

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20631

研究課題名（和文）DNA損傷応答とクロマチン構造変化の連携の分子レベルでの理解

研究課題名（英文）Elucidation of molecular level of the linkage between DNA damage response and chromatin conformational changes

研究代表者

磯部 真也（Isobe, Shin-Ya）

大阪大学・大学院理学研究科・助教

研究者番号：50897147

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ヘテロクロマチンでは、その凝縮した構造から、DNA損傷時にはクロマチン構造の再編が行われた後に修復因子がアクセスできるようになる。ヘテロクロマチンの基盤を担う構造体として、R-loop（DNA-RNA hybrid）が近年着目されており、R-loopの過剰な蓄積はDNA損傷を誘発することも知られている。本課題により、ヘテロクロマチンの構造変換活性を有するAHDC1が、DNA修復に関わるタンパク質と結合すること、R-loopの解消に関わることを見出し、ヘテロクロマチンとDNA修復を結ぶのに重要な因子であると結論付けた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA修復に関わる遺伝子の変異は様々な疾患の原因となることが知られている。また、R-loop解消に関わる遺伝子の変異は、DNA複製、転写、DNA修復といったDNAの上で起こる様々な生命現象に異常が生じ、その結果として、がんや神経系の発達異常など様々な疾患の原因となると考えられている。AHDC1はDNA修復に関わるタンパク質と結合することや、R-loop解消に関わること、加えて、AHDC1変異が精神遅滞を引き起こす報告もあることから、AHDC1の機能解析が、それらの疾患の解決への糸口になり得る。

研究成果の概要（英文）：High condensed structure chromatin, it's called heterochromatin, results in a resolution of chromatin structure upon DNA damage, making it accessible to repair factors. R-loop (DNA-RNA hybrid) has recently be focused on one of structure that plays a platform of condensation in heterochromatin, and excessive accumulation of R-loop is known to induce DNA damage. Through this study, we found AHDC1, which has heterochromatin conformational conversion activity, binds to DNA repair proteins and is involved in the resolution of R-loop, and concluded that it is an important factor in linking heterochromatin and DNA repair.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ヘテロクロマチン DNA損傷修復 R-loop

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生命現象の根幹である遺伝情報を担う DNA を、正確に継承、維持、発現するために、DNA 複製、転写、DNA 損傷修復機能は必須のメカニズムである。真核生物において、DNA 複製、転写、DNA 損傷修復といった反応は、裸の DNA 上ではなくクロマチンというヒストンをはじめとした様々なタンパク質と結合した高次構造体の上で行われる。そのため、DNA 上で起こるイベントに關与するタンパク質はそのままの状態では DNA にアクセスできず、クロマチン構造の再編がイベント毎に行われている。DNA 損傷修復においても、損傷領域周辺の構造が再編された後に、修復因子が集積し、修復後には元の構造に戻すというサイクルが考えられ、その現象やメカニズムの一端が明らかにされつつある。しかしながら、リモデリング複合体がどのような仕組みで損傷応答や修復反応と連携しているのかは未だ不明な点が多い。

マウスのセントロメア近傍には major satellite と呼ばれるリピート配列の巨大な領域が広がっており、間期の細胞核では、いくつかの染色体の major satellite 領域が集まり、クロモセーターと呼ばれる球状のヘテロクロマチンを形成している。ヘテロクロマチンは細胞周期を通して凝縮した特殊なクロマチン領域として知られており、その凝縮した性質から不活性な領域と考えられてきたが、現在では様々な遺伝子の発現制御、染色体の維持や伝達に重要な働きをしていることが明らかとなっている (Saksouk et al., 2015)。最近、特に、major satellite 領域の転写産物 (major satellite RNA; MSR) がクロマチンに取り込まれることで、ヘテロクロマチン化を促進していると報告されており (Velazquez Camacho et al., 2017)、おそらく R-loop 構造などの DNA-RNA hybrid を形成していると考えられている。また、その凝縮した構造から、ヘテロクロマチンで DNA 損傷が発生した場合、修復装置がアクセスするために、修復と共にヘテロクロマチンの解除と再構成が一連の反応として行われると考えられており、損傷依存的なリン酸化酵素である ATM、ATR の活性化や BAF クロマチンリモデリング複合体が損傷チェックポイントの下流において重要な働きを示すことが分かっている (Shen et al., 2015; Tsai et al., 2021)、それらの分子リンクや機能については依然として不明な点が多い。

ヘテロクロマチンの主要な構成因子として知られる HP1 は、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのトリメチル化 (H3K9me3) に結合し、一方で様々なタンパク質と結合しクロマチン領域にリクルートすることでヘテロクロマチンの構築と維持を行っていると考えられている。また、HP1 は DNA 損傷部位に集積し、DNA 修復を促進することが報告されている (Bartova et al., 2017)、その詳細なメカニズムに関しては未だ不明である。また、クロマチンリモデリングや液-液相分離活性といったクロマチンの高次構造に関わる機構が DNA 損傷修復制御においても重要な役割を示すことが近年の研究で明らかとなって来ている (Hauer et al., 2017; Soutoglou et al., 2007)、これらの連携がどのような分子メカニズムで行われているかは未だに不透明である。

2. 研究の目的

これまでに、HP1 結合タンパク質として同定した AHDC1 が、DNA 修復の調節に関わる SCA1 や DNA 修復時や R-loop 解消に働く BAF クロマチンリモデリング複合体 (ARID1A/B) と相互作用することを見出した。SCA1 は、DNA 二重鎖切断修復に重要な 53BP1 と結合して修復反応の調節を行なっていることが明らかになっており (Isobe et al., 2017, 2021)、また、ARID1A は、BAF クロマチンリモデリング複合体のコア DNA 結合サブユニットであり、ATR やトポイソメラーゼ (Top2) などのゲノム安定性制御因子とも結合すること、DNA 複製、遺伝子領域の転写や DNA 損傷応答におけるクロマチンリモデリングや R-loop 構造の解消に寄与していることが報告されている (Hauer et al., 2017; Soutoglou et al., 2007; Tsai et al., 2021)。また、興味深いことに、AHDC1 を過剰発現させると HP1 の局在促進と共に、HP1 結合、自己集合活性に依存して、球状に凝縮したヘテロクロマチン領域 (クロモセーター) がほどけて観察されるといった、AHDC1 がクロマチン構造変化に関わることを見出した。

これらの知見から、本研究では、AHDC1 は、DNA 修復機構や、損傷応答性クロマチンリモデリング複合体に、クロマチンの高次構造変換活性、自己集合活性を付与することにより、修復装置が働くための環境を整えているのではないかという仮説を着想し、その実態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

Flag-tag を N 末端に付与した AHDC1、または ARID1A を安定に発現するヒト 293 細胞を樹立し、抗 Flag 抗体の免疫沈降産物を質量分析により解析することにより、AHDC1、ARID1A 結合タンパク質を同定した。同様に AHDC1 の部分断片に Flag-tag を付与し、一過性発現、または安定発現株を樹立し、その免疫沈降産物を各種抗体によるウエスタンブロットで解析した。

AHDC1 の表現型を解析するために、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により AHDC1 をノックアウトしたマウス NIH3T3 細胞を樹立した。免疫沈降法、ウエスタンブロット (WB)、免疫染色法

(IF) は、Nozawa et al., (2010)の条件で行った。gamma-H2AX の免疫染色は、Cyclin A の共染色、EdU 染色を組み合わせることで、細胞周期を G1、S、G2 期に顕微鏡下で判別できるように行った。

クロマチン免疫沈降法 (ChIP)、RNA-FISH 法は、基本的には Nozawa et al., (2013)の条件で行った。RNA-FISH で使用した Major satellite probe は、以下の配列の primer で増幅された PCR 産物を Nick translation によって作製した。

(Fwd: 5' -CACTTTAGGACGTGAAATATGGCG-3' ; Rev: 5' -CATATTCCAGGTCCTTCAGTGTGC-3')

DNA-RNA Hybrid 免疫沈降法 (DRIP)は、Tsai et al., (2021)を参考に、5% PFA の条件で固定後、断片化や DNA の精製は ChIP のプロトコルによる。

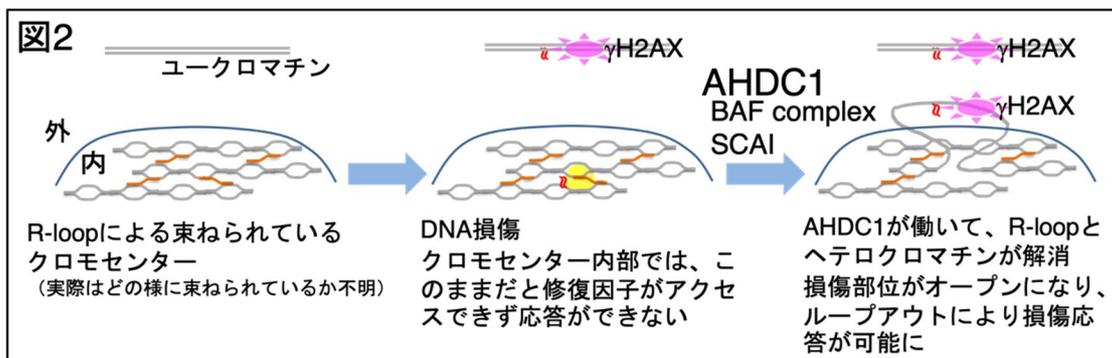
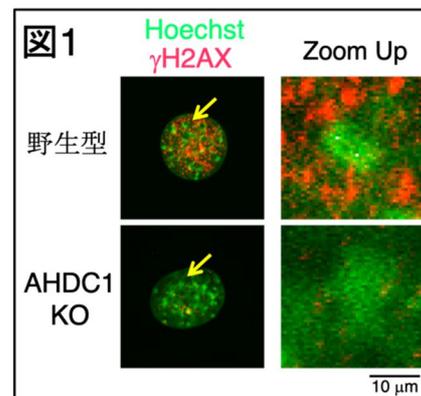
これらの実験は、以下の抗体を用いて行った ; anti-FLAG (mouse; M2; Sigma; 1/10000 for WB), anti-AHDC1 (rabbit; 46-1; laboratory made; 1/100 for WB), anti-ARID1A (mouse; PSG3; Santa curz;1/3000 for WB), anti-SCAI (mouse; 17C3; laboratory made; 1/100 for WB), anti-HP1-alpha (mouse; MAB3446; Merck; 1/10000 for WB) anti-gamma-H2AX (rabbit; 20E3; Cell Signaling; 1/300 for IF), anti-gamma-H2AX (rabbit; 20E3; Cell Signaling; 1/300 for IF), anti-gamma-H2AX (mouse; 20A8; gift from Hiroshi Kimura; 1 ug for ChIP), anti-H3K9me3 (mouse; 2F3; gift from Hiroshi Kimura; 1 ug for ChIP), anti-DNA-RNA Hybrid (mouse; S9.6; Merck; 1 ug for DRIP)

4. 研究成果

まず、AHDC1 の相互作用ネットワークを明らかとするために、Flag-ARID1A 安定発現細胞を樹立し、ARID1A の免疫沈降産物の解析を質量分析計で行ったところ、BAF クロマチンリモデリング複合体構成因子に加え、AHDC1 が検出され、AHDC1-ARID1A の結合を確かにした。また、ヒト AHDC1 は 1603 アミノ酸残基のタンパク質であり、その各部分断片に Flag-tag を付与し、一過性発現、または安定発現株を樹立し、その免疫沈降産物を各抗体で解析したところ、N 末側に 2 箇所、HP1 結合部位、中央に 1 箇所の SCAI 結合部位、C 末側に ARID1A 結合部位を同定し、HP1、SCAI に関しては点変異体の作製にも着手し、実際に結合できない変異体を得ることができた。

次に、マウス NIH3T3 細胞で AHDC1 ノックアウト細胞 (AHDC1 KO)を樹立し、表現型探索を行った。AHDC1 の過剰発現は、ヘテロクロマチン領域 (クロモセーター) の構造変化に関わることから、クロモセーター領域に着目して解析したところ、RNA-FISH 法や定量 PCR (qPCR)によって、クロモセーター領域からの転写産物 (major satellite RNA; MSR)が AHDC1 KO で増大していることを見出した。MSR は、クロマチンに取り込まれることでヘテロクロマチン化を促進することが知られていることから、ChIP-qPCR、または DRIP-qPCR により、クロモセーター領域の H3K9me3、R-loop の変化を解析したところ、AHDC1 K/O で増大が確認された。このことから、AHDC1 はヘテロクロマチンや R-loop の解消に寄与していることが分かった。

間接蛍光法により、細胞周期を分けて DNA 損傷に集積するヒストン修飾の gamma-H2AX を観察したところ、G1、G2 期の自然発生的な gamma-H2AX の核内全体の輝点が減少していた (図 1)。そこで gamma-H2AX について、ChIP-qPCR により解析すると、野生型の細胞では、ユークロマチン領域と比べ、major satellite 領域で gamma-H2AX の蓄積が見られるが、AHDC1 KO では蓄積が見られなくなった。しかしながら、野生型の細胞においても、顕微鏡観察下では、gamma-H2AX の輝点は、クロモセーターのような凝集度の高い領域ではほとんど見られないことから (図 1)、クロモセーターで生じた DNA 損傷はクロマチン構造の再編によってクロモセーター領域からループアウトしていると考えられた (図 2)。ヘテロクロマチンで生じた DNA 損傷は、ユークロマチンとは違い、gamma-H2AX などの比較的初期に働く因子が直ぐには集積せず、ヘテロクロマチンの解消や損傷部位のループアウトによってユークロマチン化してから損傷応答が進行してゆ



くことが知られている (Goodarzi et al., 2012)。そのため、クロモセーターで DNA 損傷が生じた際、AHDC1 はヘテロクロマチンや R-loop 構造を解消することで、損傷 DNA をヘテロクロマチンからループアウトさせることに関与し、DNA 損傷応答を促進するのに役立っているのではないかと考えられた (図 2)。今後は、クロモセーターでの解析を通して、AHDC1 が RNA を介したクロマチン構造変換に関わっていることの実態を示すとともに、AHDC1 結合因子である BAF リモデリング複合体や SCAI とのリンクを欠損させた際の表現型を解析し、AHDC1 のクロマチン構造変換の分子機構を示したいと考えている。

R-loop 解消に関わる変異は様々な疾病を引き起こすことが知られており (Garcia-Muse and Aguilera, 2019)、AHDC1 の突然変異も、Xia-Gibbs 症候群という精神遅滞を引き起こす症例が報告されている (Khayat et al., 2021)。本研究の発見は基礎的な知見に留まっているが、将来的にはこれらの疾患の原因究明の糸口になるのではないかと思われる。

<引用文献>

Bartova, E., Malyskova, B., Komurkova, D., Legartova, S., Suchankova, J., Krejci, J., and Kozubek, S. (2017). Function of heterochromatin protein 1 during DNA repair. *Protoplasma* 254, 1233-1240.

Garcia-Muse, T., and Aguilera, A. (2019). R Loops: From Physiological to Pathological Roles. *Cell* 179, 604-618.

Goodarzi, A.A., and Jeggo, P.A. (2012). The heterochromatic barrier to DNA double strand break repair: how to get the entry visa. *Int J Mol Sci* 13, 11844-11860.

Hauer, M.H., and Gasser, S.M. (2017). Chromatin and nucleosome dynamics in DNA damage and repair. *Genes Dev* 31, 2204-2221.

Isobe, S.Y., Hiraga, S.I., Nagao, K., Sasanuma, H., Donaldson, A.D., and Obuse, C. (2021). Protein phosphatase 1 acts as a RIF1 effector to suppress DSB resection prior to Shieldin action. *Cell Rep* 36, 109383.

Isobe, S.Y., Nagao, K., Nozaki, N., Kimura, H., and Obuse, C. (2017). Inhibition of RIF1 by SCAI Allows BRCA1-Mediated Repair. *Cell reports* 20, 297-307.

Khayat, M.M., Hu, J., Jiang, Y., Li, H., Chander, V., Dawood, M., Hansen, A.W., Li, S., Friedman, J., Cross, L., et al. (2021). AHDC1 missense mutations in Xia-Gibbs syndrome. *HGG Adv* 2.

Nozawa, R.S., Nagao, K., Igami, K.T., Shibata, S., Shirai, N., Nozaki, N., Sado, T., Kimura, H., and Obuse, C. (2013). Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. *Nat Struct Mol Biol* 20, 566-573.

Nozawa, R.S., Nagao, K., Masuda, H.T., Iwasaki, O., Hirota, T., Nozaki, N., Kimura, H., and Obuse, C. (2010). Human POGZ modulates dissociation of HP1alpha from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nat Cell Biol* 12, 719-727.

Saksouk, N., Simboeck, E., and Dejardin, J. (2015). Constitutive heterochromatin formation and transcription in mammals. *Epigenetics Chromatin* *8*, 3.

Shen, J., Peng, Y., Wei, L., Zhang, W., Yang, L., Lan, L., Kapoor, P., Ju, Z., Mo, Q., Shih Ie, M., *et al.* (2015). ARID1A Deficiency Impairs the DNA Damage Checkpoint and Sensitizes Cells to PARP Inhibitors. *Cancer Discov* *5*, 752-767.

Soutoglou, E., Dorn, J.F., Sengupta, K., Jasin, M., Nussenzweig, A., Ried, T., Danuser, G., and Misteli, T. (2007). Positional stability of single double-strand breaks in mammalian cells. *Nat Cell Biol* *9*, 675-682.

Tsai, S., Fournier, L.A., Chang, E.Y., Wells, J.P., Minaker, S.W., Zhu, Y.D., Wang, A.Y., Wang, Y., Huntsman, D.G., and Stirling, P.C. (2021). ARID1A regulates R-loop associated DNA replication stress. *PLoS Genet* *17*, e1009238.

Velazquez Camacho, O., Galan, C., Swist-Rosowska, K., Ching, R., Gamalinda, M., Karabiber, F., De La Rosa-Velazquez, I., Engist, B., Koschorz, B., Shukeir, N., *et al.* (2017). Major satellite repeat RNA stabilize heterochromatin retention of Suv39h enzymes by RNA-nucleosome association and RNA:DNA hybrid formation. *Elife* *6*.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 磯部 真也, 平賀 信一郎, 長尾 恒治, 笹沼 博之, Donaldson D Anne, 小布施 力史
2. 発表標題 DNA二重鎖切断修復経路の調節メカニズムに関わる新規因子SCAI、PP1の解析
3. 学会等名 日本放射線影響学会第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯部 真也, 岩田 優吾, 高見 蒼, 長尾 恒治, 小布施 力史
2. 発表標題 ヘテロクロマチンボディを制御する新規タンパク質AHDC1の解析
3. 学会等名 大阪大学先導的学際研究機構 RNAフロンティアサイエンス部門 第1回RNA-FS部門シンポジウム「RNA研究が拓く生命科学」
4. 発表年 2023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
---------	---------