

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

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：22131005

研究課題名(和文)クロマチンリモデリングの可視化プロテオミクス

研究課題名(英文)Visualization and proteomics of chromatin remodeling in DNA damage response

研究代表者

安井 明(YASUI, Akira)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60191110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 109,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト細胞の中でDNAはクロマチンと呼ばれるヒストンなどの蛋白と複合体を作っており、DNAの損傷が修復される際には、クロマチンリモデリング(CR)という過程が必要であることが分って来た。この研究では、CRを行なうCR因子を調べ、最近癌細胞で最も頻繁に変異を起こしていることが分ったARID1Aを含む8種類の因子がDNAの二重鎖切断の修復に重要であり、X線や抗癌剤のシスプラチンに対する抵抗性に必要である事が分った。癌の治療法の選択に重要な情報である。また転写の近傍に二重鎖切断が起きた時に転写伸長因子がATMにリン酸化され、転写抑制因子PRC1を呼び寄せて転写を抑え修復を亢進する事が分った。

研究成果の概要(英文)：We have identified chromatin remodeling factors of BAF complex required for accumulation of KU proteins at DNA double-strand breaks (DSB) and its repair by NHEJ. Among the factors are ARID1A recently determined as one of the most frequent mutation in various cancer cells and other factors, which are silenced very often in cancer cells. These cells are also sensitive to a common cancer therapy drug cisplatin. Therefore, many of cancer cells are at least partly DNA repair deficient, suggesting that effective cancer therapy can be predicted by the analysis of the chromatin remodeling factors. Another finding of this project was the mechanisms of transcriptional repression at DSB. In response to DSB ATM is activated and ENL, a factor in the transcriptional elongation complex, is phosphorylated by the ATM, that enables to recruit the Polycomb complex PRC1 to the site, which ubiquitinates histone H2A leading to the repression of transcription at the site and DSB repair proteins at the site.

研究分野：Molecular biology and DNA repair

キーワード：chromatin remodeling DNA repair ARID1A transcription ENL Polycomb Ubiquitination transcription and repair

1. 研究開始当初の背景

細胞内 DNA の損傷の修復にはクロマチンが多少なりともほどこれるリモデリング過程が必要であることが近年明らかになりつつあり、ゲノムの安定性、突然変異、発癌、細胞死、老化などに与えるゲノム不安定性の影響を知るには DNA 修復機構のみならずそれに関わるクロマチンリモデリング (CR) の機構の理解が不可欠である事を意味している。CR と言っても沢山の機構があり、ヒストンの種々の修飾は DNA 修復でも良く知られているが、転写の領域では知られている ATP 依存的な CR の DNA 修復への関与は殆ど知られていなかった。また、修復と転写の CR の相違についても全く分ってはいなかった。

2. 研究の目的

ATP 依存的なクロマチンリモデリングが DNA 二重鎖切断 (DSB) の修復に関わり合っているかを調べる。これまでに報告の全くない ISWI ファミリーの ACF1/SNF2H 複合体の DSB 修復との関係を調べる。さらに、癌細胞での高頻度の突然変異が最近報告された SWI/SNF ファミリー因子の関与を調べる。転写と DSB 及びその修復の関係について、独自に開発した細胞系で明らかにする。とりわけ、転写を延ばす機能を持ち RNA ポリメラーゼ II 複合体にある ENL/AF9 が転写を抑制するポリコム複合体 (PRC1) の因子 BMI1 と相互作用する事が分った。この機能的意義を明らかにする。これらを通じて、DNA 損傷と CR と修復に関わる発癌、細胞死、修復、老化の関係を理解し、出来れば、癌治療や老化抑制の方向性が見えて来ることを期待している。

3. 研究の方法

CR 因子が DSB にどのような反応をヒト細胞内で見せるかを我々が開発した、顕微鏡を通してのレーザーマイクロ照射に集積するか、あるいは多数の I-SceI サイトを一つの locus に作ったヒト細胞でのこの制限酵素による DSB に集積するかどうかを顕微鏡で観察して判断する。転写サイトを I-SceI サイトの近傍に置き、転写産物に YFP を付けた蛋白が結合することにより転写が起きているかどうかを検証出来るシステムを確立した。この系を使って、DSB が、どういう条件で転写を制御するかを解析する。

75 を越える CR 因子に対してそれぞれの発現抑制の siRNA を準備し、発現を抑制したヒト細胞にレーザーで作った損傷に GFP タグを付けた KU80 などの DSB の NHEJ 修復蛋白の集積への影響を見て判断する。

新規相互作用蛋白質の同定には FLAG タグを付けた ENL 蛋白質をヒト 293 細胞で定常発現させ、免疫沈降した蛋白をゲルで分けて質量分析で同定した。

4. 研究成果

1) 新しく樹立したヒト U2OS 細胞 (U2OS-I-SceI-19) は I-SceI サイトに続いて転写活性化因子に Cherry 蛍光蛋白を結合させタモキシフェンで核移行が起きる蛋白の結合部位があり、下流の転写される遺伝子は転写された mRNA は特定の構造を作り YFP 蛋白に繋いだ MS2 蛋白が結合するので転写が起きているかどうかを可視化出来る。まずこの細胞を使って ISWI ファミリーの ATP 依存的 CR 因子 ACF1 やその ATPase 活性を持つ SNF2H が DSB に集積することを発見した。これらのノックダウン細胞は KU の DSB への集積が低下し、放射線で生じた二重鎖切断をコメットアッセイで調べると時間が経っても修復されず、また X 線やブレオマイシンに感受性となっていた。その分子機構として、ACF1 は放射線が細胞に当たると ACF1 と直接に結合し、このことにより ACF1-SNF2H 複合体が CR を行なうとともに KU 蛋白を損傷の現場にリクルートする事が分った (論文番号 20; Lan et al. Mol Cell 2010)。

2) 多くの新規相互作用蛋白質の同定を請け負う研究や照射レーザー光への集積を解析する実験で、この新学術領域研究班の研究者を含む全国の研究者のゲノム安定性を制御する蛋白質の研究を共同研究として行なった。これらの結果を多くの論文として発表した。

3) ACF1 の論文の後に、75 種類程の CR 因子のノックダウンを行ない、その KU のレーザー照射域への集積と NHEJ 活性への影響を調べ、65%を越える因子が両方の活性に関与している事を突き止めた。その結果を基に、転写を制御する SWI/SNF ファミリーの BAF 複合体の NHEJ の修復での役割を解析し始めた。その頃に、BAF 複合体のバリエーション因子、すなわち転写を活性化する複合体のコア因子ではなく転写領域を決定する機能がある因子の ARID1A が多くの癌細胞のゲノムシーケンシングで変異が見つかりその頻度は p53 を同程度である事が発表された。このことは ARID1A に変異のある癌細胞に修復欠損がある事を意味するが、問題と考えたのは、ARID1B という ARID1A 良く似た構造を持ち、転写の複合体では 1A と 1B が同じ機能には関与しない exclusive な関係にある BAF 複合体因子の存在である。もし、ARID1A のない癌細胞でその代わりに ARID1B がするのなら、ARID1A が変異していて、発現欠損していても細胞は修復欠損ではない。しかし、KU80 の DSB への集積や NHEJ の活性には両方の ARID 蛋白が必要であり、いずれを欠損しても X 線に感受性になる事が分った。他の 8 種の BAF 複合体因子のノックダウンをして BRG1 (あるいは BRM の ATPase) 以外に、SNF5, BAF155, BAF170 のコア因子に加えて BAF60a, BAF60c が ARID1A と ARID1B 以外に NHEJ の機能に必要である事が分った。さらに、これらの因子は抗癌剤としても頻繁に用いられているシ

スプラチンに対しても細胞が抵抗性を示すのに必要である事が分った。すなわちこれらの因子は NHEJ のみならずシスプラチンの損傷修復に関わる機構にも関与している。癌細胞でのこれらの因子の発現を 30 種類の肺がん細胞株で調べると 70%を越える細胞株で細胞の放射線やシスプラチン抵抗性に必要などれかの因子を欠損している事が分り、癌の治療法の選択に役に立ちうると考えられ、さらにこの癌細胞の弱点を突けば癌細胞特異的な治療も可能になるかもしれない (論文番号 2)。

4) 転写と DSB および CR と DNA 修復については、研究期間の最後に重要な発見を *Mol Cell* に発表する事が出来た。我々は、転写の elongation を助ける Super Elongation Complex (SEC) と呼ばれる複合体に含まれる ENL 蛋白が DSB による転写の抑制と DSB の修復に関与している事を発見した (論文番号 1)。これは DSB の転写と共役した DNA 修復と言えるかも知れない。1) で説明した U2OS-1-Scel-19 細胞を用いて、進行する転写の上流に作られた DSB により ATM が活性化され、ENL がそれによりリン酸化され転写を抑制するヒストン H2A のユビキチン化能のあるポリコム複合体 PRC1 の BMI1 と結合して PRC1 とその転写サイトに呼び込み H2A のユビキチン化が起きる。これにより転写が抑えられる。同時に DSB の修復蛋白の KU が集積出来るようになり修復が起き、それにより細胞は X 線等に抵抗性になる。この機構はこれまで、DSB により近傍の転写が抑制されるという現象の分子機構をはじめて明らかにしたもので、高く評価される業績と考える。これらの研究の生物学的及び医学的意義について: 3) の研究は癌の治療法の選択と新しい癌細胞特異的な治療法の開発に役立つと考え、その方向で研究を進めている。また 4) の研究は神経細胞死などの転写が亢進している細胞での機能が重要になるかも知れない。

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 20 件)

1. Ui A, Nagaura Y., and Yasui A. Transcriptional elongation factor ENL phosphorylated by ATM recruits Polycomb and switches off transcription for DSB repair. *Mol Cell*, in press. (査読有り)
2. Watanabe R, Ui A, Kanno S-I, Ogiwara H, Nagase T, Kohno T, and Yasui A. SWI/SNF factors required for cellular

resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability, *Cancer Res.* **74**:2465-2475, 2014. (査読有り)

3. Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S-I, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC, Yokota J, Yasui A and Kohno T. Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining. *Oncogen* **33**, 1640-1648, 2014. (査読有り)
4. Nakajima S, Lan L, Wei L, Hsieh CL, Rapić-Otrin V, Yasui A, Levine AS. Ubiquitin-specific protease 5 is required for the efficient repair of DNA double-strand breaks. *PLoS One.* **9**, 2014. (査読有り)
5. Zaytseva O, Tennis N, Mitchell N, Kanno S, Yasui A, Heierhorst J, Quinn LM. The novel zinc finger protein dASCIZ regulates mitosis in *Drosophila* via an essential role in dynein light-chain expression. *Genetics.* **196**, 443-53, 2014. (査読有り)
6. Matsuzawa A, Kanno S, Nakayama M, Mochiduki H, Wei L, Shimaoka T, Furukawa Y, Kato K, Shibata S, Yasui A, Ishioka C, Chiba N. The BRCA1/BARD1-interacting protein OLA1 functions in centrosome regulation. *Mol Cell*, **53**, 101-14, 2014. (査読有り)
7. Ogiwara H, Ui A, Shiotani B, Zou L, Yasui A, and Kohno T. Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. *Carcinogenesis*, **34**, 2486-97, 2013. (査読有り)
8. Toga T, Kuraoka I, Yasui A, and Iwai S. A transfection reporter for the prevention

- of false-negative results in molecular beacon experiments. *Anal Biochem.* 440, 9-11, 2013. (査読有り)
9. Itoh G, Sugino S, Ikeda M, Mizuguchi M, Kanno SI, Amin MA, Iemura K, Yasui A, Hirota T, and Tanaka K., Nucleoporin Nup188 is required for chromosome alignment in mitosis. *Cancer Sci.* 104, 871-879, 2013. (査読有り)
10. Yang Y, Wang C, Zhang P, Gao K, Wang D, Yu H, Zhang T, Jiang S, Hexige S, Hong Z, Yasui A, Liu JO, Huang H, Yu L. Polycomb group protein PHF1 regulates p53-dependent cell growth arrest and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 288, 529-539, 2013 (査読有り)
11. Musselman CA, Avvakumov N, Watanabe R, Abraham G, Allen C, Roy S, Nunez J, Nickolof J, Kulesza CA, Yasui A, Cote J and Kutateladze TG. Molecular basis for H3K36me3 recognition by the tudor domains of PHF1. *Nat. Struct. Mol Biol.* 19, 1266-1272, 2012. (査読有り)
12. Zhang X, Horibata K, Saijo M, Ishigami C, Ukai A, Kanno S, Tahara H, Neilan EG, Honma M, Nohmi T, Yasui A, and Tanaka K. Mutations in UVSSA cause UV-sensitive syndrome and destabilize ERCC6 in transcription-coupled DNA repair. *Nat Genet.* 44, 593-597, 2012. (査読有り)
13. Nomura H, Yoshimura A, Edo T, Kanno S, Tada S, Seki M, Yasui A, Enomoto T. WRNIP1 accumulates at laser light irradiated sites rapidly via its ubiquitin-binding zinc finger domain and independently from its ATPase domain. *Biochem Biophys Res Commun.* 417, 1145-1150, 2012. (査読有り)
14. Wei, L. Lan L, Yasui A, Tanaka K, Saijo M, Matsuzawa A, Kashiwagi R, Maseki E, Hu Y, Parvin JD, Ishioka C, and Chiba N. BRCA1 contributes to transcription-coupled repair of DNA damage through polyubiquitination and degradation of Cockayne syndrome B protein. *Cancer Sci.* 102, 1840-1847, 2011. (査読有り)
15. Li S, Kanno SI, Watanabe R, Ogiwara H, Kohno T, Watanabe G, Yasui A, and Lieber MR. PALF acts as both a single-stranded DNA endonuclease and a single-stranded DNA 3'-exonuclease and can participate in DNA end joining in a biochemical system. *J Biol Chem.* 286, 36368-36377, 2011. (査読有り)
16. Zlatanou A, Despras E, Braz-Petta T, Boubakour-Azzouz I, Pouvelle C, Stewart GS, Nakajima S, Yasui A, Ishchenko AA, Kannouche PL. The hMsh2-hMsh6 complex acts in concert with monoubiquitinated PCNA and Pol η in response to oxidative DNA damage in human cells. *Mol Cell.* 43, 649-662, 2011. (査読有り)
17. Ogiwara H, Ui A, Otsuka A, Satoh H, Yokomi I, Nakajima S, Yasui A, Yokota J, and Kohno T, Histone acetylation by p300 at double-strand break sites facilitates SWI/SNF chromatin remodeling and the recruitment of non-homologous end joining factors. *Oncogene*, 18, 2135-2146, 2011. (査読有り)
18. Horibata K, Saijo M, Bay MN, Lan L, Kuraoka I, Brook PJ, Honma M, Nohmi T, Yasui A, and Tanaka K. Mutant Cockayne syndrome group B protein inhibits repair of DNA topoisomerase

- I-DNA covalent complex. *Genes Cells*, 16, 101-114, 2011. (査読有り)
19. Itoh G, Kanno SI, Uchida KS, Chiba S, Sugino S, Watanabe K, Mizuno K, Yasui A, Hirota T, and Tanaka K. CAMP (C13orf8, ZNF828) is a novel regulator of kinetochore-microtubule attachment. *EMBO J.* **30**, 130-144, 2011. (査読有り)
20. Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, Janicki SM, Ogiwara H, Kohno T, Kanno SI, and Yasui A. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. *Mol Cell* 40, 976-987, 2010. (査読有り)

[学会発表](計 9 件)

1. Yasui A. SWI/SNF chromatin-remodeling factors required for both NHEJ and NER are frequently silenced in cancer cell. 5th Japan-US DNA repair meeting, October 28-31, 2014, Tokushima (Japan)
2. Yasui A., Repair and chromatin remodeling factors required for cellular resistance to radiation damage, 13th International Workshop on Radiation Damage to DNA, MIT, June 14-18, 2014. Boston (USA)
3. Yasui A, Chromatin-remodeling factors for cellular resistance to DNA damage. Symposium for replication, repair and transcription; Integrity coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome. Feb. 4-5, 2014, Kyoto (Japan)
4. Yasui A. DNA damage response of chromatin remodeling factors in human cell, 3rd Erling Seeberg Symposium June 19-24, 2012, Trondheim (Norway)
5. Yasui A., Repair mechanisms of DNA strand breaks identified by visualizing proteins in human cells, 14th International Congress of Radiation Research, August 27-Sept. 1, 2011 Warsaw (Poland)
6. Yasui A. DNA strand breaks repair and cancer therapy, symposium of Genome integrity. Annual Meeting of Japanese Cancer Research Association, October 4, 2011. Yokohama (Japan)

7. Yasui A. DNA damage and repair in living cell, its implication for aging and cancer, 70th Anniversary IDAC, November 11, 2011. Sendai (Japan)
 8. Yasui, A., Repair of DNA strand breaks in human and its epigenetic influences, 27th RBC-NIRS international symposium, Dec. 9-10, 2011, Kyoto (Japan)
 9. Yasui A. Process of recovery from damage visualized in live state. Japan-US DNA repair meeting, April 13, 2013, Sendai (Japan)
- [図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
http://www.idac.tohoku.ac.jp/ja/activities/research/Dyn_prot/index.html

6. 研究組織
(1)研究代表者
安井 明 (YASUI, Akira)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号：60191110