

令和元年6月21日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00544

研究課題名(和文) アセチル化を介したクロマチンとゲノム損傷応答のダイナミズム

研究課題名(英文) Acetylation-dependent chromatin dynamics in DNA damage response

研究代表者

井倉 正枝 (IKURA, MASAE)

京都大学・生命科学研究科・研究員

研究者番号：40535275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、クロマチン構造変換に関わるTIP60によるH2AXのアセチル化が、DNA損傷領域で如何に維持され、制御されるのかについて、TIP60複合体の構成因子であるTRRAPに着目して明らかにすることを目的とした。TRRAPは、TIP60によるアセチル化シグナルの局在化に関与し、DNA損傷部位でのアセチル化を介したクロマチンの構造変換を促すことが示された。またTRRAPは、PI3リン酸化酵素ファミリーに属するが、リン酸化酵素活性は有しないことから、当初、TRRAPとATMとの競合関係が予想されたが、今回、競合ではなく、放射線の線量率によって互いの役割が異なることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回の研究で、ヒストンH2AXのアセチル化の放射線ストレス応答における役割の一端が、明らかになった。アセチル化の責任酵素であるTIP60複合体の構成因子であるTRRAPに着目したことによって、H2AXのアセチル化とリン酸化の関係は、異なる線量率によってそれぞれその役割が異なることが見えてきた。これらの知見は、福島原発事故の生体に対する放射線影響の分子レベルでの理解に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have already shown that TIP60 histone acetyltransferase complex regulates H2AX exchange via its acetylation at DNA damage sites. However, it remains unclear how this acetylation is maintained and facilitated at DNA damage sites. In this study, focusing on the component of TIP60 complex, TRRAP, we found that TRRAP recruits TIP60 to DNA damage sites and regulates acetylation-dependent H2AX exchange. Since it is known that TRRAP is a member of PI3 kinase family but has no kinase activity, it is predicted that TRRAP competes against ATM in a DNA damage response. However, our study demonstrated that TRRAP and ATM do not compete each other, but have distinct roles in DNA damage response under the circumstances of different radiation dose rate.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷応答 アセチル化 TRRAP ATM TIP60

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19(共通)

### 1. 研究開始当初の背景

放射線生物学の中で放射線障害の次世代への伝播の問題は最も重要な課題の一つである。エピジェネティクスは、次世代への影響を考慮できる学問であり、ヒストン化学修飾は、エピジェネティクス制御の担い手であることから、ヒストン化学修飾に視点を置いた DNA 二本鎖切断修復の研究は、放射線障害の次世代への影響を考える上で益々重要となっている。

我々は、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体が、DNA 損傷時にヒストン H2A のバリエーションである H2AX をアセチル化して、H2AX の交換反応を促進することを見出している (Ikura, T. *et al*, *Mol. Cell. Biol.* 2007)。これまでに我々は、クロマチンから DNA 損傷依存的に放出される H2AX に NBS1 が結合していること、また Fluorescence Recovery After Photobleaching (FRAP) 法と micro-irradiation 法(MI)を組み合わせた方法により、NBS1-GFP と損傷クロマチンとの結合が、非常にダイナミック(結合と離脱が、クロマチン上で繰り返されること)になることを明らかにした。そこで TIP60 による H2AX のアセチル化と DNA 損傷領域での NBS1-GFP のダイナミクスとの関係を検討した。TIP60 による H2AX のアセチル化を細胞内で阻害すると、micro-irradiation 後の損傷領域での NBS1-GFP の集積に対する FRAP 後の GFP シグナルの回復速度が、野生型細胞に対して遅延することが明らかになった。この結果は、TIP60 による H2AX のアセチル化が、NBS1-GFP と損傷クロマチンとのダイナミックな結合に必要であることを示しており、NBS1-GFP のダイナミクスが、H2AX の交換反応と連動したものであることを示唆している。さらに蛍光免疫組織化学的解析により、H2AX のアセチル化を阻害した細胞では、DNA 損傷領域に集積すべき NBS1 が、正常細胞とは異なり、DNA 損傷領域に限局されず、細胞核内で diffuse に染色されることが明らかになり、NBS1 のクロマチンとのダイナミックな結合は、NBS1 の集積の DNA 損傷領域への限局化に必要であることが明らかになった(Ikura, M. *et al*, *Mol. Cell. Biol.* 2015)。興味深いことに、NBS1 の DNA 損傷領域での集積に必要と考えられていた H2AX のリン酸化は、NBS1 の損傷クロマチンとのダイナミックな結合には関与しない。我々のこれら一連の実験結果から、H2AX のリン酸化は、NBS1 を損傷領域に保持させるための留め金であり、H2AX のアセチル化は、H2AX の交換反応を介して、リン酸化 H2AX とそれに結合する NBS1 を損傷領域に誘導し、NBS1 が、非損傷領域に拡散しないようにしていると考えられる。このように TIP60 による H2AX のアセチル化が、DNA 損傷応答シグナルの活性化に関与することは、明らかになりつつあるが、DNA 損傷の現場で H2AX のアセチル化シグナルが如何なる機構で誘導、維持、そして増幅されるのかについては、DNA 損傷部位で同じように活性化されるリン酸化シグナルカスケードとの関係も含めて未だ明らかにされていない。

TIP60 複合体と H2AX 複合体の共通の構成因子である TRRAP は、TIP60 のみならず PCAF, GCN5 など他のヒストンアセチル化酵素複合体の構成因子でもあり、これらアセチル化酵素とクロマチンとの結合を促進させる働きがあると考えられている。また TRRAP は、その構造的特徴から ATM, ATR, DNA-PKcs と同様に PI3 kinase のファミリーに属するが、興味深いことに TRRAP は、リン酸化酵素の活性中心であるアミノ酸が変異し、リン酸化酵素活性は確認できない。その一方で PI3 kinase のファミリーに属するリン酸化酵素 ATM, ATR, DNA-PKcs は、NBS1 と DNA 損傷部位で結合することにより、DNA 損傷の現場でのリン酸化カスケードの増幅を可能にしている。TRRAP が NBS1 と結合することは、*in vitro* で検証されているが、DNA 損傷領域で NBS1 が、TRRAP と結合するか否かは現時点では定かではない。さらに我々は、定量プロテオミクス法を用いてヒストン H2AX のアセチル化状態とリン酸化状態を定量し、これら 2 つの化学修飾が逆の相関関係になることを見出している(Matsuda, S. *et al. Radiat. Environ. Biophys.* 2015)。これらの知見から、DNA 損傷領域において、TRRAP は、TIP60 を

DNA 損傷領域に誘導し、ATM などのリン酸化シグナルカスケードと拮抗しながらアセチル化を介した DNA 損傷応答シグナルの活性化に関与している可能性がある。

## 2. 研究の目的

我々は、DNA 損傷に伴い、TIP60 複合体によるヒストン H2AX のアセチル化が、H2AX のクロマチン上での交換反応を促進し、それに伴って DNA 損傷のセンサー蛋白質 NBS1 の損傷領域への集積を可能にしていることを明らかにした。しかしながら、TIP60 による H2AX のアセチル化が、いかなる機構で、誘導、維持、そして増幅されるのかについては、未だ明らかにされていない。本課題では、TIP60 複合体の構成因子で、PI3 kinase ファミリーに属しながらもリン酸化活性のない TRRAP に着目し、DNA 損傷領域における TIP60 の集積とそれに伴うアセチル化シグナルの活性化メカニズムを明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

TIP60 複合体の構成因子 TRRAP が、DNA 損傷領域でアセチル化シグナルの活性化に如何に関与しているのかを明らかにするために TRRAP ノックダウン細胞を用いて、TRRAP が TIP60 の DNA 損傷領域への誘導に関与している可能性の有無、DNA 損傷領域のヒストン化学修飾そして NBS1-GFP のダイナミクスについて、蛍光免疫組織化学的解析、クロマチン免疫沈降法、FRAP と micro-irradiation 法を組み合わせる方法を用いて多角的に検討する。これらの結果を見据えた上で、DNA 損傷領域において TRRAP と ATM が、NBS1 との結合に対して競合的であるか否かについて ATM あるいは DNA-PKcs 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法、生化学的解析を駆使して検証する。具体的な研究計画は、以下の通りである。

1) TRRAP のノックダウン細胞を用いて、放射線照射後の TIP60 の DNA 損傷領域への誘導と集積を蛍光免疫組織化学的に解析し、さらに FRAP と micro-irradiation 法を用いて GFP-TIP60 および NBS1-GFP の損傷クロマチンとの結合ダイナミクスを検討する。

2) TRRAP をノックダウンさせた HeLa/DR-GFP 細胞を用いて I-Sce I による DNA 二本鎖切断領域の TIP60 の濃縮、あるいは DNA 損傷依存的なヒストンの化学修飾への影響をクロマチン免疫沈降法で検討する。

3) DNA 損傷領域においてアセチル化シグナルを促進させる TRRAP とリン酸化カスケードを促進させる ATM あるいは DNA-PKcs が、NBS1 に対して競合的に作用している可能性がある。この可能性について、ATM 抗体によるクロマチン免疫沈降法を用いて検証する。

## 4. 研究成果

本課題では、DNA 損傷応答シグナルの活性化に関与する TIP60 による H2AX のアセチル化が、DNA 損傷領域で如何に維持され、制御されるのかについて TIP60 複合体の構成因子である TRRAP に着目して明らかにすることが目的である。

TRRAP のノックダウン細胞を用いて、TRRAP が、放射線照射後、TIP60 及び NBS1 などの DNA 損傷応答関連因子の損傷部位への集積にどのような影響を与えるのかを蛍光免疫組織化学的解析及び FRAP と micro-irradiation (MI) を組み合わせる手法により検討した。その結果、TRRAP ノックダウン細胞では、TIP60 及び NBS1 などの DNA 損傷応答関連因子の集積が、野生型と比較して、遅延することが明らかになった。さらに FRAP と MI を組み合わせる解析においても、

TRRAPノックダウン細胞では、GFP-TIP60及びGFP-NBS1のブリーチング後のGFP回復のサイネティクスが野生型細胞と異なり、その回復速度が遅れることを確認した。

またH2AX発現細胞にTRRAP shRNAを導入し、その細胞のクロマチン分画から、DNA損傷の前後でH2AXを含むヌクレオソームを精製し、H2AXのアセチル化及びH4のアセチル化の状態を生化学的に検討した。コントロール細胞で確認できる、H2AXのアセチル化とヒストンH4のアセチル化の損傷依存的な増強が、TRRAP shRNAを導入したH2AX発現細胞では、抑制されることを確認した。さらにこの知見を検証するため、H2AXのアセチル化およびH4のアセチル化の抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。DNA損傷部位で、H2AXおよびH4のアセチル化シグナルが抑制される事が明らかになり、TRRAPが、TIP60を介したアセチル化シグナルに関与することが示された。

DNA 損傷領域においてアセチル化シグナルを促進させる TRRAP とリン酸化カスケードを促進させる ATM あるいは DNA-PKcs が、NBS1 に対して競合的に作用している可能性があると考えていたが、今回、異なる線量率で TRRAP と ATM との競合関係を検討した結果、当初の予想に反して、これら因子は、決して競合関係にあるのではなく、TRRAP をノックダウンしたことによる、放射線照射後の H2AX のアセチル化とリン酸化を介したゲノムストレス応答へのインパクトが、高線量率と低線量率の間で大きく異なることが判明した。今後は、線量率の違いによる H2AX のアセチル化とリン酸化の役割の違いを明らかにし、線量率効果のクロマチン制御に視点を置いた分子レベルでの研究を展開して行きたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- ① [Ikura, M.](#), Furuya, K., Matsuda, R., Adachi, J., Matsuda, T., Kakizuka A., Ikura, T (2016). Coordinated regulation of TIP60 and PARP-1 in damaged chromatin dynamics. *Mol Cell Biol.*36(10):1595-607. DOI: 10.1128/MCB.01085-15. 査読有
- ② Fukuto, A., [Ikura, M.](#), Ikura, T., Sun J, Horikoshi Y, Shima H, Igarashi K, Kusakabe M, Harata M, Horikoshi N, Kurumizaka H, Kiuchi Y, Tashiro S(2017).SUMO modification system facilitates the exchange of histone variant H2A.Z-2 at DNA damage sites. *Nucleus.*9: 87-94. DOI:10.1080/19491034.2017.1395543 査読有
- ③ Wakida ,T., [Ikura ,M.](#), Kuriya, K., Ito ,S., Shiroiwa ,Y., Habu ,T., Kawamoto, T., Okumura, T., Ikura ,T., and Furuya ,K(2017).The CDK-PLK1 axis targets the DNA damage checkpoint sensor protein RAD9 to promote cell proliferation and tolerance to genotoxic stress. *Elife.* 6.pii: e29953. DOI: 10.7554/eLife.29953. 査読有
- ④ Sun,J., Shi, L., Kinomura, A., Fukuto, A., Horikoshi, Y., Oma, Y., Harata, M., [Ikura, M.](#), Ikura, T., Kanaar, R., Tashiro, S(2018).Distinct roles of ATM and ATR in the regulation of ARP8 phosphorylation to prevent chromosome translocations. *Elife.*7.pii: e32222. DOI: 10.7554/eLife.32222. 査読有
- ⑤ Arimura, Y., [Ikura, M.](#), Fujita, R., Noda, M., Kobayashi, W., Horikoshi, N., Sun, J., Shi, L., Kusakabe, M., Harata, M., Ohkawa, Y., Tashiro, S., Kimura, H., Ikura, T., Kurumizaka, H (2018). Cancer-associated mutations of histones H2B, H3.1 and H2A.Z.1 affect the structure and stability of the nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 46(19):10007-10018. DOI: 10.1093/nar/gky661. 査読有

[学会発表](計 16 件)

(口頭発表)

- ① 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 2016 年
- ② 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 2016 年

- ③ 井倉 毅、白木琢磨、古谷寛治、井倉正枝「ゲノムストレス応答における機能的蛋白質複合体フラクチュエーション」生命科学系学会合同年次大会  
(第40回分子生物学会年会, 第90回日本生化学会大会) ConBio2017
- ④ 井倉正枝、福戸敦彦、古谷寛治、井倉 毅「ゲノム損傷ストレスにおける TIP60 ヒストンアセチル化酵素とポリ ADP-リボシル化酵素 PARP-1 の連携機構の役割」  
日本放射線影響学会 第60回大会 2017年
- ⑤ 古谷寛治、井倉正枝、井倉 毅「ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障する CDK-PLK1 経路による DNA 損傷シグナリングの調節」日本放射線影響学会 第60回大会 2017年
- ⑥ 井倉 毅、古谷寛治、井倉正枝「ヒストンアセチル化を介した損傷クロマチンダイナミクス」日本放射線影響学会 第61回大会シンポジウム 2018年
- ⑦ 井倉 毅、古谷寛治、井倉正枝「ゲノムストレス応答研究における知の創成」  
第41回日本分子生物学会年会 2018  
  
(ポスター発表)
- ⑧ 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「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
- ⑨ 郡司未佳、井倉正枝、脇田健史、川本卓男、井倉 毅、古谷寛治「DNA チェックポイント因子 Rad9 の機能制御を担う Cdk-P1k1 依存的機構の意義」第39回日本分子生物学会年会 2016年
- ⑩ 野田真美子、有村泰宏、藤田理沙、井倉正枝、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ー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
- ⑪ Furuya,K., Ikura,M.,Ikura,T.”CDK-PLK1 axis targets DNA checkpoint sensor protein RAD9,Promoting tolerance to genotoxic stress and cell proliferation.”  
33<sup>rd</sup> International Symposium of RBC“Cutting Edge of Radiation and Cancer biology”(2017)
- ⑫ Hara,T.,Shima,Y.,Watanabe,Y.Ikura,M.,Ikura,T.,Ishikawa,F. “CST complex, telomeric ssDNA-binding proteins,is associated with Nucleotide Excision Repair in whole genome”  
33<sup>rd</sup> International Symposium of RBC “Cutting Edge of Radiation and Cancer biology” (2017)
- ⑬ 古谷寛治、井倉正枝、井倉 毅 「ゲノム損傷ストレス下での細胞増殖を保障する CDK-PLK1 経路による DNA 損傷シグナリングの調節 」生命科学系学会合同年次大会 2017年  
(第40回分子生物学会年会, 第90回日本生化学会大会) ConBio2017
- ⑭ Hara,T., Shima,Y.,Watanabe,Y.,Ikura,M.,Ikura,T.,Ishikawa,F.  
“Telomeric ssDNA-binding proteins of CST Complex are associated with Nucleotide Excision Repair” 16<sup>th</sup> International Student Seminar (2018)
- ⑮ 古谷寛治、井倉正枝、井倉 毅「オートファジー機構によるがんシグナル経路の調節」  
第41回日本分子生物学会年会 2018年
- ⑯ 孫 継英、時 林、木野村愛子、福戸敦彦、堀越保則、尾間由佳子、原田昌彦、井倉正枝、井倉 毅、Roland Kanaar、田代 聡「ATM regulates ARP8 phosphorylation to prevent etoposide-induced chromosomal translocations」第41回日本分子生物学会年会 2018年

〔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：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：松田 知成

ローマ字氏名：(MATSUDA, tomonari)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。