

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H01737

研究課題名(和文) ARID1Aを含むBAF複合体のNHEJとNERでの機能と癌治療

研究課題名(英文) Functions of BAF complex in DNA repair and cancer therapy

研究代表者

安井 明 (YASUI, Akira)

東北大学・加齢医学研究所・加齢研フェロー

研究者番号：60191110

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々はヌクレオゾームリモデリング NR を行うSWI/SNF familyに属するBAF複合体が転写制御以外に種々のDNA修復に働いている事を発見し、ARID1A及びARID1BとATPaseを含むcore factor等のDNA修復に働くBAF因子を同定した。転写制御では独立して働くARID1AとARID1BがDNA二重鎖切断の修復では直接KUタンパク質に結合してNHEJを助ける。SWI/SNFの因子には種々の癌での高頻度の変異があり、それにより生じるDNA修復欠損もNRの転写制御に影響を与え、それが修復を弱体化させ、更にNRに影響して発癌や細胞老化を亢進させるモデルを発表した。

研究成果の概要(英文)：We found that BAF complex belonging to the SWI/SNF family for ATP-dependent chromatin remodeling (nucleosome remodeling) not only contributes to transcriptional regulation but also to DNA repair of various types of DNA damage and identified BAF factors involved in DNA repair. ARID1A and ARID1B, mutually exclusive variant factors for transcription in BAF complex, turned out to interact with KU protein and to contribute to DNA double-strand break repair. Thus, when cell ages, nucleosome remodeling, DNA repair and transcriptional regulation can build a negative feedback loop to promote tumorigenesis and accelerate cellular aging, as DNA repair defect creates mutation influencing NR and TR.

研究分野：DNA修復の機構の解明。ヌクレオゾームリモデリングの修復への影響、細胞癌化と老化と癌治療の開発

キーワード：DNA修復 ヌクレオゾームリモデリング BAF複合体 ARID1A ARID1B 細胞癌化 細胞老化 癌治療

1. 研究開始当初の背景

我々は SWI/SNF ファミリーに属する BAF 複合体が DNA 二重鎖切断の NHEJ 修復に関与している欠損は X 線やシスプラチンに高感受性になる事を明らかにしたばかりであった。一方、癌全ゲノム配列決定が世界中で進行し、その結果、SWI/SNF 因子の変異が種々の癌細胞の 19%で見つかり、とりわけ ARID1A など BAF 複合体因子の変異は高頻度の発癌をもたらすことが明らかになった。

2. 研究の目的

多くの遺伝子の転写制御を行う ATP 依存的クロマチンリモデリングであるヌクレオソームリモデリング(NR)が DNA 修復に関わり合っている機構を明らかにしてその欠損がもたらす細胞への影響について解明する。とりわけ研究の焦点は SWI/SNF ファミリーのメジャーなタンパク質複合体である BAF と PBAF の結合ターゲット配列を決めているバリエーション因子の ARID1A/ARID1B (BAF) と BAF180 と BAF200 などの結合タンパク質の比較である。これらの因子の欠損は高頻度の種々の臓器の発癌をもたらす。BAF 複合体は ATPase の BRG1/BRM とコア因子と ARID1A 或いは ARID1A のバリエーション因子と他のバリエーション因子から成り立っている。ARID1A/1B の代わりに ARID2 を含む三つのバリエーション因子が入ったのが PBAF 複合体。いずれもクロマチンを動かして転写を制御する機能を持つが、DNA 修復にも関わっているがその詳細は分かっていない。またいずれの因子の欠損も高頻度の種々の発癌につながる。これらのバリエーション因子の結合蛋白を同定しこれらの複合体と因子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) BAF 複合体がどのように DNA 修復に関わっているかを明らかにするために、BAF 複合体が転写制御の際に転写のターゲット DNA に結合すると考えられているバリエーション因子である ARID1A と ARID1B の DNA 二重鎖切断修復での機能を DNA 修復タンパク質との結合を調べる。

(2) BAF 複合体が紫外線損傷の修復やシスプラチンによる DNA 損傷のヌクレオチド除去修復への関与を調べる。

(3) BAF 複合体が転写への関与と DNA 修復への関与をどのように使い分けているかを明らかにするために、ARID1A と ARID1B が結合するタンパク質について免疫沈降と質量分析を行って細胞内で結合するすべてのタンパク質を同定し、これらの因子が結合するタンパク質を BAF 因子、転写制御、他の機能に分類して 1A と 1B で比較し、それぞれの欠損が特異的な発癌につながる理由や、細胞のシスプラチン感受性の理由などを明らかにする。

(4) DNA 二重鎖切断が転写の進行を抑制し、DNA 修復を亢進する機構について、ヒストンの修飾によるクロマチンリモデリングの役割を解析する。このプロセスに、SWI/SNF ファミリーの PBAF 複合体のバリエーション因子である BAF180 が重要であるという論文が 2014 年に Mol Cell に発表された。この事について、BAF180 の結合蛋白を免疫沈降と質量分析で同定し、DNA 損傷応答に関わるタンパク質を見つけてそれらの DNA 損傷応答への関与を調べ BAF 複合体と比較する。

(5) これまでに細胞の DNA 損傷感受性のデータは遺伝子のノックダウンのみであったので、CRISPR/Cas9 の系を用いた遺伝子編集で ARID1A あるいは ARID1B あるいは両方をノックアウトした細胞株を樹立し、細胞の感受性を主に調べて、癌細胞で BAF 因子の欠損細胞の感受性のモデルとしてシスプラチンを用いた癌治療法の実験を検証する。

(6) ヌクレオソームリモデリング、DNA 修復、転写制御の三つの機構が関連し、リモデリング因子の遺伝子の不安定さと epigenetic なタンパク質の高頻度の silencing がもたらす高発癌と細胞老化のモデル化を行う。

4. 研究成果

(1) ARID1A および ARID1B は、それぞれの中心の A-T Rich 配列に結合する ARID ドメインで DNA 二重鎖切断の NHEJ 修復を行う KU タンパク質と結合する。他の ARID2 などのタンパク質の ARID ドメインには、このような能力はない。

(2) ARID ドメインのアミノ酸配列は早老症の原因遺伝子 WRN の配列に類似した配列を見つけ、これらがいずれも KU タンパク質と結合し、変異の導入により結合が極めて弱くなるアミノ酸を同定した。

(3) GFP タグを付けた ARID ドメインが DNA 損傷部位に集積し、その集積に KU タンパク質は必要としない。ARID ドメインの DNA 照射部位への集積の機構はまだ分かっていない。

(4) ノックダウン実験で ARID1A あるいは ARID1B の発現を抑えた細胞では GFP-KU や GFP-XRCC4 のレーザー照射部位への集積が減少する事を以前に示したので、ARID1 タンパク質は ARID ドメインにより DNA 損傷部位に集積し、KU タンパク質と結合して、ある状況での NHEJ の開始をサポートしていると考えられる。

(5) ARID1A 或いは ARID1B の発現を siRNA で抑制した細胞では、ヌクレオチド除去修復で DNA 損傷部位に結合して修復を組み立てる XPA に GFP タグをつけて発現させると GFP-XPA の紫外線損傷への集積は著しく減少し、両 ARID1 タンパク質が XPA の損傷部位への集積をサポートしている事を示唆した。

(6) ARID1A と ARID1B に対する免疫沈降可能な抗体を用いて HEK293 細胞から免疫沈降してゲル上に電気泳動して比較した。多数の結合蛋白の分布は似ていて、それぞれに特異的に結合するタンパク質は 10 くらいであった。それぞれに結合するタンパク質をゲル上から切り出し、100 に及ぶタンパク質を質量分析器で同定した。その 30% は BAF 複合体因子であった。その中には SWI/SNF 以外のファミリーの複合体の因子も含まれていて、異なったファミリー間での因子の融通或いは交換があることを示唆している。他の結合タンパク質は DNA 修復に関わるもの、mRNA の輸送や splicing、cell cycle checkpoint などに関わるものが見つかった。詳細とそれらの機能については解析中である。

(7) PBAF のバリエーション因子で、癌細胞で高頻度の変異が報告され、DNA 修復にも関わり、そのノックダウンで、後述の二重鎖切断が生じたときに近傍の転写を抑制する機能があると報告されている BAF180 (PBRM1) に対する免疫沈降可能な抗体をもちいて HEK293 細胞エキストラクトを免疫沈降し、DNA 損傷応答に関わる幾つかの重要なタンパク質を同定した。これらの解析が進行中である。

(8) RNA ポリメラーゼ II の転写進行因子の一つである ENL はヒストンをユビキチン化して転写を抑制する機能があるポリコム複合体の PRC1 を構成する BMI1 と直接結合することを発見した。我々が以前に開発した U2OS 細胞で X クロモゾームのセントロメア領域に 200 コピーの誘導できる転写単位とその端に I-SceI サイトを入れた株を用いて、二重鎖切断の導入により転写が止まる系が ENL のノックダウンで転写が止まらなくなり、二重鎖切断による ATM カイネーズの活性化とそれによる ENL のリン酸化により BMI1 が ENL に結合して PRC1 のユビキチン化酵素である RING1B が二重鎖切断に近傍の転写サイトにリクルートされ、ヒストン H2A をユビキチン化して転写を抑制することが明らかになった。このことにより二重鎖切断を修復する KU タンパク質が損傷にアクセスして修復を行い細胞の生存に貢献することが分かった。てポリコム PRC1 を呼び寄せ、転写を抑制して DNA 修復を起こさせる。

(9) 二重鎖切断が転写を抑制する機構については我々の Mol Cell の論文よりも以前に PBAF のバリエーション因子の BAF180 が働いて ATM を呼び転写が抑制されるという論文が出ている (Downs et al. Mol Cell 2014)。BAF と PBAF の結合タンパク質を比較し、BAF180 が DNA 修復にも関わっている機構の解明と、二重鎖切断による転写抑制機構を明らかにするために BAF180 に対する免疫沈降可能な抗体を用いて、結合タンパク質を同定したところ、DNA 損傷応答に関わる重要な因子を同定した。この相互作用により、PBAF の DNA 損傷応答機構について明らかになり、同時に二

重鎖切断が抑制する機構について重要なヒントが得られた。

(10) 癌細胞は SWI/SNF 欠損は 19% の確率で生じ、その細胞での p53 の変異は 26% で $0.19 \times 0.74 = 0.14$ から癌細胞の 14% は DNA 損傷感受性であることが推測される。実際に BAF 因子のノックアウト細胞を CRISPR/Cas9 の遺伝子編集系で 203 細胞に作ると、シスプラチンに感受性となり、U2OS でのノックダウンの実験結果が検証された。今後は実際の癌組織で BAF の発現と変異と細胞感受性の関係を確かめる必要がある。

(11) DNA 修復に NR が貢献し、NR は複合体で機能していて、その因子の一つでも変異や epigenetic 変化が生じると機能しなくなる機構で、癌細胞の 19% に SWI/SNF 変異が見つかり、さらに過半数の癌細胞ではエピジェネティックな発現異常が起きていることを我々は報告した。NR の欠損は転写制御に影響を与え、同時に修復に影響を受けた与え、それは NR に影響を与える Negative Feedback Loop を生み出し、細胞を癌化と老化に導くことが容易に想像できる (図 3)。従って、NR と DNA 修復と転写制御の接点が発癌、細胞老化、さらに効果的な癌治療に繋がる新しいモデルを発表した。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件) 全件査読あり

- 1 Sykora P, Kanno S, Akbari M, Kulikowicz T, Baptiste BA, Leandro G, Lu H, Tian J, May A, Becker KA, Croteau DL, Wilson DM III, Sobol RW, Yasui A and Bohr VA. DNA polymerase beta participates in mitochondrial DNA repair. *Mol Cell Biol.* 2017, doi: 10.1128/MCB.00237-17.
- 2 Ishida N, Nakagawa T, Iemura SI, Yasui A, Shima H, Katoh Y, Nagasawa Y, Natsume T, Igarashi K, Nakayama K. Ubiquitylation of Ku80 by RNF126 Promotes Completion of Nonhomologous End Joining-Mediated DNA Repair. *Mol Cell Biol.* 2017 Feb 1;37(4). pii: e00347-16. doi: 10.1128/MCB.00347-16.
- 3 Watanabe R, Kanno S, Mohamadi A, Ui A, Yasui A. Nucleosome remodeling, DNA repair and transcriptional regulation build negative feedback loops in cancer and cellular aging. *Philos. Trans. Royal Society London Biol. Sci.* 2017 Oct 5;372(1731). Pii:20160473. Doi: 10.1098/rstb.2016.0373.

4 Ui A, and Yasui A. Collaboration of MLLT1/ENL, polycomb and ATM for transcription and genome integrity. *Nucleus*. 7;138-45, 2016, doi:10.1080/19491034. 2016. 1177681.

5 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*. 58:468-82, 2015, doi: 10.1016/j.molcel. 2015.03.023.

6 Tokuyama Y, Furusawa Y, Ide H, Yasui A., Terato H. Role of isolated and clustered DNA damage and the post-irradiating repair process in the effects of heavy ion beam irradiation. *J Radiat Res*. 2015 May;56(3):446-55. doi: 10.1093/jrr/rru122. Epub 2015 Feb 25.

〔学会発表〕(計 2件)国際学会、招待講演、keynote lecture

¹ Akira Yasui, Chromatin remodeling for DNA double-strand break repair and transcriptional repression, Cold Spring Harbor Asia Conference, Suzhou, China, June 13-17, 2016.

² Akira Yasui, Chromatin remodeling factors influencing transcriptional repression and DNA repair, Symposium of the European Association for Cancer Research Symposium, Protecting the Code: Epigenetic Impacts on Genome Stability Program, Berlin, Germany, October 29-November 1, 2017.

〔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：
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：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

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・フェロー
研究者番号：60191110

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()