

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23810015

研究課題名（和文） ヒストンバリエント H2AZ のアセチル化を介した損傷クロマチンのダイナミクス制御

研究課題名（英文） The role of acetylation of histone variant H2AZ in chromatin dynamics upon DNA damage

研究代表者

松田 涼 (MATSUDA RYO)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：70614155

研究成果の概要（和文）：

アセチル化を介した損傷クロマチンのダイナミクス制御を明らかとするため、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子である TAP54 複合体の精製を行った。結果、TIP60 複合体に含まれない新規アセチル化酵素が TAP54 複合体に含まれ、ヒストンバリエント H2AZ のアセチル化を行う可能性が考えられた。このことからアセチル化を介した TIP60 複合体と TAP54 複合体の連携が、損傷クロマチンのダイナミクス制御の新たな局面として見出された。

研究成果の概要（英文）：

To understand the role of acetylation in chromatin dynamics upon DNA damage, we purified the DNA helicase TAP54, which is the component of the TIP60 histone acetyltransferase (HAT) complex, from nuclear extract of HeLa cells. We found that TAP54 complex has HAT activity. Mass spectrometry (MS) analysis indicated that histone acetyltransferase, which is different from TIP60, and histone variant H2AZ were identified in the TAP54 complex. Since we have already shown that TIP60 acetylates histone variant H2AX upon DNA damage, these findings suggest that the cross talk between acetylation of H2AX and H2AZ has important roles in DNA damage response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 23 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
平成 24 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：放射線・化学物質影響科学

キーワード：TIP60 複合体、ヒストン H2AX、ヒストン H2AZ、アセチル化、DNA 損傷応答

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

### 1. 研究開始当初の背景

細胞が持つ染色体は放射線などによって、常に損傷の危機にさらされており、細胞はこのような DNA 損傷を修復する機構を有している。しかし、DNA 損傷をいかに認識し、DNA を修復するかは、DNA 修復研究における未だ解明されていない課題である。最近の知見として、DNA 損傷を感知するセンサータンパク質がクロマチンに結合することが、DNA 損傷シグナルの活性化に必須であることが示されている。これらのことから、DNA 損傷初期応答シグナルを解明するためには、DNA 損傷領域におけるクロマチンの動態を明らかにする必要がありと考えられる。申請者は DNA 初期応答におけるヒストンのアセチル化を介した損傷クロマチンの制御機構に注目した。これまでに申請者のグループは TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体が DNA 損傷依存的にヒストンバリエント H2AX をアセチル化し、クロマチンから放出させることを示している。この TIP60 複合体の損傷クロマチンにおけるアセチル化の機能をさらに詳細に解析するために、TIP60 複合体に含まれる DNA ヘリカーゼである TAP54 に着目し、TAP54 複合体の精製を行った。その結果、TAP54 複合体は高いアセチル化活性を有しているものの、予想外にも Tip60 ヒストンアセチル化酵素は含まれていなかった。また TAP54 複合体には、ヒストンバリエント H2AZ が含まれることから、TAP54 複合体には TIP60 とは異なるアセチル化酵素が含まれており、その酵素が H2AZ をアセチル化することが示唆された。

### 2. 研究の目的

本課題ではヒストンバリエント H2AZ のアセチル化の可能性を検討し、Tip60 による H2AX のアセチル化との関係を明らかにすることによって、DNA 損傷応答シグナルにおけるアセチル化の役割を明らかにすることを目的としている。

### 3. 研究の方法

#### (1) TAP54 複合体精製

HeLa 細胞から TAP54 複合体の精製を行い、マスペクトロメトリー解析により、新規アセチル化酵素を同定する。

#### (2) 新規アセチル化酵素の DNA 損傷修復への関与

Micro irradiation、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) により、新規アセチル化酵素の DNA 損傷修復への関与を明らかにする。

#### (3) 新規アセチル化酵素とヒストンバリエント H2AZ との関与

新規アセチル化酵素とヒストンバリエント H2AZ との関与を解析する為、それぞれのリコンビナントタンパク質を作成し、In vitro HAT assay により、新規アセチル化酵素が H2AZ をアセチル化するかどうかを検討する。

#### (4) 新規アセチル化酵素と Tip60 との連携の解析

Tip60 と新規アセチル化酵素との連携を解析するため、Tip60 のアセチル化変異体を発現した細胞内における新規アセチル化酵素の DNA 損傷領域への集積を ChIP により解析する。

### 4. 研究成果

TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体の損傷クロマチンにおけるアセチル化の機能をさらに詳細に解析するため、HeLa 細胞から TAP54 複合体の精製を行い、グリセロール密度勾配法により、より詳細な解析を起こったところ、TAP54 には非常に高い HAT 活性を有していることを確認した。この結果から、この HAT 活性は Tip60 アセチル化酵素によるものではないかと予想されたが、予想に反して、Tip60 アセチル化酵素は含まれていないことが示された。

TAP54 複合体のヒストンアセチル化酵素活性

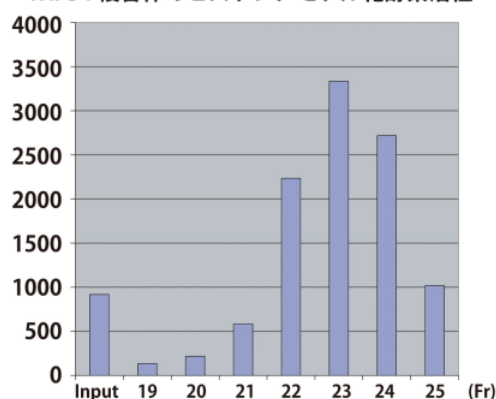


図 1 : グリセロール密度勾配精製後の TAP54 複合体を用いたヒストンアセチル化酵素活性

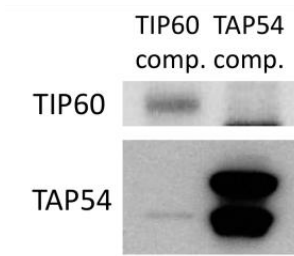
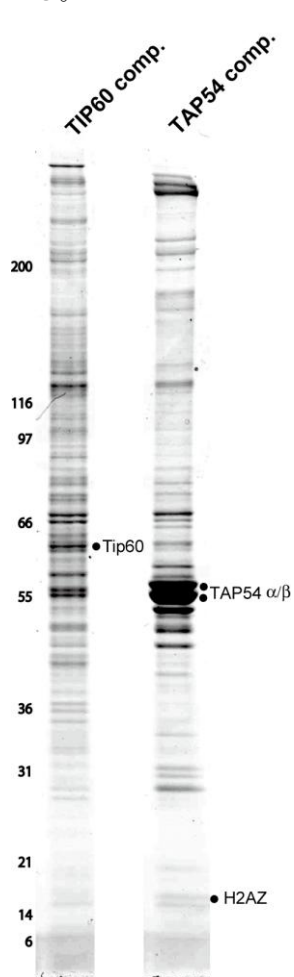


図2：TIP60とTAP54複合体を用いたTIP60とTAP54のWestern Blotting

TAP54複合体には、ヒストンバリエントH2AZが含まれていることから、TAP54複合体に含まれるTip60とは異なるアセチル化酵素はH2AZをアセチル化している可能性が考えられた。そこで、精製したTAP54複合体からマスマスペクトロメトリー解析を行ったところ、Tip60とは異なるアセチル化酵素と考えられるいくつかのアセチル化酵素を同定した。現在までに大腸菌からアセチル化酵素を精製し、In vitro HAT assayにより、H2AZをアセチル化するかどうかの検討を行っている。



これまでに複合体同士の比較解析の結果から、新規タンパク質とH2AZとの関連の解析を進めたが、さらにTip60と新規アセチル化酵素の関連を解析するため、Tip60変異体を発現した細胞で新規アセチル化酵素のChIPを行い、新規アセチル化酵素とTip60のDNA損傷領域のクロマチンへの結合におけるヒエラルキーについて現在解析を進めている。

図3. TIP60およびTAP54複合体のクマシー染色

## 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)

- ①Maruyama EO, Hori T, Tanabe H, Kitamura H, Matsuda R, Tone S, Hozak P, Habermann FA, von Hase J, Cremer C, Fukagawa T, Harata M. The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei. (2012) *J. Cell Sci.* 125, 3739-3743. DOI: 10.1242/jcs.103903.

〔学会発表〕(計3件)

- ①松田涼、井倉正枝、原田昌彦、田代聡、井倉毅

「DNA損傷応答におけるヒストンH2AXとH2AZのアセチル化クロストーク」  
放射線影響学会 東北大学 2012年9月7日

- ②高橋裕一郎、松田涼、北村大志、西島仁、柴原慶一、原田昌彦

「ヒトアクチンファミリー遺伝子ノックアウト細胞を用いたヒトINO80複合体のゲノム安定性維持および酸化ストレス応答における機能解析」  
第35回分子生物学会年会  
2012年12月11日

- ③Masae Ikura, Ryo Matsuda, Tsuyoshi Ikura

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

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 涼 (MATSUDA RYO)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：70614155