

平成 26 年 6 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510061

研究課題名(和文) DNA損傷応答シグナルネットワークにおけるTIP60複合体のダイナミクス

研究課題名(英文) Dynamics of TIP60 complex in the network of DNA damage response signaling

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円、(間接経費) 1,290,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題の目的は、TIP60ヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子であるプロモドメイン蛋白質BRDXに着目し、クロマチン構造変換を介したDNA損傷応答シグナル活性化機構を解明することである。これまでに我々は、TIP60複合体が、プロモドメイン蛋白質BRDXを介してDNA損傷領域のヒストンのアセチル化に結合し、さらなるヒストンのアセチル化とTIP60の誘導を促すこと、さらにTIP60の集積によるヒストンのアセチル化が、DNA損傷のセンサー蛋白質NBS1の損傷領域での維持に必要なことを明らかにした。現在、TIP60-BRDXを介したクロマチン構造変換とがん抑制シグナルとの関係を検討中である。

研究成果の概要(英文)：We and other group have shown that TIP60 histone acetyltransferase complex regulates hyperacetylation of histone H2AX and H4 at DNA damage sites, which is crucial for the higher order chromatin alteration. However, it remains unclear how assembly of TIP60 is regulated at DNA damage sites. We have previously identified the bromodomain protein, BRDX, in the purified TIP60 complex. We found that the depletion of BRDX in cells impairs the assembly of TIP60 at DNA damage sites. This finding suggests that BRDX is required for the assembly of TIP60 at DNA damage sites. Moreover, we showed that the acetylation of histone H2AX by TIP60 is required for the retention of NBS1 at DNA damage sites. Since it has been reported that TIP60 functions as anti-cancer signaling molecule, we are now investigating whether chromatin reorganization via TIP60-BRDX complex is involved in the anti-cancer signaling pathway or not.

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複合体 ヒストンアセチル化 プロモドメイン蛋白質

1. 研究開始当初の背景

放射線による DNA 二本鎖切断は、染色体の不安定化を招き、その不安定化が時としてがん化を招く。DNA 損傷は、センサー蛋白質によって認識され、PI3 リン酸化酵素群の損傷領域への誘導による DNA 損傷応答シグナルの活性化と増幅によって細胞周期の停止を引き起こす。その間に細胞は、DNA 損傷を修復するか、あるいは細胞死を実行するかを決定する。真核生物の DNA は、ヒストン蛋白質と DNA の複合体であるクロマチン構造を形成し、通常、ヒストンと DNA の結合は安定に保たれている。しかし、転写、複製、組換え、修復といった DNA 代謝が展開される時、ヒストンと DNA の結合はダイナミックに変化し、クロマチン構造は、大きく変換される。最近では、DNA の損傷がなくとも DNA 損傷を認識するセンサー蛋白質をクロマチンに結合させるだけで、DNA 損傷応答シグナルが活性化することが明らかにされ、クロマチン構造に視点をのこした DNA 損傷応答シグナルの研究が益々重要度を増してきている。

我々は、クロマチン構造変換因子である TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体が、ヒストン H2AX をアセチル化し、そのアセチル化がユビキチン化シグナルを誘導することによりヒストン H2AX のクロマチンからの放出を促すことを明らかにした。この H2AX のクロマチンからの放出は、損傷領域のクロマチン構造変換の一端を担い、放出されたヒストン H2AX は、DNA 損傷応答シグナルの活性化に関与することが示されつつある。しかしながら TIP60 が、如何なる機構で DNA 損傷領域に集積し、クロマチン構造変換を促して DNA 損傷応答シグナルを活性化させるのかについては不明な点が多い。

我々は、TIP60 複合体にプロモドメイン蛋白質 BRDX が、DNA 損傷の有無に関わらず、常に含まれていること、また *in vitro* では、H2AX のアセチル化に BRDX のプロモドメインが直接結合することを明らかにしており、これらの知見から TIP60 が損傷部位に集積する機構について以下のモデルを考えている。一般的にプロモドメイン蛋白質は、ヒストン

のアセチル化部位に結合し、アダプター蛋白質として、クロマチン構造変換因子やシグナル因子をリクルートすることが知られているが、もし仮に TIP60 と常に結合している BRDX が、実際に細胞内で損傷領域のアセチル化ヒストン H2AX に結合するのであれば、その事をきっかけに TIP60 による H2AX のアセチル化のポジティブフィードバック機構が TIP60 そのものの損傷領域への集積と DNA 損傷応答シグナルの増幅を促している可能性がある。

2. 研究の目的

本課題では、TIP60 複合体の構成因子であるプロモドメイン蛋白質 BRDX に着目し、TIP60 が如何なる機構で損傷領域に集積するのかについて先に述べたモデルを検証し、明らかにする。そしてヒストンのアセチル化を介した損傷クロマチンの構造変換と DNA 損傷応答シグナル活性化の連携機構の解明に迫る。さらに BRDX が、大腸がんの細胞株でその発現が亢進しているという事実を踏まえ、これら細胞株での H2AX のアセチル化の亢進の可能性とそれによるがんシグナルとの関係についても検討を加える

3. 研究の方法

TIP60 の損傷部位へのリクルートが、BRDX に依存しているかについて Micro-irradiation 法によるバイオイメーキング解析と I-SceI を用いたクロマチン IP により検討する。次に BRDX が TIP60 と連携して H2AX のクロマチン放出を促すのかについて FRAP 解析を用いたバイオイメーキング解析と損傷依存的に見られる TIP60 によるヒストン H4 のアセチル化を生化学的に検討することにより明らかにする。さらにがん細胞において BRDX が高発現していることをもとに、BRDX を介した TIP60 によるアセチル化の亢進とがん化シグナルとの関係についても検討を加える。

1) BRDX が TIP60 による H2AX のアセチル化に依存して損傷部位に集積するか否かの検討

BRDX が損傷領域に集積するか否かを GFP-BRDX を発現させた細胞を用いて micro-irradiation のシステムを用いて検討する。この際、使用する細胞については、H2AX のノックアウト mouse embryonic fibroblast

cells (MEF cells)に H2AX 野生型遺伝子 (H2AXWT, wild-type)あるいは H2AX のアセチル化部位のリジンアルギニンに置換した変異遺伝子(H2AXKR)をレトロウイルスで遺伝子導入したものを用いておこなう。GFP-BRD_X が H2AXWT 発現細胞でのみ損傷領域に集積し、H2AXKR 発現細胞で集積が見られなければ、GFP-BRD_X は、H2AX のアセチル化に依存して集積することが予想される。さらに TIP60 の野生型の遺伝子を安定に発現させた細胞と TIP60 のアセチル化活性のない変異遺伝子を安定に発現させた細胞で、同様の方法で実験し、この集積が、TIP60 による H2AX のアセチル化に依存しているかを検証する。次に BRD_X のノックダウン細胞を作成し、GFP-TIP60 の集積が阻害されるか否かを 1 の実験と同様のシステムを用いて検討する。TIP60 によってアセチル化されたヒストンに BRD_X が結合し、さらに BRD_X が DNA 損傷に関わらず TIP60 の複合体に含まれることを考え合わせれば、BRD_X が TIP60 による損傷領域のヒストン H2AX のアセチル化に結合し、TIP60 を損傷部位に順次集積させる働きがある可能性があるが、これらの実験からこの可能性を探る。

2) I-Sce1 を用いたクロマチン免疫沈降を用いた検討

1)の実験結果を検証するために、I-Sce1 を用いてゲノム上に一カ所だけ二本鎖切断を導入し、TIP60 および BRD_X が損傷部位に集積することをクロマチン免疫沈降によって確認する。使用する細胞は、I-Sce1 の切断サイトをゲノムに挿入した細胞に H2AXWT, H2AXKR, TIP60WT, TIP60HAT mutant の遺伝子を各々発現させたものを用いて行う。

3) BRD_X が TIP60 による H2AX の eviction に関与しているか否かの検討

BRD_X が TIP60 の損傷領域への集積に関与しているのであれば、BRD_X ノックダウン細胞においては、Micro-irradiation による DNA 損傷によるヒストン H2AX のクロマチンからの放出が抑制されるはずである。Inverse fluorescence recovery after photo-bleaching (iFRAP) 法によりその抑制効果を検証する。この実験により、BRD_X が TIP60 を損傷領域

に集積させてヒストン H2AX のクロマチンから放出を制御していることが明らかになる。

4) BRD_X のノックダウン細胞を用いた損傷依存的なヒストン H4 のアセチル化の検討

TIP60 ヒストンアセチル化酵素は、ヒストン H2AX のみならずヒストン H2A と H4 をアセチル化することが明らかにされている。BRD_X が TIP60 の損傷クロマチンへの集積に関与しているのであれば BRD_X のノックダウン細胞において TIP60 によるヒストン H4 のアセチル化の増強が抑制されるはずである。我々は、C 末に Flag-HA を付与したヒストン H2AX の遺伝子を恒常的に発現する細胞株を樹立し、DNA 損傷前後のクロマチン分画よりヒストン H2AX を含んだモノヌクレオソームの精製をすでに行っている。そこで、BRD_X のノックダウン細胞から H2AX を含むモノヌクレオソームを精製し、損傷依存的なヒストン H4 のアセチル化の増強が抑制されるかどうかを生化学的に検討する。

5) 高発現 BRD_X 細胞におけるがん化シグナル活性化の検討

転移性大腸がんの細胞において BRD_X の発現が亢進していることが明らかになっている。BRD_X の亢進ががん化の原因なのか結果であるのかは不明である。考えられる可能性として BRD_X の発現の亢進は、より多くの TIP60 をクロマチン領域へ誘導し、その結果、ヒストン H2AX のアセチル化の亢進が行われている可能性がある。そのことを明らかにするために BRD_X の発現の亢進している細胞株の H2AX のアセチル化状態を BRD_X の亢進していない他のがん細胞株のそれと比較して検討する。また同時に BRD_X のノックダウン細胞を用いてコロニー形成能を検討し、BRD_X とがん化との関わりを検討する。

4. 研究成果

DNA 損傷領域での TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体の役割を明らかにするために I-Sce1 の認識部位を持つ HeLa 細胞を用いてクロマチン免疫沈降法を立ち上げ、1) TIP60 が DNA 損傷領域に集積すること 2) H2AX および H4 のアセチル化が DNA 損傷領域で亢進すること 3) これらヒストン H2AX および H4 のアセチル化の亢進が TIP60

のアセチル化酵素活性に依存していることを明らかにした。これらの結果は、TIP60 が、DNA 損傷領域に集積し、H2AX および H4 のアセチル化を制御することによりクロマチン構造変換を促すことを示している。また BRDX の DNA 損傷部位への集積についてもクロマチン免疫沈降法と Micro-irradiation 法を行い、BRDX の DNA 損傷領域への集積を確認した。次に BRDX の DNA 損傷領域への TIP60 のアセチル化酵素活性の影響を検討し、BRDX の DNA 損傷領域への集積には、TIP60 のアセチル化活性が必要であることを明らかにした。

我々は、すでに BRDX が、アセチル化ヒストンに *in vitro* で結合することを見出しているが、この結果と BRDX が DNA 損傷の有無に関わらず TIP60 に結合していることを考え合わせれば、TIP60 複合体が、DNA 損傷領域に集積し、ヒストン H2AX および H4 をアセチル化し、そのアセチル化に BRDX を介してさらなる TIP60 がアセチル化ヒストンに結合し、この結果、TIP60 が DNA 損傷領域に集積するというフィードバック制御モデルが考えられた。またこれら DNA 損傷領域における TIP60 のアセチル化を介したポジティブフィードバック制御と DNA 損傷応答シグナル活性化との関係においても検討し、我々は、TIP60 のアセチル化が損傷領域におけるセンサー蛋白質 NBS1 の維持に必要であることを明らかにした。

以上より、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体は、その構成因子であるプロモドメイン蛋白質 BRDX を介して DNA 損傷領域に集積することが示され、この集積が、センサー蛋白質である NBS1 の DNA 損傷領域での維持に必要であることが明らかになった。また TIP60 によるアセチル化を介した DNA 損傷応答シグナルの活性化とがん抑制シグナルとの関連については、NIH3T3 細胞を用いたコロニー形成能が、TIP60 のノックダウンにより高まることから TIP60 によるアセチル化制御が、がん抑制シグナルとして働くことが示唆された。TIP60 が BRDX を介した損傷クロマチンの変化が、がん抑制シグナルと関連しているか否かについては、同じく NIH3T3

細胞を用いたコロニーアッセイで現在検討中である。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Shima H, Suzuki H, Sun J, Kono K, Shi L, Kinomura A, Horikoshi Y, Ikura T, Ikura M, Kanaar R, Igarashi K, Saitoh H, Kurumizaka H, Tashiro S. (2013) Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites containing DNA damage. *J Cell Sci.* [Epub ahead of print]
- ② Sakogawa K, Aoki Y, Misumi K, Hamai Y, Emi M, Hihara J, Shi L, Kono K, Horikoshi Y, Sun J, Ikura T, Okada M, Tashiro S. (2013) Involvement of homologous recombination in the synergism between cisplatin and poly(ADP-ribose) polymerase inhibition. *Cancer Sci.* 2013 Sep 5. doi: 10.1111/cas.12281. [Epub ahead of print]
- ③ Tomida J, Itaya A, Shigechi T, Unno J, Uchida E, Ikura M, Masuda Y, Matsuda S, Adachi J, Kobayashi M, Meetei AR, Maehara Y, Yamamoto KI, Kamiya K, Matsuura A, Matsuda T, Ikura T, Ishiai M, Takata M. (2013). A novel interplay between the Fanconi anemia core complex and ATR-ATRIP kinase during DNA cross-link repair. *Nucleic Acids Res.* [Epub ahead of print]
- ④ Aoki, Y., Sakogawa, K., Hihara, J., Emi, M., Hamai, Y., Kono, K., Shi, L., Sun, J., Kitao, H., Ikura, T., Niida, H., Nakanishi, M., Okada, M., Tashiro, S. (2013). Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. *Int J Oncol.* 42, 1951-1960
- ⑤ Nishimoto, N., Watanabe, M., Watanabe, S., Sugimoto, N., Yugawa, T., Ikura, T., Koiwai, O., Kiyono, T and Fujita, M. Heterocomplex Formation by Arp4 and f-Actin Involved in Integrity of the Brg1 Chromatin Remodeling

Complex (2012). J. Cell Sci. 125, 3870-3882.

⑥ Nishizawa, H., Ota, K., Dohi, Y., Ikura, T., Igarashi, K. Bach1-mediated suppression of p53 is inhibited by p19(ARF) independently of MDM2 (2012). Cancer Sci. 103, 897-903

⑦ Shi L., Fujioka K., Sun J., Kinomura A., Inaba T., Ikura T., Ohtaki M., Yoshida M., Kodama Y., Livingston G.K., Kamiya K., *Tashiro S. A new system for analyzing ionizing radiation-induced chromosome abnormalities (2012). Radiat. Res. 177, 533-538

⑧ 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.

⑨ 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 (2011). Mol Cell 41, 554-566.

[学会発表] (計9件)

① 井倉 毅 「DNA 損傷応答におけるヒストン H2AX のダイナミクス」 第1回ヒストンヴァリエーション研究会 九州大学医学部 2013年3月8日 福岡市

② 井倉 毅 「クロマチンの動的変化を介した DNA 損傷応答シグナルのエピジェネティクス制御機構」 文部科学省第五回生物学・化学・情報科学融合のための戦略的先進理工学研究基盤の形成支援事業シンポジウム 2013年3月6日 東京

③ 井倉 毅 「DNA 損傷応答シグナル活性化におけるクロマチンの動的変化とプロテアソーム蛋白質分解系とのクロストーク」 第80回NM-GCOEセミナー、東北大学医学部、2012年8月24日、仙台市

④ 井倉 毅 「クロマチンの動的変化を介し

た DNA 損傷応答シグナルのエピジェネティクス制御」 第10回口腔医学科学フロンティア 2012年3月3日 大阪大学歯学部記念館、吹田市

⑤ 井倉 毅 「クロマチンの動的変化を介した DNA 損傷応答シグナルのエピジェネティクス制御」 第3次対がん10か年総合戦略 平成16年-25年度・文部科学省がん支援活動、合同公開シンポジウム 2012年1月30-31日 学術総合センター、一橋記念講堂、東京都

⑥ 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 横浜市

⑦ 井倉 毅 「ゲノム損傷におけるクロマチンの動的変化とエピジェネティクス制御」 第3回エピジェネティクス療法研究会 2011年11月3日 東京都

⑧ 井倉 毅 「DNA 損傷応答シグナルにおける TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体のダイナミクス」 構造エピゲノム研究会 第4回ワークショップ 2011年7月27日 横浜市

⑨ 井倉 毅 「ゲノム疾患研究の現状と未来」 神戸大学バイオシグナル研究センター 特別講義 2011年6月10日 神戸市

[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) 2012年 メディカル・サイエンス・インターナショナル 総ページ数 429

[その他]

ホームページ

<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/mutagenesis2/>

6. 研究組織

(1)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