を起こし修復の様子を観察した。2'位にセレノ基とニトロベンジル基修飾を施すことで光切断DNAの合成を達成し、細胞内における鎖切断を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA二本鎖切断は最も致命的なDNA損傷であり細胞死や発癌につながる事が知られている。二本鎖切断が起こると周辺にヒストンバリエーションであるH2A.Xがリン酸化されたH2A.Xがマーカーとして集積することはわかっているものの、詳しい集積メカニズムは不明である。詳細な研究を行うためには任意のタイミングで二本鎖切断を起こせるin vitro実験系の構築が求められており、本研究では化学修飾DNAを用いることでこれを達成した。また細胞をもちいたin vivoにおいても光切断の導入が可能でありDNA安定性、修復系の検討に応用可能な技術であると言える。

研究成果の概要（英文）：This study aims to induce double-strand breaks (DSBs) in nucleosomal DNA through light irradiation and to observe their behavior. Double-strand breaks are one of the most lethal forms of DNA damage, and when they occur within cells, DNA replication immediately halts, triggering the activation of repair mechanisms. To investigate this phenomenon in detail, we used a uniquely developed photo-cleavable modified DNA to induce DSBs at specific timings and monitored the repair processes. By incorporating seleno and nitrobenzyl groups at the 2' position, we successfully synthesized photo-cleavable DNA and confirmed the occurrence of breaks within cells.

研究分野：ケミカルバイオロジー

キーワード：DNA光切断 DNA二本鎖切断 ニトロベンジル光保護基

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の DNA はヒストンタンパク質に巻き取られてヌクレオソームを形成し、これの集合体であるクロマチンとして存在している。ヌクレオソームの形成位置移動やヒストンバリエーションの置換によってクロマチンは動的に変化し、遺伝子発現制御や遺伝情報の保持に関与している。特に DNA の修復において重要であり、二本鎖切断が生じた部位には γ H2AX とよばれるヒストンバリエーションが配置され、これを足掛かりに種々の修復タンパク質が集積し、修復の完了と共に γ H2AX が取り除かれることが知られている。しかしながらこれらの知見は主に細胞の顕微鏡観察から得られており、詳細なメカニズムについては不明な点が多い。特に放射線照射によって引き起こされた二本鎖切断を観察することが多く、切断位置の制御ができないため γ H2AX の詳細な挙動解析が困難である。このことから DNA 二本鎖切断修復のメカニズムの解明には光照射によって特定の位置で DNA 二本鎖切断を起こす実験系の構築が必要である。

2. 研究の目的

本研究では真核細胞における DNA 修復メカニズムの一端を解明することを目的とし、光照射によって任意のタイミングで DNA 二本鎖切断を起こす実験系とこれを利用した DNA 二本鎖切断修復系の構築を行う。我々は 2' 位に Se とニトロベンジル光保護基を導入することで光照射によって切断される化学修飾 DNA の開発に成功したため、これを用いた *in vitro*, *in vivo* における DNA 二本鎖切断系の構築とこれを利用した二本鎖切断修復のメカニズムの解明を行う実験系の構築を試みた。

3. 研究の方法

2' 位に Se とニトロベンジル光保護基を導入したホスホロアミダイトの合成に成功しているため、これを DNA 固相合成に用いることで任意の位置で光切断を起こす DNA の合成を行った。相補鎖部分も同様に合成することで光照射によって二本鎖切断を起こす DNA 断片を用意できる。またこの化学修飾は切断前の構造では DNA ポリメラーゼの伸長を阻害する。よってこれを PCR のプライマーとして用いることで、接着末端の形成が可能となる。さらにこの接着末端部分は光照射によって切断可能である。よって接着末端を介して PCR 産物を連結することで任意の位置において二本鎖切断を起こす長鎖 DNA の作成も可能となる (図 1a)。セルフライゲーションをさせることで環状 DNA を直鎖状 DNA に変換することも可能であり、後述の DNA 二本鎖切断の修復実験ではこれを利用した。

二本鎖切断の確認は *in vitro* 実験系においてはゲル電気泳動によるバンドシフトで確認した。一方で細胞を用いた *in vivo* 実験系では FAM と Cy5 を導入した DNA 断片を作成し、FRET によって鎖切断を検出した。また導入する DNA 断片の末端部分に相同配列を配置することで二本鎖切断の修復についても分析を試みた。この場合、プロモーターとレポーターをコードした環状 DNA を用意し、光照射による切断と直鎖化によって相同組み換え修復 (HDR) を起こし、レポーターの発現によって修復を評価した (図 1b)。

4. 研究成果

まず初めに緩衝液中で 2' 位に Se とニトロベンジル光保護基を導入した DNA の切断条件について検討を行った。ゲル電気泳動の結果から 4 mW/cm²、365 nm の光照射を 10 分行うことで 97% の効率で光切断が起こることが確認され、本化学修飾を用いることで定量的な光切断を実現できることが分かった (図 2a)。続いて同様の切断が細胞中でも進行することを確認するため、光切断 DNA の両端に FAM と Cy5 を導入し、FRET による切断確認を行った。こちらの実験で

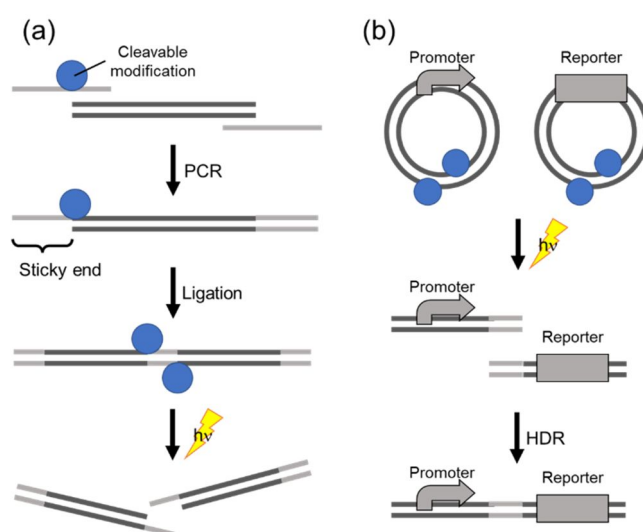


図 1 (a) 光切断を起こす二本鎖 DNA (b) 光切断と相同組み換え修復を利用したレポーター発現

は蛍光特性の変化から HeLa 細胞内において定量的な光切断を確認できた(図 2b)。最後に照射による切断と修復を確認するためプロモーターとレポーターをコードした環状 DNA 断片を用意し、照射によって切断と修復が起こるとプロモーターとレポーター間で相同組み換え修復が起こる実験系の構築を行った。プロモーターとしては CMV プロモーター、レポーターとしては緑色蛍光タンパク質である emGFP を利用し、内部に光切断修飾をもつ環状 DNA を用意した。これらを HeLa 細胞に導入し、照射による DNA 切断と相同組み換え修復を試みたが、種々の条件を試みたにもかかわらず、相同組み換え修復とレポーターの発現は確認できなかった。FRET の結果から鎖切断は起こっていることが示唆されているため配列設計に課題があると考えられる。

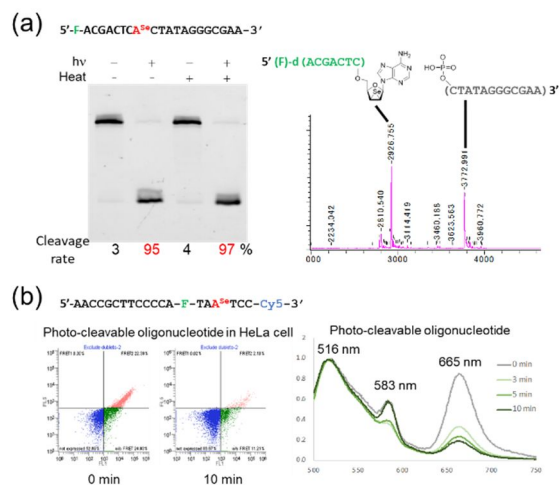


図 2 (a) *in vitro* における光切断(b) *in vivo* における光切断

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 0件）

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Fumitaka Hahsiya, Hiroshi Sugiyama | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 A novel method for locating nucleosomes by exploiting 5-bromouracil, pyrene-modified histone, and photoirradiation | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Photomedicine and photobiology | 6. 最初と最後の頁 13-16 |
| 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 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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 平岡陽花、村瀬裕貴、阿部奈保子、吉田祐希、橋谷文貴、阿部洋 |
| 2. 発表標題 長鎖DNAの細胞内ビルドアップを志向したポスト切断PCRプライマー |
| 3. 学会等名 「細胞を創る」研究会15.0 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 平岡陽花、村瀬裕貴、阿部奈保子、吉田祐希、橋谷文貴、阿部洋 |
| 2. 発表標題 長鎖DNAの細胞内ビルドアップを志向した、細胞内光切断が可能なポスト切断PCRプライマーの開発 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 橋谷 文貴・恩田 馨・野村 浩平・Gao Yiuno・村瀬 裕貴・中本 航介・稲垣 雅仁・平岡 陽花・阿部 奈保子・木村 康明・岡 夏央・寺井 悟朗・浅井 潔・阿部 洋 |
| 2. 発表標題 化学修飾プライマーを用いた任意の接着末端作成と長鎖DNAの連結 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 橋谷文貴・恩田馨・野村浩平・GaoYiuno・村瀬裕貴・中本航介・稲垣雅仁・平岡陽花・阿部奈保子・木村康明・阿部洋 |
| 2. 発表標題 化学修飾プライマーを活用した高効率で精密な長鎖DNAアセンブリ 法の開発 |
| 3. 学会等名 第15回ケミカルバイオロジー学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 橋谷文貴・恩田馨・野村浩平・GaoYiuno・村瀬裕貴・中本航介・稲垣雅仁・平岡陽花・阿部奈保子・木村康明・阿部洋 |
| 2. 発表標題 化学修飾プライマーを活用した高効率で精密な長鎖DNAアセンブリ 法の開発 |
| 3. 学会等名 日本核酸医薬学会第6年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fumitaka Hashiya, Kaoru Onda, Kohei Nomura, Gao Yiuno, Hirotaka Murase, Kosuke Nakamoto, Masahito Inagaki, Haruka Hiraoka, Naoko Abe, Yasuaki Kimura, Natsuhisa Oka, Goro Terai, Kiyoshi Asai, Hiroshi Abe |
| 2. 発表標題 Chemically modified PCR primer aiming accurate and efficient DNA assembly |
| 3. 学会等名 「細胞を創る」研究会14.0 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Fumitaka Hashiya, Kaoru Onda, Kohei Nomura, Gao Yiuno, Hirotaka Murase, Kosuke Nakamoto, Masahito Inagaki, Haruka Hiraoka, Naoko Abe, Yasuaki Kimura, Natsuhisa Oka, Goro Terai, Kiyoshi Asai, Hiroshi Abe |
| 2. 発表標題 Chemically modified PCR primer aiming accurate and efficient DNA assembly |
| 3. 学会等名 ISNAC2021 第48回国際化学シンポジウム日本核酸化学会第5回年会(国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 橋谷 文貴・恩田 馨・野村 浩平・Gao Yiuno・村瀬 裕貴・中本 航介・稲垣 雅仁・平岡 陽花・阿部 奈保子・木村 康明・岡 夏央・寺井 悟朗・浅井 潔・阿部 洋 |
| 2. 発表標題 高精度かつ高効率なDNA連結を実現する光保護化学修飾プライマー |
| 3. 学会等名 日本化学会第102春季年会 |
| 4. 発表年 2021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 |
|---------|---------|
| | |