

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24310041

研究課題名(和文) nucleolinによるクロマチンリモデリングを介したゲノム安定性維持機構の解明

研究課題名(英文) Role of nucleolin in maintenance of genomic stability through chromatin remodeling

研究代表者

小林 純也 (KOBAYASHI, Junya)

京都大学・放射線生物研究センター・准教授

研究者番号：30301302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は以前の研究で H2AXと結合する因子として核小体タンパク質nucleolinを同定していた。nucleolinは転写活性化時のクロマチンリモデリング機能することが報告されていたので、DNA損傷応答時において同様な機能を持つか、本研究で検討した。nucleolin欠損細胞では放射線DNA損傷における細胞周期チェックポイント機構・相同組換え修復の低下、複製ストレス時の複製フォークの不安定化、突然変異増加が見られ、ヒストン evictionにも異常が見られたことから、nucleolinはクロマチンリモデリングを通して、ゲノム安定性維持に機能することが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We identified nucleolin (nucleolar protein) as one of H2AX-binding proteins. As nucleolin could remodel chromatin structure at transcription-active sites, we investigated the role of chromatin remodeling radiation-induced DNA damage. Nucleolin-depleted cells remarkably reduced cell cycle checkpoints and HR repair activity, and showed un-stabilization of stalled replication fork and abnormal chromatin remodeling. Therefore, nucleolin could be important to maintain genomic stability through chromatin remodeling.

研究分野：放射線生物学

キーワード：ゲノム不安定性 nucleolin クロマチン DNA損傷 DNA修復

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝子情報が納められているゲノム DNA は電離放射線、紫外線、活性酸素などに暴露すると、損傷が生じる。これらの DNA 損傷、とりわけ DNA 二重鎖切断(DSB)損傷が残存すると、ゲノム情報消失により細胞死あるいは癌化のような異常細胞を招くために、高等真核細胞は、DNA 損傷が発生するとともに検知し、チェックポイント機構により細胞増殖を停止し、ただちに DNA 損傷を修復する。高等真核生物のゲノム DNA はヒストンタンパク質とともに安定なクロマチン構造をとるため、DSB 損傷が発生すると、クロマチン構造の再構成(リモデリング)によって弛緩し、修復タンパク質の集結のための空間を確保すると考えられる。

これまでの転写や DNA 複製制御の多くの研究から、クロマチンリモデリングにはヒストンの翻訳後修飾(リン酸化、アセチル化、メチル化など)が重要な役割を果たすことが明らかとなっていたが、DSB 損傷に対する細胞応答時での役割は明らかで無かった。しかし、ヒストン H2A バリエーションであり、DSB 損傷発生で ATM 依存的にリン酸化される H2AX が NBS1 などの DNA 損傷応答因子の DSB 損傷部位への集結(フォーカス形成)に重要であること、ATM キナーゼの活性化自体にも重要であることを我々は報告した。また、ヒストンアセチル化酵素の一つ、Tip60 の阻害剤 pentamidine でヒト細胞を処理すると、ヒストン H2A のアセチル化を阻害されるとともに、DNA 損傷修復タンパク質の集結、相同組み換え(HR)修復を抑制し、放射線感受性の増感すること、さらに RNF20 (ユビキチン E3 リガーゼ)によるヒストン H2B のユビキチン化が HR 因子の DSB 損傷部位への集結、HR 修復の開始に重要であることを明らかにし、DNA 修復におけるヒストン修飾の重要性を我々は明らかにしていた。

一方、我々はプロテオミクス解析による最近の研究から、DSB 損傷発生時にヒストン H2AX と結合するタンパク質として nucleolin を同定していたが、nucleolin はヒストン H2A/H2B と結合して、ヒストン H2A/H2B のクロマチンからの解離(eviction)を介してクロマチンリモデリング、転写の活性化に機能すると報告されており、DSB 損傷応答においても nucleolin が中心因子として機能することが考えられた。また多様な癌で nucleolin の高発現が報告されており、DSB 損傷を初め様々なタイプの DNA 損傷の修復過程で nucleolin はクロマチンリモデリングを通して働くことにより、ゲノム安定性の維持に機能する可能性が考えられていた。

## 2. 研究の目的

核小体タンパク質 nucleolin はリボソーム RNA 合成、核小体形成に機能することが知られているが、近年の研究からクロマチンリモデリングを介して転写活性化に寄与す

ること、我々の最新の研究から DSB 損傷で形成される H2AX とインターラクシオンすることが見いだされたことから、nucleolin の放射線や他の様々な損傷誘導ストレスで、DNA 損傷が誘導されたときに、細胞応答における機能を明らかにすることが本研究の目的である。また、nucleolin が転写誘導時と同様にクロマチンリモデリングを介してこれら損傷応答に機能するかを明らかにして、nucleolin がゲノム安定性の維持、がん化にどのようにかわるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) nucleolin ノックダウン細胞での DNA 損傷応答チェックポイント経路の解析

ヒト培養細胞で nucleolin を siRNA あるいは shRNA で発現をノックダウンした後に、細胞周期チェックポイントを制御する ATM、ATR によるリン酸化を、リン酸化特異的抗体によるウエスタンブロット法で検討する。さらにゲノム DNA を PI 蛍光染色してフローサイトメーターで DNA 含量を定量し細胞周期分布を解析し、細胞周期チェックポイント・アポトーシス誘導を検討する。

(2) nucleolin ノックダウン細胞での DNA 修復活性の測定

HR 活性測定、あるいは NHEJ 活性測定用コンストラクトが導入された HeLa 細胞、U2OS 細胞を用いて、最初に siRNA あるいは shRNA で発現をノックダウンし、続いて I-SceI を導入して DNA 二重鎖切断を誘導して、2~3 日培養する。これらのコンストラクトは誘導された DSB が NHEJ あるいは HR 修復されると GFP 蛍光タンパク質を発現するため、その発現をフローサイトメーターで検出する。

DNA 修復欠損による遺伝子突然変異を計測するため、突然変異検出に適した SupF プラスミドを紫外線などで DNA 損傷処理した後に、nucleolin ノックダウン細胞にトランスフェクションし、24 時間後に SupF 回収して大腸菌に導入する。supF に含まれるアンピシリン遺伝子で薬剤耐性になった大腸菌クローンの発生頻度を計測し、突然変異頻度とする。また、個々のクローンから分離した supF プラスミドを DNA シークエンス解析して、遺伝子突然変異のスペクトラムも検討する。

(3) nucleolin 結合因子の同定

FLAG タグを結合した nucleolin 発現プラスミドを作製し、HeLa 細胞に導入して、Flag-nucleolin 発現細胞を作製する。この細胞を用いて DNA 損傷処理後、核抽出液を作製し、FLAG 抗体を用いて、免疫沈降法で複合体を回収した後、電気泳動装置で構成タンパク質を分離、分離したタンパク質はトリプシンによる断片化、抽出を行い、質量分析計を用いて、nucleolin 結合因子を同定する。

同定された nucleolin 結合因子は上記 ( 1 ) ( 2 ) の方法で、DSB 損傷応答 ( チェックポイント制御、DSB 修復 )、複製ストレス応答における役割を検討する。

#### 4. 研究成果

##### ( 1 ) 放射線誘導 DSB 損傷応答における nucleolin の役割

以前の研究で我々は DSB 損傷発生時にリン酸化ヒストン H2AX ( H2AX ) と結合するタンパク質として nucleolin を同定していたので、DSB 損傷応答において nucleolin が機能することが予想された。実際、siRNA を用いて、HeLa 細胞、U2OS 細胞で発現をノックダウンすると、線照射時の ATM の自己リン酸化、ATM の基質のリン酸化が抑制されており、ATM 依存的 G2 チェックポイントの誘導も起こらなかった。また、線照射で誘導される MDC1、リン酸化 ATM、53BP1 フォーカスも抑制されていた。MDC1 は ATM シグナルの増幅、53BP1 フォーカスの形成に重要であることから、nucleolin は MDC1 を通して ATM の十分な活性化、細胞周期チェックポイント誘導を制御していると考えられる。

nucleolin の DSB 修復を検討するために、DSB マーカーである H2AX フォーカス形成の増減を線照射時に検討すると、nucleolin ノックダウン細胞では H2AX の消失が遅延しており、DSB 修復の異常が示唆された。HR マーカーである Rad51 フォーカスの線照射時に検討すると、nucleolin ノックダウン細胞では低下していた。さらに、HR 活性を促成できる DRGFP コンストラクトを組み込んだ HeLa 細胞、U2OS 細胞で、nucleolin をノックダウンした後に、HR 修復で発現した GFP 陽性細胞を計測すると、HR 活性が半分程度に低下しており、Rad51 フォーカスの結果と一致した。NHEJ 活性も同様に検討すると、ノックダウン細胞で 1/3 程度の低下が見られた。これらの結果から nucleolin は HR に重要であり、部分的に NHEJ 修復にも機能することが示唆された。

転写制御において、nucleolin はヌクレオソームを形成する H2B を eviction して、転写活性化部位のリモデリングに機能すると報告されていたので、nucleolin とヒストン修飾、クロマチンリモデリングとの関係を検討すると、DSB 損傷応答に関与するヒストン H2A のユビキチン化、及びヒストンユビキチン化酵素 RNF168 のフォーカス形成がノックダウン細胞で抑制されていた。さらに、転写時に見られる H2B の eviction ( クロマチンから核質への解離 ) は DSB 損傷発生時にも誘導されるが、ノックダウン細胞では eviction は抑制されており、nucleolin は H2B の eviction を通して DSB 損傷応答に機能すると考えられる。

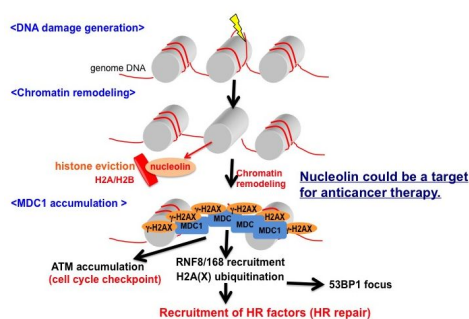


図 1 nucleolin によるヒストン eviction を通じた DSB 損傷応答の制御

##### ( 2 ) 複製ストレスによる DNA 損傷応答における nucleolin の役割

トポイソメラーゼ I 阻害剤であるカンプトテシン処理、紫外線 (UV) 照射、DNA 架橋剤マイトマイシン C 処理により DNA 損傷が起こると、DNA 複製フォークの進行が阻害され、複製ストレスとなるが、このような複製ストレスによる DNA 損傷は相同組換え経路で修復される。このような複製ストレスにおける nucleolin の役割を明らかにするために、ノックダウン細胞で ATM、ATR 依存的なリン酸化をウエスタンブロット法で検討した。複製ストレスが生じるとその部位で ssDNA が形成して ATR が活性化されるが、UV 照射においては nucleolin ノックダウン細胞では ATR 依存的な Rad17、RPA32 のリン酸化が低下しており、二次的に活性化される ATM 依存的なリン酸化も低下していた。カンプトテシン処理においても同様な傾向が見られた。DNA 損傷応答因子はクロマチンに集積して機能することが知られるが、nucleolin ノックダウン細胞ではカンプトテシンによる複製ストレス誘導時、RPA、Rad51 のクロマチン集積が低下し、ヒストン eviction にも異常が見られた。さらにノックダウン細胞では染色体異常も増加し、PI 染色法でアポトーシス誘導を検討すると、ノックダウン細胞では UV 照射によるアポトーシスが增大した。

このような結果から nucleolin は複製ストレス時の細胞応答に機能することが示唆され、ノックダウン細胞では停止したフォークの安定性が損なわれ、それが遺伝子突然変異につながる可能性が考えられたので、次に supF プラスミドを用いてノックダウン細胞での突然変異誘導を検討した。ノックダウン細胞に導入する supF にあらかじめ紫外線損傷を導入した場合、突然変異がコントロール細胞と比べて、顕著に増大していた。以上の結果から、nucleolin は複製ストレス誘導時に停止した複製フォークの安定化に機能して、停止した部位でのゲノム DNA の安定性維持に機能すると考えられる。

##### ( 3 ) nucleolin 結合因子の同定、その DNA 損傷応答における役割の検討

nucleolin は放射線誘導による DSB 損傷誘導時、複製ストレス発生時に、ヒストン

eviction、クロマチンリモデリングを通して DNA 損傷応答、ゲノム安定性に機能すると本研究結果で示唆されたが、その制御機構の詳細を明らかにするために、nucleolin と相互作用する因子を免疫沈降法/プロテオミクス解析で同定することを試みた。最初に、FLAG-nucleolin 強制発現細胞で試みたが、十分な発現誘導が見られず、同定できなかった。しかし、抗 nucleolin 抗体を用いた免疫沈降法でヒト培養細胞から nucleolin 複合体を分離し、MASS 解析すると、これまで我々が報告していた NBS1, H2AX, SNF2h が複合体に含まれることが確認できた。さらに複数の複合体が同定されたので、それらの一部を siRNA ノックダウンして DNA 損傷応答への影響を検討した。その結果、因子 A ノックダウン細胞では nucleolin 欠損細胞と類似の表現型を示し、染色体異常も増加していた。さらにノックダウン細胞では HR 活性も低下しており、nucleolin はこの同定因子と相互作用して、機能する可能性が示唆された。

以上の結果から、nucleolin はクロマチンリモデリングを通して、DSB 損傷応答時には MDC1/ATM 依存的に細胞周期チェックポイント、HR 修復を制御し、複製ストレス時には複製フォークの安定化に機能することが示唆される。nucleolin は癌細胞で過剰発現が報告されており、nucleolin は適切なレベルの発現により、高等真核細胞でのゲノム安定性の維持に機能すると考えられ、ゲノム安定性を通じた発がん防御機構を考える上でも、nucleolin のさらなる機能解明が重要だといえる。

#### 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16件)

- (1) Kobayashi J, Saito Y, Okui M, Miwa N, Komatsu K. Increased oxidative stress in AOA3 cells disturbs ATM-dependent DNA damage responses. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen.* 782, 42-50, 2015. doi: 10.1016/j.mrgentox.2015.03.012
- (2) Su F, Mukherjee S, Yang Y, Mori E, Bhattacharya S, Kobayashi J, Yannone SY, Chen DJ, Asaithamby A. Nonenzymatic Role for WRN in Preserving Nascent DNA Strands after Replication Stress. *Cell reports* 9, 1387-1401, 2014. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.025
- (3) Iwahori S, Kohmon D, Kobayashi J, Tani Y, Yugawa T, Komatsu K, Kiyono T, Sugimoto N, Fujita M. ATM regulates Cdt1 stability during the unperturbed S

phase to prevent re-replication. *Cell Cycle* 13, 471-481, 2014. doi: 10.4161/cc.27274

- (4) Yoshida T, Awaya T, Shibata M, Kato T, Numabe H, Kobayashi J, Komatsu K, Heike T. Hypergonadotropic Hypogonadism and Hypersegmented Neutrophils in a Patient with Ataxia-Telangiectasia-Like Disorder: Potential Diagnostic Clues? *Am J Med Genet A*, 164, 1830-1834, 2014. doi: 10.1002/ajmg.a.36546
- (5) Oji Y, Tatsumi N, Kobayashi J, Fukuda M, Ueda T, Nakano E, Saito C, Shibata S, Sumikawa M, Fukushima H, Saito A, Hojo N, Suzuki M, Hoshikawa T, Shimura T, Morii E, Oka Y, Hosen N, Komatsu K, Sugiyama H. Wilms' tumor gene WT1 promotes homologous recombination-mediated DNA damage repair. *Molecular Carcinogenesis*, in press, 2014. doi: 10.1002/mc.22248
- (6) Ohara M, Funyu Y, Ebara S, Sakamoto Y, Seki R, Iijima K, Ohishi A, Kobayashi J, Komatsu K, Tachibana A, Tauchi H. Mutations in the FHA-domain of ectopically expressed NBS1 lead to Radiosensitization and to no increase in somatic mutation rates via a partial suppression of homologous recombination. *J. Radiat. Res.* 55, 690-698, 2014. doi: 10.1093/jrr/rru011
- (7) Yoshiyama KO, Kobayashi J, Ogita N, Ueda M, Kimura S, Maki H, Umeda M. ATM-mediated phosphorylation of SOG1 is essential for the DNA damage response in Arabidopsis. *EMBO Rep*, 14, 817-822, 2013. doi: 10.1038/embor.2013.112
- (8) Saito Y, Takeda J, Okada M, Kobayashi J, Kato A, Hirota K, Taoka M, Matsumoto T, Komatsu K, Isobe T. The proteasome factor Bag101 binds to Rad22 and suppresses homologous recombination. *Scientific Rep*, 3, 2022, 2013. doi: 10.1038/srep02022
- (9) Saito Y, Fujimoto H, Kobayashi J. Role of NBS1 in DNA damage response and its relationship with cancer development. *Translational Cancer Research*, 2, 178-189 2013.
- (10) Kobayashi K, Hayashi I, Kouda S, Kato F, Fujiwara T, Kayama S,

- Hirakawa H, Itaha H, Ohge H, Gotoh N, Usui T, Matsubara A, Sugai M. Identification and characterization of a novel *aac(6)*-Iag associated with the *bla*IMP-1-integron in a multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One*. 8, e70557, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0070557
- (11) Kurushima J, Hayashi I, Sugai M, Tomita H. Bacteriocin protein BacL1 of *Enterococcus faecalis* is a peptidoglycan D-isoglutamyl-L-lysine endopeptidase. *J Biol Chem*. 288, 36915-36925, 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.506618
- (12) Mashimo T, Takizawa A, Kobayashi J, Kunihiro Y, Yoshimi K, Ishida S, Tanabe K, Yanagi A, Tachibana A, Hirose J, Yomoda J, Morimoto S, Kuramoto T, Voigt B, Watanabe T, Hiai H, Tateno C, Komatsu K, Serikawa T. Generation and characterization of severe combined immunodeficiency rats. *Cell Rep*. 2, 685-694, 2012. doi: 10.1016/j.celrep.2012.08.009
- (13) Kobayashi J, Fujimoto H, Sato J, Hayashi I, Burma S, Matsuura S, Chen DJ, Komatsu K. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. *PLoS One*, 7, e49245 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0049245
- (14) Urushihara Y, Kobayashi J, Matsumoto Y, Komatsu K, Oda S, Mitani H. DNA-PK inhibition causes a low level of H2AX phosphorylation and homologous recombination repair in Medaka (*Oryzias latipes*) cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 429, 131-136, 2012 2012. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.10.128
- (15) Mashimo T, Kaneko T, Sakuma T, Kobayashi J, Kunihiro Y, Voigt B, Yamamoto T, Serikawa T. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes. *Scientific Rep*, 3, 1253, 2013. doi: 10.1038/srep01253
- (16) Kondo T, Kobayashi J, Saitoh T, Maruyama K, Ishii KJ, Barber GN, Komatsu K, Akira S, Kawai T. DNA damage sensor MRE11 recognizes cytosolic double-stranded DNA and induces type I interferon by regulating STING trafficking. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 2969-2974 2013. doi: 10.1073/pnas.1222694110
- 〔学会発表〕(計3件)
- (1) Kobayashi J, Fujimoto H, Tomimatsu N, Saito Y, Burma S, Komatsu K. Regulation of DNA double-strand break repair through DSB-end resection by Exo1. Gordon Research Conference “Mammalian DNA repair” Ventura (USA), 2013年2月10日～15日
- (2) Kobayashi J, Fujimoto H, Saito Y, Hayashi I, Chen DJ, Komatsu K. Nucleolin participates in DNA double-strand break-induced damage response through MDC1-dependent pathway. 3rd Asian Congress of Radiation Research (ACRR2013), Beijing (China), 2013年5月10日～13日(招待講演)
- (3) Kobayashi J, Kawai T, Fujimoto H, Kato T, Matsuura S, Akira S, Komatsu K. The role of cytoplasmic MRE11 and its relationship with ATM. 15th International Workshop on Ataxia-Telangiectasia (ATW2013), Birmingham (UK), 2013年7月28日～31日(招待講演)
- 〔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〕
- ホームページ等 無
6. 研究組織
- (1)研究代表者  
小林 純也 (KOBAYASHI, Junya)  
京都大学・放射線生物研究センター・准教授  
研究者番号：30301302
- (2)研究分担者  
奥井 理予 (OKUI, Michiyo)  
桐蔭横浜大学・先端医用工学センター・講師  
研究者番号：20327654
- (2)研究分担者  
林 幾江 (HAYASHI, Ikue)  
広島大学・医歯薬保健学研究院・助教  
研究者番号：00346503