

機関番号：14301
 研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20590272
 研究課題名(和文) DNA 損傷応答における TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体のダイナミクス
 研究課題名(英文) Dynamics of TIP60 histone acetyltransferase complex in DNA damage response
 研究代表者 井倉 毅 (IKURA TSUYOSHI)
 京都大学・放射線生物研究センター・准教授
 研究者番号：70335686

研究成果の概要(和文)：DNA 損傷応答における TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体のダイナミクス

我々は、TIP60ヒストンアセチル化酵素複合体のDNA損傷応答における役割を明らかにするために、その構成因子を探索した。その結果、プロモドメイン蛋白質p120を同定した。これまでの実験結果から、p120が、DNA損傷依存的にヒストンH2AXに結合することを明らかにし、さらにその結合によってユビキチン化酵素UBC13が損傷クロマチンへ誘導されることを示した。

研究成果の概要(英文)：Dynamics of TIP60 histone acetyltransferase complex in DNA damage response

To elucidate the role of the TIP60 histone acetyltransferase complex in DNA damage response, we analyzed the component of TIP60 complex by MS analysis. We identified the p120 bromodomain protein in the TIP60 complex. We found that p120 binds the acetylated histone H2AX in vitro and is required for the recruitment of UBC13 to damaged chromatin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、医化学一般

キーワード：DNA 損傷応答、TIP60 ヒストンアセチル化酵素、ヒストン H2AX、アセチル化、ユビキチン化、プロモドメイン、機能的蛋白質複合体

1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造はすべてのDNA代謝に対して抑制的に働くため、ゲノム損傷においても修復関連因子が損傷部位にアクセスするためにはクロマチンの構造変換が必要である。これまでヒストンアセチル化酵素に代表される数多くのクロマチン構造変換因子がク

ローニングされ、ゲノム修復においてもこれらクロマチン構造変換因子が重要な役割を持つことが次第に明らかになりつつある。特にクロマチンの構造変換機構の一つであるヒストンの化学修飾は、アセチル化、メチル化、リン酸化、あるいはユビキチン化などが知られており、これら個々の化学修飾の組み

合わせが様々なクロマチン動態を規定するヒストンコードとして働くことがクロマチン構造変換にとって重要であることが示唆されている。これまでにヒストンのアセチル化に結合する因子が幾つか同定され、プロモドメインと呼ばれる共通のモチーフを持つことが明らかとなっている。これらのプロモドメインを持つ因子が他の修飾酵素をリクルートし、ヒストンコード形成のメカニズムの一端を担っていると考えられる。

これまでに申請者らは、TIP60ヒストンアセチル化酵素複合体がゲノム損傷応答に関与していることを報告した(Ikura, T. *et al.*, *Cell* 2000)。さらにTIP60複合体がいかなるメカニズムでゲノム損傷応答機構に関与しているかを明らかにするために、TIP60をDNA損傷下で精製し、TIP60複合体が、ヒストンH2AXと結合することを見出した。またX線によりDNA損傷を与えたHeLa細胞よりH2AXを精製し、MS解析を行うことによりH2AXがアセチル化およびポリユビキチン化されることが明らかとなった。興味深いことにH2AXの損傷依存的なポリユビキチン化はアセチル化に依存しており、ゲノム損傷応答におけるH2AXの新たなヒストンコードを形成していることが示唆された(Ikura, T. *et al.* *Mol Cell Biol.* 2007)。さらにDNA損傷により促進されるH2AXのアセチル化とポリユビキチン化はTIP60ヒストンアセチル化酵素とUBC13 ユビキチン結合酵素により制御され、H2AXの損傷クロマチンからの放出に関与していることをFRAPとmicro-irradiationを用いた方法により明らかにした(Ikura, T. *et al.* *Mol Cell Biol.* 2007)。このH2AXのクロマチンからの放出は、損傷直後の現象であり、損傷クロマチンの構造変換の一端を担っている可能性が高い。しかしながら如何なるメカニズムで損傷依存的なH2AXのアセチル化がポリユビキチン化を誘導し、損傷クロマチンからの放出を促すのか、またH2AX放出の意義については不明な点が多い。

2. 研究の目的

本申請課題では、ゲノム損傷下で精製されたTIP60およびH2AX複合体よりプロモドメイン因子を同定することによりH2AXのアセチル化がいかにポリユビキチン化を誘導するのかを明らかにする。さらに同定したプロモドメイン因子を複合体として精製し、その構成因子をMS解析により同定することによりH2AXの損傷クロマチンからの放出の詳細なメカニズムに迫り、その生物学的な意義

を解明する。

3. 研究の方法

- a.すでに精製されたTIP60およびH2AX複合体のコンポーネントをMS解析することによりプロモドメインモチーフを保持した因子を同定する。
- b.同定したプロモドメイン因子についてのノックダウン細胞を作製し、損傷依存的なH2AXのポリユビキチン化への影響を検討する。同時に放射線に対する感受性も検討する。またH2AXのポリユビキチン化を制御する酵素UBC13との結合を解析する。
- c.プロモドメイン因子とアセチル化されたH2AXとの結合活性をin vitroで検討する。同定したプロモドメイン因子の複合体精製とその構成因子のMS解析を行う。

4. 研究成果

我々は、TIP60ヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子としてプロモドメイン蛋白質p120がDNA損傷依存的にヒストンH2AX複合体に含まれることを明らかにした。また我々は、p120ノックダウン細胞を作製し、このノックダウン細胞が放射線感受性を示すこと、さらにこの細胞では、ユビキチン化酵素UBC13と損傷クロマチンとの結合が阻害されることを生化学的に明らかにした。またp120蛋白質のプロモドメイン領域の組換え蛋白質を作製し、H2AXのアセチル化ペプチドとの結合実験を行い、p120が直接H2AXのアセチル化に結合することを明らかにした。今後は、この知見をもとにクロマチン免疫沈降法によってp120がDNA二本鎖切断によるUBC13のDNA損傷領域への誘導に関与するか否かを詳細に解析する必要がある。H2AXのクロマチンからの放出は、ヒストンシャペロンによっても制御されることを我々は示しているが、今後は、p120とこのヒストンシャペロンとの関係を明らかにすることにより、H2AXのアセチル化を介したクロマチンからの放出のさらなる詳細な分子機構とその意義を明らかにする必要がある。P120蛋白質の複合体は、精製を終了し、現在その構成因子のMS解析を行っている。

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8件)

1. Katoh, Y, Ikura, T., Hoshikawa, Y., Tashiro, S.,

- Ohta, M., Kera, Y., Noda, T., and Igarashi, K. Methionine Adenosyltransferase II Serves As a Transcriptional Corepressor of Maf Oncoprotein. *Mol Cell*. 2011. 41, 554-566.1. 査読あり
2. Sun, J., Oma, Y., Harata, M., Kono, K., Shima, H., Kinomura, A., Ikura, T., Mizutani, S., Kanaar, R., and Tashiro, S. ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot. *PLoS ONE* 2010, 5, e13554. 査読あり
3. Niida H, Katsuno Y, Sengoku M, Shimada M, Yukawa M, Ikura M, Ikura T, Kohno K, Shima H, Suzuki H, Tashiro S, Nakanishi M. Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes Dev*. 2010, 24, 333-338. 査読あり
4. Fujimoto Y, Shiraki T, Horiuchi Y, Waku T, Shigenaga A, Otaka A, Ikura T, Igarashi K, Aimoto S, Tate SI, Morikawa K. Proline cis/trans isomerase Pin1 regulates peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} activity through the direct binding to the AF-1 domain. *J Biol Chem*. 2010, 285, 3126-32. 査読あり
5. Kitayama K, Kamo M, Oma Y, Matsuda R, Uchida T, Ikura T, Tashiro S, Ohyama, T, Winsor B, Harata M. The human actin-related protein hArap5: nucleocytoplasmic shuttling and involvement in DNA repair" *Exp. Cell Res*. 2009, 15, 206-217. 査読あり
6. Dohi, Y, Ikura, T, Hoshikawa, Y, Katoh, Y, Ota, K, Nakanome, A., Muto, A., Omura, S., Ohta, T., Ito, A., Yoshida, M., Noda, T., Igarashi, K. Bach1 inhibits oxidative stress-induced cellular senescence by impeding p53 function on chromatin. *Nature Structural & Molecular Biology*, 2008, 15, 1246-1254. 査読あり
7. Uehara, Y., Ikehata, H., Komura, J., Ito, A., Ogata, M., Itoh, T., Hirayama, R., Furusawa, Y., Ando, K., Paunesku, T., Gayle E. Woloschak, G.E., Komatsu, K., Matsuura, S., Ikura, T., Kamiya, K., Ono, T. Absence of *Ku70* Gene Obliterates X-Ray-Induced *lacZ* Mutagenesis of Small Deletions in Mouse Tissues. *RADIATION RESEARCH*, 2008, 170, 216-223. 査読あり
8. Nakagawa, T., Kajitani, T., Togo, S., Masuko, N., Ohdan, H., Hishikawa, Y., Koji T., Matsuyama, T., Ikura T., Muramatsu, M., Ito, T. Deubiquitylation of histone H2A activates transcriptional initiation via trans-histone crosstalk with H3K4 di- and tri-methylation. *Genes Dev*. 2008, 22, 37-49. 査読あり
- [学会発表] (計 14 件)
- 井倉 毅 DNA 損傷応答シグナルにおけるヒストン H2AX のダイナミクス 第 7 回宮崎サイエンスキャンプ 2011 年 2 月 26 日 宮崎市
 - 井倉 毅 DNA 損傷初期シグナルにおけるヒストンシグナルネットワークの解明 第 33 回日本分子生物学会年会 第 83 回日本生化学会大会合同大会 2010 年 12 月 7 日 神戸市
 - 井倉 毅 The role of chromatin dynamics in DNA damage-induced checkpoint activation. 日本環境変異原学会第 39 回大会 2010 年 11 月 17 日 つくば市
 - 井倉 毅 DNA 損傷応答におけるヒストン H2AX のダイナミクスとその意義 日本放射線影響学会第 53 回大会 2010 年 10 月 21 日 京都市
 - 井倉 毅 Checkpoint activation regulated by DNA damage-induced H2AX eviction 56th Annual Meeting Radiation Research Society 2010 年 9 月 29 日 Hawaii
 - 井倉 毅 損傷クロマチンの動的変化がもたらす DNA 損傷応答シグナルの活性化メカニズム 文部省化学研究費補助金、特定領域研究「染色体サイクルの制御ネットワーク」最終領域会議 2010 年 3 月 2 日 鹿児島県霧島市
 - 井倉 毅 The role of chromatin dynamics in DNA damage-induced checkpoint activation International Conference on Radiation and Cancer Biology at Nagasaki 2010 2010 年 2 月 19 日 長崎市
 - 井倉 毅 DNA 損傷応答におけるヒストン

化学修飾の役割 第 32 回日本分子生物学会
年会 2009 年 12 月 12 日 横浜市

9. 井倉 毅 Checkpoint activation regulated by DNA damage-induced H2AX eviction The 25th Radiation Biology Center International Symposium, Kyoto university 2009 年 11 月 30 日 京都市
10. 井倉 毅 The role of histone modification in DNA damage response 日本放射線影響学会 第 52 回大会 2009 年 11 月 13 日 広島市
11. 井倉 毅 DNA 損傷応答におけるクロマチン構造変換の分子機構とその役割 生命科学複合研究教育センター 講演会 福井大学 2009 年 9 月 4 日 福井市
12. 井倉 毅 DNA 損傷応答におけるクロマチン構造変換の分子機構とその役割 文部省化学研究費補助金、特定領域研究「染色体サイクルの制御ネットワーク」第 5 回領域会議 2009 年 6 月 16 日 静岡市
13. 井倉 毅 DNA 損傷応答におけるヒストンコードの解明 日本分子生物学会、2008 年 12 月 9 日 神戸市
14. 井倉 毅 DNA 損傷応答におけるクロマチンダイナミクス 弘前大学、第 13 回遺伝子実験施設シンポジウム 2008 年 6 月 20 日 青森市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井倉 毅 (IKURA TSUYOSHI)

研究者番号：70335686