

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23651047

研究課題名（和文）DNA 損傷クロマチンのダイナミクスがもたらす細胞多能性獲得の新機軸

研究課題名（英文）The role of DNA damage induced chromatin dynamics in the establishment and maintenance of pluripotency of stem cells

研究代表者

井倉 正枝（IKURA MASAE）

京都大学放射線生物研究センター、研究員

研究者番号：40535275

研究成果の概要（和文）：DNA 損傷応答シグナルが、生理的な状況下において細胞の多能性獲得に関与していることが示されている。本課題では、損傷クロマチンの動的変化を介して DNA 損傷応答シグナルを制御する TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体に着目し、TIP60 によるクロマチンの動的変化が、細胞の多能性獲得に関与するか否かを検証した。その結果、TIP60 は、iPS 細胞などの多能性獲得には関与しないことが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We have previously shown that TIP60 histone acetyltransferase complex regulates histone H2AX eviction upon DNA damage, which facilitate DNA damage response signaling. In this study, we tested whether chromatin dynamics via H2AX regulated by TIP60 is involved in the establishment or maintenance of pluripotency of stem cells including iPS cells. As a result, we found that TIP60 is not involved in the establishment of pluripotency of iPS cells.

交付決定額

（金額単位：円）

|       | 直接経費      | 間接経費    | 合計        |
|-------|-----------|---------|-----------|
| 交付決定額 | 3,000,000 | 900,000 | 3,900,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：TIP60 ヒストンアセチル化酵素、ヒストン H2AX、細胞の多能性

## 1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷応答シグナルは、放射線などの DNA 損傷による染色体の不安定化を解消するように働くことが知られているが、最近、損傷応答シグナルの制御因子の一つであるリン酸化酵素 ATR を細胞に導入すると、DNA 損傷を伴わずに細胞が老化するという知見が報告された (Toledo, L. *et al. Genes Dev.* 2008)。このことは生理的条件下においても、DNA 損傷応答シグナルが、細胞応答を引き出すことができることを示している。

申請者らは、TIP60 ヒストンアセチル化酵素

が H2AX のアセチル化とユビキチン化を制御し、ヒストン H2AX をクロマチンから放出し、DNA 損傷応答シグナルを活性化することを明らかにした。(Ikura, T. *et al. Mol Cell Biol.* 2007)。また TIP60 は、Mouse Embryonic Stem cells (ES cells) の多分化能の維持に関与していることが示されており、まさに TIP60 を介したシグナルネットワークが、DNA 損傷シグナルのみならず細胞分化シグナルとしても働いていることが伺える。

iPS 細胞の研究は、わずか 4 種類の転写因子 Oct3/4, Sox2, c-Myc, Klf4 によって分化し

た体細胞から多能性が生まれることを実証した画期的なものである。しかしながら iPS 細胞化への効率はいわゆる低く、iPS 細胞を実際の医療に応用展開するためにはこの iPS 細胞化の効率を上げるという問題はどうしても解決しなければならない事柄である。最近、p53 の機能を阻害するなど、染色体の不安定化がその効率を上げるという報告がなされ(Hong, H. et al. Nature, 2009., Utikal, J. et al. Nature, 2009, Marion RM et al. Nature, 2009, Li H et al., Nature, 2009, Kawamura T, et al. Nature, 2009)、染色体の不安定化が iPS 細胞化を促進することが示唆された。しかし、今までのところ、染色体の不安定化がどのようなメカニズムで iPS 細胞化を誘導するのかについては未だ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本申請課題では、TIP60 によって引き起こされるヒストン H2AX のクロマチンからの放出という、申請者らが独自に見出した DNA 損傷応答シグナルが、生理的な条件下では、染色体の不安定を促し、その結果、転写カスケードが活性化されることにより iPS 細胞の多能性獲得能が上昇することを検証する。そして iPS 細胞化の分子機構を電離放射線によるクロマチン動態制御の視点から解明する。

## 3. 研究の方法

平成 23 年度において申請者は、H2AX のクロマチンからの放出を促す TIP60 ヒストンアセチル化酵素を既存の iPS 細胞誘導因子群と共に発現させ、TIP60 が iPS 細胞化を促進するかどうかを検討する。平成 24 年度は、予想されるクロマチン構造の脱凝集による変化は、ヘテロクロマチン領域のリピート配列の定量 PCR、脱抑制により生じる転写活性はマイクロアレイ実験を行うことにより検討する。前年度の結果をもとに行うが、結果が予想どおりであれば、ヒストン H2AX のアセチル化変異遺伝子を発現させ、生理的条件下で iPS 細胞の多能性獲得に抑制的に働くかどうかを多能性維持のマーカーである Nanog の定量 PCR で検討する。またこれまで iPS 化に必要とされている因子と TIP60 とで多能性獲得能を比較し、iPS 化の効率を検討する。

## 4. 研究成果

我々は、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体が、ヒストン H2AX のアセチル化を行い、DNA 損傷領域のクロマチンから H2AX の放出を促すことを見出している。H2AX のクロマチンからの放出は、損傷領域のクロマチンの構造変換を促していると考えられる。この H2AX の動的な変化は、DNA 損傷のない、生理的な条件下では H2AX を含むクロマチンを弛緩させ、一過的に染色体の不安定化を招く可能性がある。一方、iPS 細胞の誘導は、p53 のノックダウンなどによる染色体の不安定化によって促進されることが明らかにされている。これまでに我々は、TIP60 の発現が iPS 細胞誘導を促すかの検討をおこなったが、結果は、TIP60 は、iPS 細胞の誘導には関与せずむしろ iPS 細胞の多能性の維持に関与している可能性が高いことを示唆するものであった。この現象が、TIP60 による H2AX のアセチル化によるものかについては現在検討中である。また c-Myc を取り除いた条件で TIP60 を発現させて TIP60 が c-Myc の代わりに iPS 細胞の誘導を促すかについては、TIP60 の発現が、cMyc の機能を補填することはなかった。

H2AX をクロマチンから放出させるためには TIP60 がクロマチンに結合する必要があるが、これまでの研究から我々は、TIP60 のクロマチンへの結合を誘導する因子を TIP60 複合体の構成因子から見出しており、この因子の過剰発現が iPS 細胞の維持に関与しているか否かについても検討していく予定であるが、この検討に加え、LacO 配列をタンデムに結合させた遺伝子を染色体に組み込み、LacI に結合させた TIP60 を発現させてクロマチンに結合する TIP60 の濃縮や細胞でのノックアウトを可能にするテーレンを用いた手法なども取り入れて iPS 細胞の維持への影響を詳細に検討していきたい。これらの実験結果をもとに期間内での終了は果たせなかったが、当初の予定どおり、ヘテロクロマチン領域のリピート配列の定量 PCR、脱抑制により生じる転写活性におけるマイクロアレイ実験などを継続して行う予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Takaku, M., Tsujita, T., Horikoshi, N., Takizawa, Y., Qing, Y., Hirota, K., Ikura, M., Ikura, T., Takeda, S., Kurumizaka, H. Purification of the human SMN-GEMIN2 complex and assessment of its stimulation of RAD51-mediated DNA recombination reactions (2011). *Biochemistry* 50, 6797-6805.

〔学会発表〕 (計 7 件)

1. Masae Ikura, Ryo Matsuda, Tsuyoshi Ikura

The role of chromatin dynamics in DNA damage-induced checkpoint activation 第 3 回国際シンポジウム 広島大学原爆放射線医科学研究所 2013 年 2 月 12 日

2. 松田俊、足立淳、井原賢、田沼延公、島礼、井倉正枝、井倉毅、松田知成 プルビン酸キナーゼ M2 はダイオキシン受容体の活性化補助因子である 第 35 回分子生物学会年会 2012 年 12 月 14 日

3. 町田晋一、高久誉大、小林航、越阪部晃永、立和名博昭、鈴木秀和、浦聖恵、井倉正枝、井倉毅、田代聡、胡桃坂仁志 クロマチン高次構造上における相同組換え反応の解析 第 35 回分子生物学会年会 2012 年 12 月 12 日

4. 井倉正枝、松浦嘉奈子、田代 聡、島 弘季、松田 涼、五十嵐和彦、井倉 毅 : 「The role of histone H2AX eviction in DNA damage-induced checkpoint activation」 第 34 回日本分子生物学会年会 ワークショップ 2011 年 12 月 15 日横浜

5. Masae Ikura, Satoshi Tashiro, Hiroki Shima, Kazuhiko Igarashi and Tsuyoshi Ikura. : 「The role of chromatin dynamics in DNA damage-induced checkpoint activation」 広島大学原爆放射線医科学研究所創立 50 周年記念国際シンポジウム 2012 年 2 月 20-21 日

6. 足立淳、鳴海良平、佐野聖三、久家貴寿、白水 崇、松本雅記、中山敬一、井倉正枝、井倉 毅、高田 穰、朝長毅 : 「リン酸化プ

ロテオミクスを用いた新規 DNA 損傷初期応答キナーゼの探索」 第 34 回日本分子生物学会年会 12 月 15 日 横浜

7. Takaku, M., Tsujita, T., Horikoshi, N., Takizawa, Y., Qing, Y., Hirota, K., Ikura, M., Ikura, T., Takeda, S., Kurumizaka, H. : 「SMN-GEMIN2 complex stimulates the RAD51-mediated recombination reactions」 第 34 回日本分子生物学会年会 12 月 15 日 横浜

〔図書〕 (計 1 件)

遺伝情報の発現制御 –転写機構からエピジェネティクスまで- 著 David S. Latchman (第 3 章翻訳、松田 俊、井倉正枝、井倉 毅)

6. 研究組織

(1)研究代表者

井倉 正枝 (IKURA MASAE)

研究者番号 : 40535275