

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22131004

研究課題名（和文）DNA損傷初期応答のヒストンシグナルネットワークの解明

研究課題名（英文）Histone signaling network 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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,300,000円

研究成果の概要（和文）：本課題においてDNA損傷領域でTIP60ヒストンアセチル化酵素によって特異的に促進されるヒストンH2AXの交換反応の分子機構とその意義について検討した。その結果、ヒストンH2AXが、クロマチン構成蛋白質としてDNA修復反応に対してバリアーとなるのではなく、DNA損傷依存的なリン酸化シグナルと連携しながらactive playerとして積極的にDNA損傷応答シグナルを制御することを明らかにした。DNA代謝におけるヒストン蛋白質の新たな役割を提示することができた。

研究成果の概要（英文）：The eukaryotic genome is tightly packed into the chromatin, a hierarchically organized complex of DNA, histone and nonhistone proteins. Recent findings indicates that histone variant eviction/exchange has an important role in DNA repair and DNA damage response. We found that the TIP60 complex facilitates histone H2AX exchange at the sites of DNA damage. Interestingly, the phosphorylation of histone H2AX is not required for histone H2AX exchange. In this project, we investigated the physiological significance of histone H2AX exchange in DNA damage response. We found that the histone signaling network regulated by the acetylation-dependent histone H2AX exchange is cross-talked with the phosphorylation-dependent DNA damage response signaling.

研究分野：放射線生物学

キーワード：TIP60ヒストンアセチル化酵素 ヒストンアセチル化 ヒストン交換反応 ヒストンH2AX クロマチンダイナミクス DNA損傷応答

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報の源である真核生物の DNA はクロマチン構造を形成しており、転写、複製、修復、組換えを制御する因子が DNA にアクセスするためにはクロマチン構造が変換される必要がある。我々は、クロマチンの構成蛋白質であるヒストン H2AX が、DNA 損傷に伴い、クロマチンから放出され、再度クロマチンに取り込まれることを見出した (H2AX の交換反応)。この交換反応は、TIP60 ヒストンアセチル化酵素と UBC13 ユビキチン結合酵素との複合体による H2AX のアセチル化とユビキチン化によって制御され、既存の ATM/ATR によるリン酸化カスケードには依存しない (Ikura, T. *et al. Cell.* 2000. Ikura, T. *et al. Mol Cell Biol.* 2007)。これまでクロマチン構造の構成蛋白質であるヒストンは、クロマチン構造を維持するために DNA と常に安定に結合している蛋白質と考えられていた。我々が見出した DNA 損傷に伴う H2AX のクロマチンからの交換反応の促進は、DNA 損傷認識や DNA 損傷応答シグナルの活性化に積極的な関わりを持つことを示唆している。ヒストンが DNA 代謝に対してバリアーとして働くという従来の考え方を考える可能性があるが、その実体は不明であった。

### 2. 研究の目的

本課題では、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体によって促進される H2AX の交換反応の分子機構と DNA 損傷応答における意義を明らかにする。またヒストンのアセチル化を介した DNA 損傷応答シグナルと既存のリン酸化カスケードやユビキチン化シグナルとの関係を明確にし、DNA 損傷初期応答のシグナルネットワークの全貌を明らかにする。さらに H2AX の放出による DNA 損傷応答シグナルが細胞老化やがん抑制シグナルとして働くことを検討し、クロマチン動態制御を介した新たな疾患研究の基礎を築く。

### 3. 研究の方法

放出された H2AX を蛋白質複合体として精製し、マスマスプロトメトリー解析 (MS 解析) により H2AX に結合する因子を網羅的に同定する。我々は、H2AX の交換反応を解析するためバイオイメージング解析法、FRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching) および iFRAP (Inverse

FRAP) 法を確立している。この系を用いて H2AX の交換反応に関与する因子を、H2AX 複合体解析により同定した因子群の中から同定する。また同定した因子群をロックダウンし、H2AX の損傷依存的なアセチル化および既知のリン酸化およびユビキチン化シグナルへの影響をみる。またマウス NIH3T3 細胞を用いてコロニー形成能を検証し、アセチル化を介した DNA 損傷応答シグナルの破壊とがん化シグナルとの関係を探る。

### 4. 研究成果

(1). クロマチン構造は、DNA 代謝に対してバリアーになると考えられていたが、本課題研究により、ヒストン H2AX には、バリアーではなく、DNA 損傷応答蛋白質として、積極的に DNA 修復反応を推進する active player としての働きがあることを実験的に検証することに成功した。H2AX 複合体の MS 解析の結果、ADP-リボシル化酵素 PARP-1、ヒストンシャペロンを H2AX に結合する因子として同定した。これら因子は、TIP60 と同様に H2AX の交換反応に関与することを FRAP および iFRAP 法により明らかにした。ヒストンシャペロンは、TIP60 と直接結合し、TIP60 を損傷クロマチンに誘導する。誘導された TIP60 は、H2AX をアセチル化し、ヒストンシャペロンのクロマチン上での動的変化を促す。これら 2 つのクロマチン構造変換因子の相互制御によって生み出される Positive Feedback loop が H2AX の交換反応を促進し、この促進が、TIP60 とヒストンシャペロンの DNA 損傷部位への集積、クロマチン構造の弛緩状態の維持、S 期での相同組換え修復に必要であることを明らかにした (in revision)。

(2). DNA 損傷応答におけるヒストン H2AX のリン酸化とアセチル化についてマスマスプロトメトリー解析を用いて絶対定量を行い、これらヒストン化学修飾が細胞ごとに異なる制御を受けることを示した。ヒストン化学修飾の多様性を示した最初の報告である (in revision)。

(3). TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体によるヒストン H2AX の交換反応は、細胞核内のプロテオソーム蛋白質分解系ともカップルし、DNA 損傷応答シグナルを制御すること

を明らかにした (投稿準備中)。

#### 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 18 件)

- ① Okimoto, S., Sun, J., Fukuto, A., Horikoshi, Y., Matsuda, S., Matsuda, T., Ikura, M., Ikura, T., Machida, S., Kurumizaka, H., Miyamoto, Y., Oka, M., Yoneda, Y., Kiuchi, Y., Tashiro, S. (2015) hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes to Cells* (in press)
- ② Akita, M., Tak, Yon-Soo., Shimura, T., Matumoto, S., Okuda-Shimuzu, Y., Shimizu, Y., Nishi, R., Saitoh, H., Iwai, S., Mori, T., Ikura, T., Sakai, W., Hanaoka, F., Sugasawa, K. (2015) SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Scientific Reports* (in press)
- ③ Matsuda, S., Ikura, T., \*Matsuda, T. (2015) Absolute quantification of gH2AX using liquid chromatography–triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*
- ④ Liu, NA., Sun, J., Kono, K., Horikoshi, Y., Ikura, T., Tong, X., Haraguchi, T., \*Tashiro, S. (2015) Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. *FASEB J.* 2015 Mar 2. pii: fj.14-265546. [Epub ahead of print]
- ⑤ Nishibuchi, I., Suzuki, H., Kinomura, A., Sun, J., Liu, NA., Horikoshi, Y., Shima, H., Kusakabe, M., Harata, M., Fukagawa, T., Ikura, T., Ishida, T., Nagata, Y., \*Tashiro, S. (2014) Reorganization of Damaged Chromatin by the Exchange of Histone Variant H2A.Z-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 15; 89 :736-44. doi: 10.1016/j.ijrobp.2014.03.031.
- ⑥ Machida, S., Takaku, M., Ikura, M., Sun, J., Suzuki, H., Kobayashi, W., Kinomura, A., Osakabe, A., Tachiwana, H., Horikoshi, Y., Fukuto, A., Matsuda, R., Ura, K., Tashiro, S., Ikura, T., \*Kurumizaka, H. (2014) Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep04863.
- ⑦ Unno, J., Itaya, A., Taoka, M., Sato, K., Tomida, J., Sakai, W., Sugasawa, K., Ishiai, M., Ikura, T., Isobe, T., Kurumizaka, H., \*Takata, M. (2014) FANCD2 Binds CtIP and Regulates DNA-End Resection during DNA Interstrand Crosslink Repair. **(ア)** *Cell Rep.* [Epub ahead of print]
- ⑧ Oliveira, DV., Kato, A., Nakamura, K., Ikura, T., Okada, M., Kobayashi, J., Yanagihara, H., Saito, Y., Tauchi, H., \*Komatsu, K. (2013) Histone chaperone FACT regulates homologous recombination by chromatin remodeling through interaction with RNF20. *J Cell Sci.* [Epub ahead of print]
- ⑨ Arimura, Y., Kimura, H., Oda, T., Sato, K., Osakabe, A., Tachiwana, H., Sato, Y., Kinugasa, Y., Ikura, T., Sugiyama, M., Sato, M., Kurumizaka, H. (2013) Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Sci Rep.* doi: 10.1038/srep03510.
- ⑩ 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]

- ⑪ 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]
- ⑫ Tomida, J., Itaya, A., Shigechi, T., Unno, J., Uchida, E., Ikura, M., Masuda, Y., Matsuda, S., Adachi, J., Kobayashi, M., Meetei, A.R., Maehara, Y., Yamamoto, K.I., 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]
- ⑬ 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). (ア) Involvement of ribonucleotide reductase-M1 in 5-fluorouracil-induced DNA damage in esophageal cancer cell lines. **Int J Oncol.** 42, 1951-1960
- ⑭ 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.
- ⑮ 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
- ⑯ 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
- ⑰ 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.
- ⑱ 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 28 件)
- (1) 井倉 毅 : 「DNA 損傷応答におけるポジティブフィードバック制御を介した高次クロマチン構造の役割」神戸大学セミナー 2014 年 6 月 4 日 神戸市
- (2) 井倉 毅、松田 涼、井倉正枝 : 「DNA 損傷応答におけるヒストン H2AX 化学修飾の時空間制御」第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15-16 日 京都市
- (3) 井倉 毅 : 「DNA 損傷応答におけるヒストンアセチル化を介したクロマチン動的制御とその意義」平成 26 年度遺伝研研究会「クロマチンにおけるゲノム DNA の機能発現メカニズム」2014 年 10 月 30-31 日 国立遺伝学研究所 三島市
- (4) Ikura, T., Matsuda, R., Tashiro, S., Ikura, M. 「The role of histone H2AX dynamics in DNA damage response」The 4D Nucleome 2014 2014 年 12 月 17-20 日 広島市
- (5) Ikura, T., Matsuda, S., Ikura, M., Matsuda, T. 「The role of the pyruvate kinase M2 (PKM2) in the Arylhydrocarbon Receptor-mediated Transcription」5<sup>th</sup> meeting of the Asian Forum for chromatin and chromosome Biology 2015 年 1 月 13-19 日 Bungalow, India.
- (6) Ikura, T., Matsuda, S., Ikura, M., Matsuda,

T. 「The coupling of epigenetic regulation with metabolism in cancer」 The 30<sup>th</sup> RBC-NIRS International Symposium “Frontier Radiation Biology, Now and In the future”. 2015年2月20-21日

(7) Ikura, T., Matuda, R., Tashiro, S., Ikura, T. 「The role of chromatin dynamics in DNA damage response」第36回日本分子生物学会年会 ワークショップ、蛋白質翻訳後修飾を介した超分子複合体形成とゲノム機能制御 2013年12月3-6日 神戸市

(8) 井倉正枝、松田涼、田代聡、井倉 毅：「DNA 損傷応答におけるクロマチン動的变化とその意義」第56回日本放射線影響学会シンポジウム 2013年10月18-20日 青森市

(9) 井倉正枝、松田涼、田代聡、井倉 毅：「DNA 損傷応答におけるヒストン H2AX のアセチル化とリン酸化のクロストーク」第86回日本生化学会シンポジウム 2013年9月11-13日 横浜市

(10) 井倉 毅：「ゲノムストレスにおけるクロマチンの動的变化とその意義」広島大学理学部セミナー 2013年6月28日

(11) 井倉 毅：「DNA 損傷応答におけるヒストン H2AX のダイナミクス」第一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

(12) 井倉 毅：「クロマチンの動的变化を介した 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

(13) 井倉 毅：「放射線の攻撃からゲノムを守る-我々のゲノムを守る蛋白質の巧妙かつダイナミックな防衛戦略-」品川セミナー 2013年2月1日 東京

(14) 井倉 毅：「DNA 損傷応答シグナルのエピジェネティクス制御機構の解明と展望」放射線影響学会 東北大学 2012年9月6日

(15) 井倉 毅：「ゲノム損傷におけるクロマチンの動的制御変化とエピジェネティクス制御機構」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

(16) 井倉 毅：「ゲノム損傷におけるクロマチンの動的制御変化とエピジェネティクス制御機構」京都大学循環器内科セミナー 2012年7月11日 京都市

(17) 井倉 毅：「DNA 損傷応答シグナルのエピジェネティクス制御機構の解明と展望」早稲田大学 2012年6月28日 東京

(18) 井倉 毅：「ゲノム損傷におけるクロマチンダイナミクスとエピジェネティクス制御機構」早稲田大学 2012年6月15日 東京

(19) 井倉 毅：「クロマチンの動的变化を介した 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

(20) 井倉 毅：「クロマチンの動的变化を介した 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

(21) 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

(22) 井倉 毅：「ゲノム損傷におけるクロマチンの動的变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

(23) 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

(24) 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

(25) 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

(26) Ikura, T. 「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

(27) 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

(28) Ikura, T. 「Checkpoint activation regulated by DNA damage-induced H2AX eviction」 56<sup>th</sup> Annual Meeting Radiation Research Society. 2010年9月29日. Maui in Hawaii.

〔図書〕(計2件)

- ① 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 (メディカル・サイエンス・インターナショナル) (2012) (第3章翻訳、松田 俊、井倉正枝、井倉 毅)
- ② 南山堂医学大事典 (2015) (分担執筆: 井倉 毅)

〔その他〕

ホームページ等

<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