

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K12203

研究課題名(和文) DNA損傷における細胞ロバストネスのエピジェネティクス解析

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of cellular robustness 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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本課題の目的は、放射線耐性となった細胞においてDNA損傷領域でのヒストン化学修飾とそれらを介した蛋白質ネットワークの存在を明らかにし、放射線耐性が生み出される仕組みをエピジェネティック制御の視点から解き明かすことである。ガンマ線照射後の細胞の中で細胞死を免れた細胞に対してI-Sce1のアデノウイルスを感染させDNA二本鎖切断を誘導した。DNA二本鎖切断領域のH2AXあるいはH4のアセチル化、H2AXのリン酸化の濃縮の度合いについてクロマチン免疫沈降法を用いて、またDNA修復能についてはHeLa/DR-GFPのシステムを用いて検討したが、両者に大きな差異は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：We investigated the mechanism of acquired radio-resistance in cells after gamma irradiation, focusing on histone modifications and protein networks via histone modifications around DNA damage sites. In order to clarify this, we performed chromatin immunoprecipitation (Chromatin IP) after infection I-Sce1 adenovirus, which produce DNA double-strand break, in the acquired radio-resistance HeLa/DR-GFP cells, using anti-histone H2AX acetylation, phosphorylation or histone H4 acetylation antibodies. As a result, no remarkable change of histone modifications was observed between the acquired radio-resistance and non-resistant HeLa/DR-GFP cells. We also analyzed DNA repair efficiency using HeLa/DR-GFP system between these cells. As a result, DNA repair efficiency in acquired radio-resistance HeLa/DR-GFP cells is comparable to that in non-resistant HeLa/DR-GFP cells.

研究分野：放射線生物学

キーワード：放射線障害 エピジェネティクス TIP60 アセチル化 細胞ロバストネス

## 1. 研究開始当初の背景

生物が持ち得る頑強性、すなわちロバストネスは、生命が維持継承されるために必要な性質である。放射線を細胞に照射すると、その線量依存的に細胞死は、増加するが、如何なる線量においても必ず細胞死を免れる細胞が存在する。死滅する細胞と生き残る細胞には、いったいどのような違いがあるのだろうか？細胞間の DNA 修復能の違いか、DNA 損傷に対する応答の違いか、個々の細胞間での DNA 修復反応の多様性が、放射線に対するロバストネスを生み出す可能性があるが、未だその実体は明らかにされていない。

これまでに我々は、DNA 損傷領域のヒストン H2AX に着目し、H2AX 蛋白質複合体のプロテオミクス解析により、DNA 損傷領域のヒストンのアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化などの化学修飾を介したクロマチン制御蛋白質ネットワークの存在を明らかにしてきた。これら DNA 損傷領域のヒストンの化学修飾とそれら修飾を介した蛋白質ネットワークは、放射線量に応じてダイナミックに変化する。この変化は、DNA 損傷応答シグナルの ON と OFF のバランスを調整しながら DNA 損傷応答シグナルカスケードに多様性を与えている。実際、我々は、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体による H2AX のアセチル化が、H2AX に動的な変化を与え、リン酸化を介した DNA 損傷応答シグナルの増幅にブレーキをかけていることを明らかにしている。また DNA 損傷領域のヒストンの化学修飾は、その状況によって多様に変化し、エピジェネティックなメモリーとして次世代にも継承されることから、放射線耐性に特異的なヒストンの化学修飾が存在し、その変化が耐性を生み出すきっかけとなっている可能性がある。

## 2. 研究の目的

本課題では、放射線照射によって細胞死を免れた細胞に着目し、放射線耐性の細胞にお

いて特異的な DNA 損傷領域でのヒストン化学修飾とそれらヒストン化学修飾を介した蛋白質ネットワークの存在を明らかにし、放射線耐性が生み出される仕組みをエピジェネティック制御の視点から解き明かす。

## 3. 研究の方法

本課題では、DNA 二本鎖切断を定量的に解析する DR-GFP のシステム (Methods Mol Biol. 2005) を導入した細胞にまず放射線を照射し、生き残った細胞を集め、その細胞に I-Sce1 をアデノウイルスによって発現させ、人為的に DNA 二本鎖切断を誘導する。放射線を前照射せずに I-Sce1 をアデノウイルスによって発現させて DNA 二本鎖切断を誘導した細胞を対照にして、これら細胞間での DNA 修復効率については、HeLa/DR-GFP のシステムを用い、またヒストンの化学修飾についてはクロマチン免疫沈降法によって定量して比較する。我々は、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体によるヒストン H2AX のアセチル化を介したクロマチン動的变化とそのクロマチン制御蛋白質ネットワークを明らかにしており、本課題では、それらの知見を放射線耐性という現象の中で捉え、放射線耐性の仕組みを H2AX のアセチル化を介したクロマチン制御蛋白質ネットワークの定量プロテオミクス及び H2AX 複合体のグリセロール濃度勾配法により明らかにする。

## 4. 研究成果

我々は、DNA 二本鎖切断領域において 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、クロマチン構造変換を介して DNA 損傷応答シグナルの活性化を制御していることを明らかにしている。我々は、H2AX の野生型及びアセチル化部位に変異を導入した遺伝子をそれぞれ HeLa/DR-GFP システムの細胞に安定に発現させた細胞を作製した。その細胞に I-Sce1 のアデノウイルスを感染させ、H2AX のアセチル化抗体を用いたクロマチン免疫沈降法

によって DNA 二本鎖切断領域で H2AX のアセチル化が亢進するか否かについて検討した。その結果、DNA 二本鎖切断領域で H2AX のアセチル化が亢進していることを明らかにした。TIP60 及び TIP60 のアセチル化酵素活性を欠失させた変異体、TIPM の遺伝子を HeLa/DR-GFP システムの細胞に安定に発現させた細胞はすでに樹立し、TIPM 発現細胞では DNA 損傷部位での H2AX のアセチル化の濃縮は抑制されたという知見を合わせれば、使用している H2AX のアセチル化抗体が、確かに H2AX のアセチル化を損傷部位で認識していることを確認した。

さらに Multiple Reaction Monitoring (MRM)法を用いた定量プロテオミクス法を用いて放射線照射後の H2AX のアセチル化とリン酸化を定量する手法を立ち上げ、H2AX のアセチル化及びリン酸化が、異なる二種類のがん細胞で全く異なる反応をすることを明らかにした (Matsuda, S *et al. Radiat. Environ Biophys.* 2015)。

次にこれらの細胞を用いて、まずは $\gamma$ 線照射によって DNA 二本鎖切断を誘導後に細胞死を免れた細胞を回収した。その細胞に I-Sce1 のアデノウイルスを感染させ人為的に DNA 二本鎖切断を引き起こし、クロマチン免疫沈降法によって DNA 二本鎖切断領域の H2AX のアセチル化、リン酸化の濃縮の度合いについて、 $\gamma$ 線非照射の細胞に I-Sce1 のアデノウイルスを感染させた細胞をコントロールとして比較検討した。その結果、両者に大きな差異は認められなかった。さらに同様の細胞を用いて DNA 修復能を比較検討した。その結果、放射線耐性になる前後での細胞間での DNA 修復能についても大きな差異を認めることはできなかった。現在、MRN 法を用いて TIP60 及び H2AX のアセチル化とリン酸化の定量を放射線耐性細胞で検討中である。

我々は、放射線照射、非照射の条件で細胞から H2AX を蛋白質複合体として精製し、

H2AX を介した蛋白質ネットワークの構成因子をすでに明らかにしている。この知見を用いて放射線耐性になった細胞と耐性を獲得する前の細胞における H2AX を介した蛋白質ネットワークの違いをグリセロール濃度勾配法によって見定めることが可能である。現在、この方法を用いて放射線耐性を促す H2AX を介した分子ネットワークの実態を明らかにしつつある。

#### 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 15 件)

1.Liu NA, Sun J, Kono K, Horikoshi Y, Ikura T, Tong X, Haraguchi T, Tashiro S. Regulation of homologous recombinational repair by laminB1 in radiation -induced DNA damage. *FASEB J*. 査読有 2015, 29, 2514-2525. DOI:10.1096/fj.14-265546

2.Matsuda S, Ikura T, Matsuda T. Absolute quantification of  $\gamma$ H2AX using liquid chromatography-triple quadrupole tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 査読有 2015, 407, 5521-5527. DOI:10.1007/s00216-015-8725-z.

3.Akita M, Tak YS, Shimura T, Matsumoto S, Okuda-Shimizu Y, Shimizu Y, Nishi R, Saitoh H, Iwai S, Mori T, Ikura T, Sakai W, Hanaoka F, Sugawara K. SUMOylation of xeroderma pigmentosum group C protein regulates DNA damage recognition during nucleotide excision repair. *Sci Rep*. 査読有 2015, 5:10984. DOI: 10.1038/srep10984.

4.Arimura Y, Kimura H, Oda T, Sato K, Osakabe A, Tachiwana H, Sato Y, Kinugasa Y, Ikura T, Sugiyama M, Sato M, Kurumizaka H. Corrigendum: Structural basis of a nucleosome containing histone H2A.B/H2A.Bbd that transiently associates with reorganized chromatin. *Sci Rep*. 査読有 2015, 5:9628. DOI: 10.1038/srep09628.

5.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. hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes Cells*. 査読有 2015, 20, 681-694. DOI: 10.1111/gtc.12262

6.Matsuda S, Furuya K, Ikura M, Matsuda T, Ikura T. Absolute quantification of acetylation and phosphorylation of the histone variant H2AX upon ionizing radiation reveals distinct cellular responses in two cancer cell lines.

**Radiat Environ Biophys.** 査読有 2015, 54, 403-411. DOI: 10.1007/s00411-015-0608-3.

7. Matsuda S, Adachi J, Ihara M, Tanuma N, Shima H, Kakizuka A, Ikura M, Ikura T, Matsuda T. Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor. **Nucleic Acids Res.** 査読有 2016, 44, 636-647. DOI: 10.1093/nar/gkv967.

8. Ikura M, Furuya K, Matsuda S, Matsuda R, Shima H, Adachi J, Matsuda T, Shiraki T, Ikura T. Acetylation of Histone H2AX at Lys 5 by the TIP60 Histone Acetyltransferase Complex Is Essential for the Dynamic Binding of NBS1 to Damaged Chromatin. **Mol Cell Biol.** 査読 2015, 35, 4147-4157. DOI:10.1128/MCB.00757-15.

9. Tanaka H, Muto A, Shima H, Katoh Y, Sax N, Tajima S, Brydun A, Ikura T, Yoshizawa N, Masai H, Hoshikawa Y, Noda T, Nio M, Ochiai K, Igarashi K. Epigenetic Regulation of the Blimp-1 Gene (Prdm1) in B Cells Involves Bach2 and Histone Deacetylase 3. **J Biol Chem.** 査読有 2016, 291, 6316-6330. DOI:10.1074/jbc.M116.713842.

10. Doiguchi M, Nakagawa T, Imamura Y, Yoneda M, Higashi M, Kubota K, Yamashita S, Asahara H, Iida M, Fujii S, Ikura T, Liu Z, Nandu T, Kraus WL, Ueda H, Ito T. SMARCAD1 is an ATP-dependent stimulator of nucleosomal H2A acetylation via CBP, resulting in transcriptional regulation. **Sci Rep.** 査読有 2016, 6:20179. DOI: 10.1038/srep20179.

11. Matsuda S, Matsuda Y, Yanagisawa SY, Ikura M, Ikura T, Matsuda T. Disruption of DNA Damage-Response by Propyl Gallate and 9-Aminoacridine. **Toxicol Sci.** 査読有 2016, 151, 224-235. DOI: 10.1093/toxsci/kfw039.

12. Ikura M, Furuya K, Fukuto A, Matsuda R, Adachi J, Matsuda T, Kakizuka A, Ikura T. Coordinated Regulation of TIP60 and Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1 in Damaged-Chromatin Dynamics. **Mol Cell Biol.** 査読有 2016, 36, 1595-1607. DOI: 10.1128/MCB.01085-15.

13. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. **Sci Rep.** 査読有 2016, 6:24318. DOI: 10.1038/srep24318.

14. Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Cheung E, Aburatani H, Takayama KI, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, Ito T. Histone H2A T120 Phosphorylation Promotes Oncogenic Transformation via Upregulation of Cyclin D1. **Mol Cell.** 査読有 2016, 64, 176-188. DOI: 10.1016/j.molcel.2016.09.012.

15. Kakumu E, Nakanishi S, Shiratori HM, Kato A, Kobayashi W, Machida S, Yasuda T, Adachi N, Saito N, Ikura T, Kurumizaka H, Kimura H, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Xeroderma pigmentosum group C protein interacts with histones: regulation by acetylated states of histone H3. **Genes Cells.** 査読有 2017, 22, 310-327. DOI: 10.1111/gtc.12479.

[学会発表] (計 18 件)

口頭発表

1. Tsuyoshi Ikura 「Chromatin dynamics in DNA damage response」First DSV/CEA-RBC joint workshop 2015 年 4 月 8-10 日 France

2. Tsuyoshi Ikura 「Acetylation-dependent positive feedback loop regulation in dynamic chromatin equilibrium」大阪大学蛋白研セミナー、Institute for Protein Research (IPR) Seminar, 2015 年 5 月 18 日~19 日、吹田市

3. Tsuyoshi Ikura 「The Role of Histone H2AX Dynamics in DNA Damage Response」第 15 回国際放射線研究会議 (ICRR2015) 2015 年 5 月 25 日~29 日、京都市

4. Jiying Sun, Tsuyoshi Ikura, Satoshi Tashiro 「Molecular mechanism of etoposide induced 11q23 chromosome translocation. Etoposide による 11q23 染色体転座形機構の解明」第 74 回日本癌学会学術総会, 2015 年 10 月 8 日~10 日、名古屋市

5. 井倉 毅「アセチル化を介した損傷クロマチンダイナミクス」横浜市立大学生命医科学研究科 2015 年 11 月 17 日、横浜市

6. 井倉 毅、古谷寛治、松田 俊、松田知成、松田 涼、田代 聡、井倉正枝「DNA 損傷応答における動的クロマチン平衡とその意義」ワークショップ ゲノムストレス応答における普遍性と多様性の相互転換 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会合同大会 2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸市

7. 井倉 毅「ヒストン化学修飾から見た DNA 修復研究の展望」モノクローナル抗体研究所、ランチョンセミナー 第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会合同大会 2015 年 12 月 1 日~4 日、神戸市

8. 井倉 毅「クロマチン制御から見た DNA 損

傷応答研究の現状と今後の展望」  
東北大学加齢医学研究所 2016年1月15日、  
仙台市

9. 井倉 毅 「クロマチンの動的変化に着目  
したゲノム損傷応答の多様性の理解」  
変位機構研究会・第29回 夏の学校，招待  
講演、2016年9月10日(土)-11日(日) 京都  
府立ゼミナールハウス 京都府京北町

10. 井倉 毅 がん研究入門コース1「がん  
研究におけるクロマチン生物学」招待講演  
第75回日本癌学会学術総会 2016年10月8  
日(土) パシフィコ横浜 横浜市

11. 井倉 毅 古谷寛治、白木琢磨、井倉正  
枝 「DNA 損傷応答におけるヒストン H2AX  
複合体モジュールのダイナミクス」  
第89回 日本生化学会大会 シンポジウム  
「細胞のロバストネスを規定する蛋白質複  
合体のダイナミクス」シンポジウム主催 2016  
年9月26日(月) 東北大学 仙台市

12. 井倉 毅、白木琢磨、古谷寛治、井倉正  
枝 「ゲノムストレス応答の多様性を数理的ア  
プローチで理解する」  
第39回 日本分子生物学会年会 シンポジウ  
ム「ちいさな数理の見つけ方」シンポジウム  
主催 2016年12月2日(金)パシフィコ横浜  
横浜市

13. 井倉 毅 「タンパク質複合体解析の現状  
と今後への挑戦」岡崎フラグメント50周年  
シンポジウム「DNA複製の過去、現在、未来  
-ゲノム複製からエピゲノム複製へ」招待講演  
2016年12月22日(木)名古屋大学 名古屋市

#### ポスター発表

14. 松田俊、足立淳、伊原賢、田沼延公、島礼、  
垣塚彰、井倉正枝、井倉毅、松田知成 「ピル  
ビン酸キナーゼとピルビン酸デヒドロゲナ  
ーゼ複合体によるアセチル CoA の治産池消  
モデル」第38回日本分子生物学会年会第88  
回日本生化学会合同大会 2015年12月1日  
~4日、神戸市

15. 孫継英、木野村愛子、原田昌彦、井倉毅、  
田代聡 「Involvement of a chromatin  
remodeling factor in chromosomal  
translocations」第38回日本分子生物学会年  
会第88回日本生化学会合同大会 2015年12  
月1日~4日、神戸市

16. 町田晋一 井倉正枝 孫 継英 小林  
航 堀越保則 福戸敦彦 田代 聡 井倉  
毅 胡桃坂 仁志 「リンカーヒストン H1 を  
含むクロマチンでの相同組換え反応」  
第39回 日本分子生物学会年会 2016年11  
月30日(水)パシフィコ横浜 横浜市

17. 堀越保則 島 弘季 河野一樹 鈴木秀  
和 松田 俊 Volker J Schmid. 福戸 敦彦  
木野村愛子 孫 継英 松田知成 井倉  
毅 楯 真一 五十嵐 和彦 Marion  
Cremer, Thomas Cremer, 田代 聡 「RAD51

による相同組換え修復の制御機構」第39回  
日本分子生物学会年会 2016年11月30日  
(水)パシフィコ横浜 横浜市

18. 野田真美子 有村泰宏 藤田理沙 井倉  
(野村)正枝 岩崎 健 孫 継英 小林 航  
田代 聡 大川 恭行 木村 宏 井倉  
毅 胡桃坂 仁志 「がん細胞で高頻度にお  
こるヒストン H2B 点変異体はヌクレオソ  
ム構造および細胞増殖に影響を与える」  
第39回 日本分子生物学会年会2016年 12  
月2日(金)パシフィコ横浜 横浜市

#### 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

##### (2)連携研究者

松田知成(MATSUDA, Tomonari)

京都大学工学研究科附属 流域圏総合環境質  
研究センター・准教授  
研究者番号：50273488

##### (3)研究協力者

井倉 正枝 (IKURA, Masae)