

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 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010-2012

課題番号：21780086

研究課題名（和文）DNA 複製を制御するクロマチン構造変換メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of chromatin remodeling machinery required for the regulation of DNA replication

研究代表者

尾間 由佳子 (OMA YUKAKO)

東北大学・大学院農学研究科・研究支援者

研究者番号：20443997

研究成果の概要（和文）：

IN080 クロマチンリモデリング複合体の特異的構成因子である Ino80 および Arp8 にデグロンタグを導入することで、誘導的に IN080 複合体の機能を欠損することが可能な酵母株を作成した。この株を用いてゲノム安定性を解析したところ、IN080 複合体の存在とゲノム安定性維持との間に明確な相関が観察された。また核膜孔複合体やクロマチンタンパク質、複製関連因子と IN080 複合体との物理的、遺伝学的な相互作用も観察された。これにより、IN080 複合体によるゲノム安定性維持における機能の一端が示された。

研究成果の概要（英文）：

To analyze the function of the IN080 chromatin remodeling complex in DNA replication and in the maintenance of genome stability, we established Degron yeast strains in which Ino80 and Arp8 are inducibly digested. We showed that the impairment of the IN080 complex caused genome instability. We also showed physiological and genetic interactions of the IN080 complex with DNA replication factors, chromatin proteins, and nuclear pore complex. These results are important to reveal molecular mechanisms of the IN080 complex in DNA replication and the maintenance of genome stability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：農芸化学、応用生物化学

キーワード：クロマチン、DNA 複製、アクチン関連タンパク質、クロマチンリモデリング複合体

1. 研究開始当初の背景

真核生物の細胞核内で、ゲノム DNA はヒストンなどと結合したクロマチンとして存在している。DNA 複製・修復・転写などの開始・

進行には、対象となる DNA 領域を露出することが必要であり、そのためこれらのゲノム機能のエピジェネティックな制御にはクロマチン構造の変換が中心的な役割を果たして

いる。このような制御に関わる因子として、ATP 依存的クロマチン構造変換複合体やヒストンアセチル化酵素複合体が酵母からヒトまで複数報告されていた。

DNA 複製において、複製複合体が二本鎖 DNA を巻き戻しながら複製を進めていくためには、複製フォークの進行方向のクロマチン構造から DNA を露出させること、複製の終了した新生二本鎖 DNA にクロマチン構造を再構築させる必要がある。そのため、DNA 複製を制御するクロマチン構造変換複合体の存在が予想されていたが、国内外においてこれまでその実体は不明であった。研究代表者が以前より解析を行っていた INO80 複合体は、触媒サブユニットである Ino80 および複数のアクチン関連タンパク質 (actin-related protein; Arp) などを含み、出芽酵母からヒトまで保存されたクロマチン構造変換複合体である。クロマチン免疫沈降と DNA チップを組み合わせた ChIP-chip 法を用いて、研究代表者が出芽酵母 INO80 複合体が結合するゲノム領域を解析したところ、停止した複製フォークに INO80 複合体が結合することが見出され、また INO80 複合体の複製起点への結合も検出された。さらに、*ino80* 欠損株を用いた 2 次元ゲル電気泳動により、停止した複製フォークの進行再開に INO80 複合体が必要であることを示した。これらの発見に基づき、INO80 複合体がクロマチン構造変換を介して複製進行を制御していることを世界に先駆けて報告した (*Curr. Biol.*, 2008)。これは、DNA 複製におけるエピジェネティック制御機構を初めて明らかにしたものである。しかしながら、INO80 複合体はどのようにして停止した複製フォークや複製起点にリクルートされているのか、どのようなタンパク質と相互作用して機能しているのかについての詳細は不明であった。

複製フォークは、AT リピート、トリプレットリピート、リボゾーム RNA をコードする DNA 領域 (rDNA)、テロメアなど反復配列を有する DNA 領域において高頻度に停止することが知られている。このような領域ではゲノムの不安定性が多く観察されており、このゲノム不安定性が染色体切断・転座を伴うガン、トリプレットリピート病 (ハンチントン病、脆弱 X 症候群など)、老化などを引き起こす。しかし、これまでこのようなゲノム安定性の維持におけるエピジェネティック制御は全くといっていいほど解析が進んでいなかった。これらの研究代表者の研究からは、INO80 複合体が停止した DNA 複製を再開させる機能を介して、これらの反復配列領域で起こるゲノム不安定性を抑制していることが予想された。

2. 研究の目的

INO80 複合体も含め、クロマチン構造変換に関わる複合体に普遍的に含まれている構成因子としてアクチン関連タンパク質 (Arp) が知られている。研究代表者は、独創的なアプローチで Arp の研究を行い、本研究開始までに出芽酵母の 10 種の Arp のうち Arp4-9 が核に局在すること (*J. Biochem.*, 2000)、Arp4 がコアヒストンと相互作用すること (*Mol. Biol. Cell*, 1999)、出芽酵母やヒト INO80 複合体が様々なゲノム機能に関与すること (*Mol. Biol. Cell*, 2005; *Exp. Cell Res.*, in press) を報告した。クロマチンリモデリング複合体である INO80 複合体には Arp4, Arp5, Arp8 の 3 つの Arp が含まれており、これまでの Arp に関して申請者が有する知見や技術は、DNA 複製における INO80 複合体の機能の解明においても世界をリードする上で大きなアドバンテージとなる。本研究では、DNA 複製の実験材料として最も広く用いられている出芽酵母を用いて解析を行ったが、出芽酵母とヒトの INO80 複合体の機能が保存されていることを研究代表者は既に報告している。そのため、本研究でのゲノム安定性維持への INO80 複合体の関与の解析は、ゲノム不安定性によって引き起こされるガン、トリプレット病、老化などの疾病の原因や治療などの分野にも大きく貢献できる。

以上の学術的背景と、研究代表者の研究の展開を踏まえ、以下の内容を目的とした。

(1) DNA 複製開始・進行において INO80 複合体と相互作用するクロマチン関連因子の同定。INO80 複合体が複製起点および停止した複製フォークにリクルートされ機能するメカニズムを解明するために、細胞周期進行および複製フォークの停止に伴って INO80 複合体と相互作用するタンパク質を比較・精製する。これらのタンパク質を同定すると共に、INO80 複合体の機能との関連を解析する。

(2) INO80 複合体によるゲノム安定性維持の制御の解析。出芽酵母の代表的な反復配列領域である rDNA 領域をモデル系として用いることで、INO80 複合体のゲノム安定性維持への関与について解析を行う。この領域は不安定性が増大すると、繰り返しの増加や反復配列が染色体からプラスミド状 (ERC) に放出される現象が確認されている。また、この ERC 放出は細胞老化の一つの指標となっている。野生株と INO80 複合体の構成因子の欠損株について rDNA リピート長の増減や ERC の蓄積について解析することで、INO80 複合体の rDNA の複製およびゲノム安定性維持への関与について解析する。

3. 研究の方法

INO80 複合体を複製起点および停止した複製

フォークにリクルートする因子については、a) 複製起点あるいは複製フォークに存在するタンパク質を介する可能性と、b) 特定のヒストンバリエーションや修飾ヒストンを介する可能性が考えられる。Myc タグを付加した内在性の Ino80 を発現する酵母株（以下、Ino80-Myc 株）を細胞周期の各期に同調させ、抗 Myc 抗体および複製関連因子や特異ヒストンに対する抗体を用いた免疫沈降、またはクロマチン免疫沈降を行うことで、DNA 複製開始・進行において INO80 複合体と相互作用するクロマチン関連因子の同定を行った。

また、反復配列領域では DNA 複製が停止しやすい性質を持つことから、INO80 複合体がこの領域のゲノム安定性維持に寄与している可能性が考えられる。出芽酵母の代表的な反復配列領域である rDNA 領域の繰り返し長の増減や環状分子 ERC の蓄積を測定することで、INO80 複合体によるゲノム安定性維持の制御の解析を行った。

4. 研究成果

リボヌクレオチド還元酵素阻害剤であるヒドロキシウレア (HU) 存在下で複製を停止させた場合、INO80 複合体は停止した複製フォークに結合することをこれまでに示している (*Curr. Biol.*, 2008)。そこで、まず HU 存在下で INO80 複合体を免疫沈降し、同時に沈降するタンパク質を精製し、質量分析による同定を行った。その結果、複数のクロマチンタンパク質および複製関連因子が同定された。INO80 複合体は HU 存在下では複製を開始していない後期複製起点にも局在することも示されたが、この結果は複製起点に結合している複製前複合体にも INO80 複合体が相互作用している可能性を強く示唆する。

また、INO80 複合体と核膜孔複合体の遺伝的相互作用が見出された。このことは、INO80 複合体が、クロマチン構造の制御に加えて、細胞核の機能構造形成を介しても、DNA 複製やゲノム安定性維持に関与する可能性を示している。

さらに、INO80 複合体の機能を解析する目的で、Ino80 および Arp8 のデグロンタグを付加した内在性の Ino80 を発現する株も同様の解析に用いる。この株では、低温で培養後 37°C へ移行させることでタグ融合タンパク質の分解を誘導することができる。これを用い、細胞周期特異的に INO80 複合体の欠損を誘導することにより起こる DNA 複製への影響を解析し、INO80 複合体の機能欠損による DNA 複製の低下と、ゲノム安定性低下が観察された。

リピート配列を有する DNA 領域では複製が停止しがちな性質があり、ゲノムが不安定になりやすい。このような領域では INO80 複合

体が、ゲノム不安定性を抑制している可能性がある。出芽酵母 rDNA 領域は複製起点を含む 9.1 kb のリボゾーム RNA 遺伝子が約 150 回タンデムに並んだリピート配列を形成していることから、ゲノム中でも最も安定性の低い領域であり、ゲノム不安定性をテストするための良いモデルとなっている。具体的には rDNA がリピート配列を有することから相同組換えが起こりやすく、不安定性が増大した結果、ERC (extra-chromosomal rDNA circle) と呼ばれる環状 DNA を放出し、これにより細胞老化が起こると考えられている。INO80 複合体の構成因子の欠損株から放出される ERC の量を比較したところ、INO80 複合体欠損株において、ERC の増加が観察された。この結果は、INO80 複合体が rDNA リピートの安定性維持に関与することを示している。

INO80 複合体の特徴や機能は、酵母からヒトまで進化的に保存されていることから、ゲノム安定性低下によって発症するがんや遺伝病などの機能解明・治療にも、本研究の成果が応用できるものと考えられる。

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 4 件)

- ① 尾間由佳子、原田昌彦 「細胞核の構造とエピジェネティック制御」化学と生物 50、262-268 (2012) 査読無
<http://jglobal.jst.go.jp/public/20090422/201202237007967052>
- ② Oma, Y., Harata, M. Actin-related proteins localized in the nucleus: from discovery to novel roles in nuclear organization. *Nucleus* 2, 38-46 (2011) 査読有り
doi: 10.4161/nucl.2.1.14510.
- ③ Sun, J., Oma, Y., Harata, M., Kono, K., Shima, H., Kinomura, A., Ikura, T., Mizutani, S., Kanaarm, R., Tashiro, S. ATM modulates the loading of recombination proteins onto a chromosomal translocation breakpoint hotspot. *PLoS One* 5, e13554 (2010) 査読有り
doi: 10.1371/journal.pone.0013554.
- ④ Yoshida, T, Shimada, K., Oma, Y., Kalck, V., Akimura, K., Taddei, A., Iwahashi, H., Kugou, K., Ohta, K., Gasser, S.M., Harata, M. Actin-related protein Arp6 influences

H2AZ-dependent and -independent gene expression and links ribosomal protein genes to nuclear pores. *PLoS Genet* 6, e1000910 (2010) 査読有り
doi: 10.1371/journal.pgen.1000910.

[学会発表] (計 19 件)

- ① Yukako Oma “The Function of SWR1- and INO80 Chromatin Remodeling Complexes in the Spatial Positioning of DNA Double-strand Break” The 35th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan, December 12, 2012, Fukuoka
- ② Yukako Oma “Roles of actin-related proteins in chromatin function and nuclear organization” Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology, Workshop “Gene expression and Epigenetics”, May 28, 2012, Kobe
- ③ 尾間由佳子「DNA 二本鎖切断 (DSB) におけるクロマチンリモデリング複合体 INO80 複合体および SWR1 複合体の機能解析」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 13 日～16 日 (横浜)
- ④ 尾間由佳子「ヒト染色体安定性維持における INO80 クロマチンリモデリング複合体の機能解析」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 (BMB2010)、2010 年 12 月 7-10 日 (神戸)
- ⑤ 尾間由佳子「ヒト染色体安定性維持における INO80 クロマチンリモデリング複合体の機能解析」日本農芸化学会東北支部・北海道支部合同支部大会、2010 年 9 月 28 日 (仙台)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾間 由佳子 (OMA YUKAKO)

東北大学・大学院農学研究科・研究支援者
研究者番号：20443997