

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592172

研究課題名(和文) DNA障害修復におけるアセチル化酵素 Tip60 の機能解析

研究課題名(英文) Tip60 acetyltransferase in DNA damage response

研究代表者

田代 茂樹 (TASHIRO SHIGEKI)

長崎大学・大学院 医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20300882

研究成果の概要：本研究では、環境ストレス（電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia）に対する細胞応答に際しての cPLA<sub>2</sub> の役割を知るため、DNA 障害時に核内に移行した cPLA<sub>2</sub> および Tip60 によってアセチル化される cPLA<sub>2</sub> が H2AX などによる修復機構やアポトーシスにどのように影響するか、遺伝子改変した Tip60 を用いて、癌細胞と正常細胞による感受性の相違、その制御について解明を進めた。その結果、温熱ストレスに対して Tip60 のアミノ末端側 30kDa が温度致死高感受性に移行する重要な働きをしていることを見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学 病態科学系歯学・歯科放射線学

キーワード：DNA 障害、アセチル化、Tip60、cPLA<sub>2</sub>、H2AX

## 1. 研究開始当初の背景

我々は、cPLA<sub>2</sub> の未知の働きを調べている過程で、温熱ストレスに対しても cPLA<sub>2</sub> が核内に移行して関与していることを見出した。温熱ストレス障害は主にタンパク質の変性が原因であるとされているが、タンパク質の変性が DNA 障害までも引き起こしている可能性も考えた。

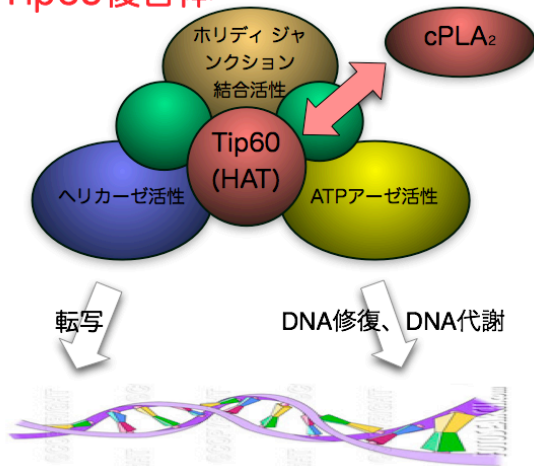
一方、cPLA<sub>2</sub> がヒストンアセチル化酵素活性を持つ因子 Tip60 と結合することが報告され

た (*Mol Cell Biol* **21**, 4470-4481, 2001)。我々もその後の一連の研究で cPLA<sub>2</sub> と Tip60 との結合を *in vivo* で確認している。これらの結果は cPLA<sub>2</sub> が核内でも役割を果たしていることを示唆し、Tip60 を経由して刺激に応答するエピジェネティクスに関与していることを示している。

クロマチン構造をもつ高等真核生物の DNA が損傷を受けた時、その損傷部位が認識され修復されるためには損傷部位のクロマチンの構造変換が必要である。その際、Tip60 が

下図に示す複合体を形成し、その複合体中に大腸菌において組換え修復に関与する RuvB と相同性のある因子が存在することが明らかになり、Tip60 複合体が DNA 障害修復に関与することが示唆された (*Cell* **102**, 463-473, 2000)。さらに、Tip60 複合体がヒストン H2AX を含む損傷クロマチンに結合することが明らかとなった (*Science* **306**, 2084-2087, 2004)。ヒストン H2AX はクロマチン構成タンパクの一つであるヒストン H2A のバリエーションであり、DNA 損傷に伴い、その C 末端がリン酸化され細胞核内の損傷部位で foci を形成することがすでに報告されている。Tip60 アセチル化酵素複合体によって促されるヒストン H2AX のダイナミクスの亢進が DNA 障害修復にとって重要なステップであることが明らかになった。これらの報告を踏まえ今回は DNA 障害に伴い複合体の中心である Tip60 に cPLA<sub>2</sub> がどのように関与してクロマチンの変化につながるのかを調べた。

### Tip60複合体



紫外線や X 線による DNA 障害について解析してきたが、今回、温熱ストレスを含めた DNA 障害時における転写因子や構造変換するクロマチンに cPLA<sub>2</sub> と Tip60 がどのように相互作用し、どのように変化していくのかを明らかにしようと試みた。特に、正常細胞とガン細胞は DNA 障害に対しての感受性が大きく異なることが知られており、その違いを明らかにすることはガン治療に応用するにあたって重要であると考えている。

本研究によって cPLA<sub>2</sub> や Tip60 の発現、修飾、核内移行の制御ができれば、頭頸部癌等の治療に際し、補助的療法として活用臨床応用の可能性があるかと期待している。さらには放射線、化学療法、温熱療法等を併用すれば、治療効果を増幅するなど医療への応用ができるものと考えている。

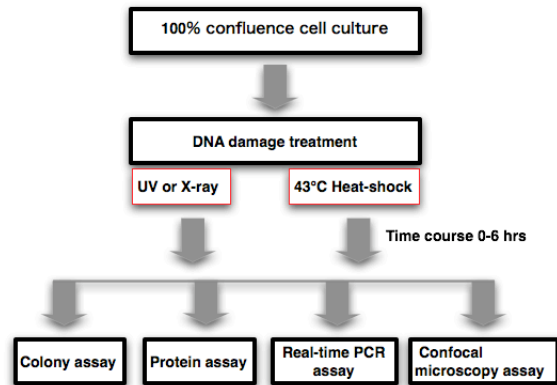
## 2. 研究の目的

本研究では、環境ストレス（電離放射線、紫外線、温熱、Hypoxia）に対する細胞応答に際しての cPLA<sub>2</sub> の役割およびを知るため、DNA 障害時に核内に移行した cPLA<sub>2</sub> および Tip60 によってアセチル化される cPLA<sub>2</sub> が H2AX などによる修復機構やアポトーシスにどのように影響するか解明を進めた。また、ガン細胞と正常細胞による感受性の相違、特に転写関連因子との相互作用とその制御について解析した。

## 3. 研究の方法

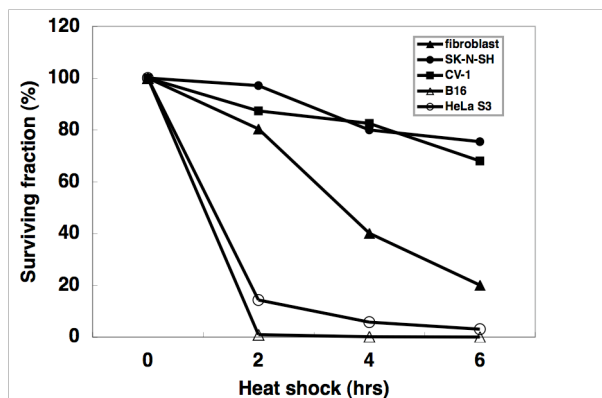
実験で使用する培養細胞について温熱ストレス、紫外線、X 線に対する応答を測定した。特に、後の遺伝子導入実験などを考慮してトランスフェクション効率のよい細胞について測定した。実験の流れを下図に示した。Heat shock は 43°C の温浴槽に入れて行った。致死感受性はコロニーアッセイにより評価し、その際、RNA やタンパク質を抽出し、cPLA<sub>2</sub> や Tip60 のウェスタンブロッティングやリアルタイム PCR も行った。

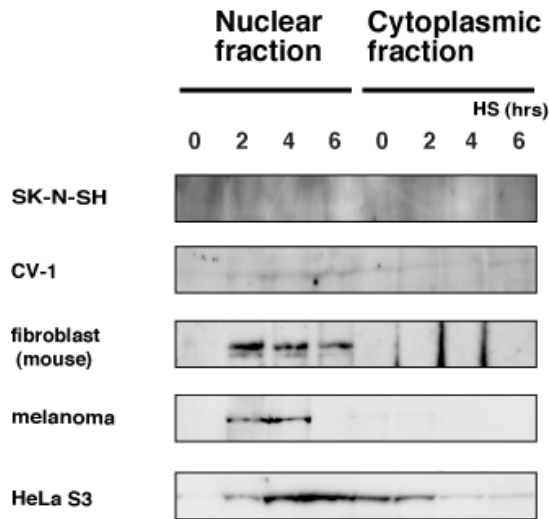
### 実験の流れ



### (1) 使用した細胞株

培養細胞における cPLA<sub>2</sub> の発現と Heat-shock 感受性の関係には相関が見られた。Heat-shock における時間ごとの生存曲線と各細胞株の cPLA<sub>2</sub> タンパク質の発現パターンを以下に示した。





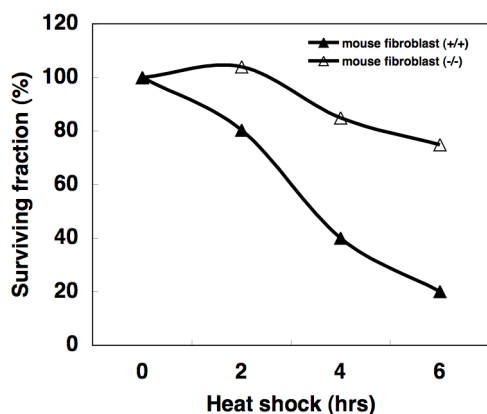
ほとんど cPLA<sub>2</sub> を発現していない細胞 (SK-N-SH, CV-1) は、Heat-shock を与えてもそれほど死んでしまうことはなく、致死感受性は低かった。

一方、cPLA<sub>2</sub> を多く発現しているガン由来の細胞 (B16, HeLa S3) は非常に高い Heat-shock の致死感受性で、2 時間で生存率がほとんどゼロに近づいた。

実験はこれらの細胞株を用いて行った。

### (2) cPLA<sub>2</sub> ノックアウトマウスの肺から初代培養した線維芽細胞の作製

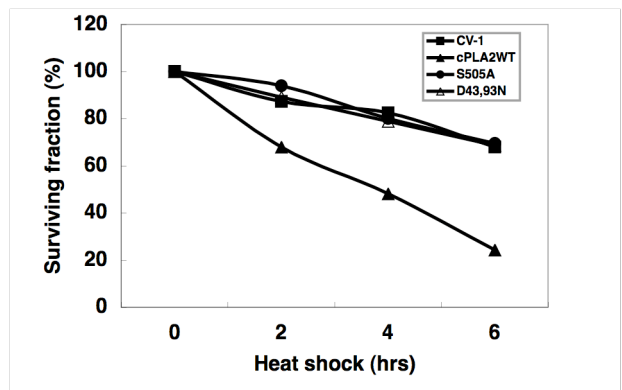
cPLA<sub>2</sub> の発現量の関与を確かめるために、cPLA<sub>2</sub> ノックアウトマウスの肺から初代培養した線維芽細胞を作製した。下の図に示すように、cPLA<sub>2</sub> が存在しない細胞はコントロールと比較して、Heat-shock 致死感受性が低くなった。



### (3) 遺伝子改変した cPLA<sub>2</sub> について

遺伝子改変した cPLA<sub>2</sub> については今までの研究において作製した S505A, D43, 93N などを使用して実験を行った。リポフェクション法によってトランスフェクションし、同様の

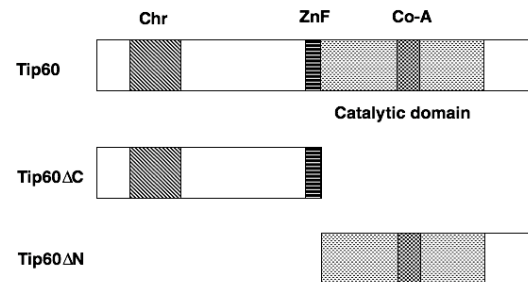
Heat-Shock 実験を行い、次に示す結果を得た。



結果は予想どおり、活性のある cPLA<sub>2</sub> をトランスフェクションした時のみ Heat-shock 致死感受性が高くなった。

### (4) 遺伝子改変した Tip60 の作製

Tip60 の各ドメインの機能について詳しく解析を行うため、遺伝子改変した Tip60 を作製して、癌細胞と正常細胞による感受性の相違、その制御について解析した。作製したコンストラクションを下に示す。



### 4. 研究成果

リポフェクション法によって遺伝子改変した Tip60 をトランスフェクションし、同様の Heat-Shock 実験を行った結果、温熱ストレスに対してアミノ末端側 30kDa が温度致死高感受性に移行する重要な働きをしていることを見出した。また、cPLA<sub>2</sub> との相互作用についても重要な部位であり、カルボキシ末端側 30kDa については温熱ストレスにおいて cPLA<sub>2</sub> とは逆の移動をする。

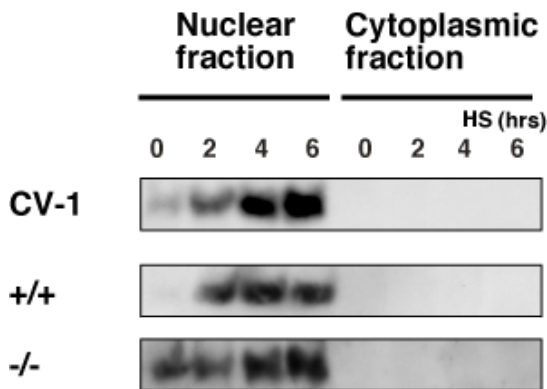
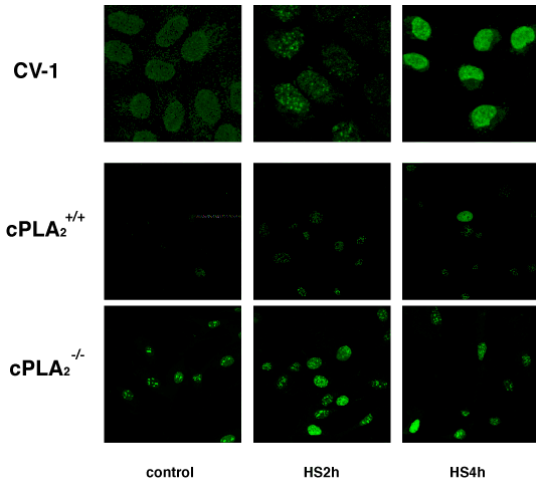
#### (1) 温熱ストレスは DNA 障害をひき起こすか

Heat-shock 後の CV-1、マウス線維芽細胞のリン酸化型 H2AX を共焦点レーザー顕微鏡で観察した。写真は次ページに示す。温熱 2 時間後からフォーカスが見られることから温熱ストレスは DNA 障害をひき起こすのではないかと考えた。

マウスの細胞でも同様の結果が得られたが、cPLA<sub>2</sub> ノックアウトマウス由来の細胞では

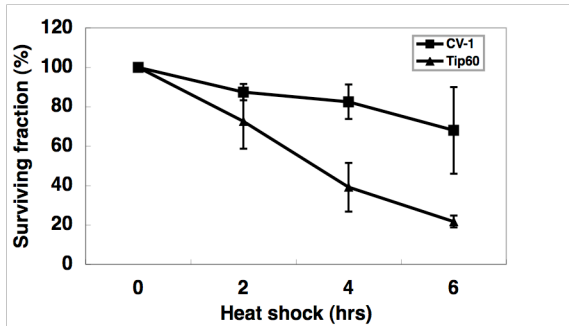
Heat-shock を与えなくてもリン酸化型 H2AX のフォーカスの形成が見られた。この結果は、ウエスタンブロットでも発現を裏付けられた。

これは cPLA<sub>2</sub> 発現が修復に抑制的に働いていることを示唆している。



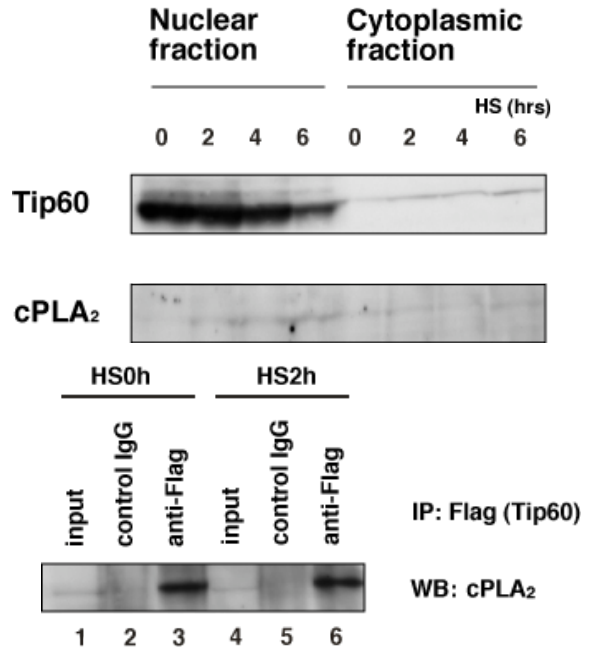
## (2) 温熱感受性は cPLA<sub>2</sub> 発現と Tip60 の相互作用によって起こる

Heat-shock 致死感受性が低い CV-1 細胞に Tip60 を遺伝子導入すると Heat-shock 致死感受性の上昇を示した。以下に示す。



しかし、内在性 cPLA<sub>2</sub> 発現には影響なく (ウエスタンブロット)、Tip60 と cPLA<sub>2</sub> の強い相互作用は維持されていた (免疫沈降)。次に

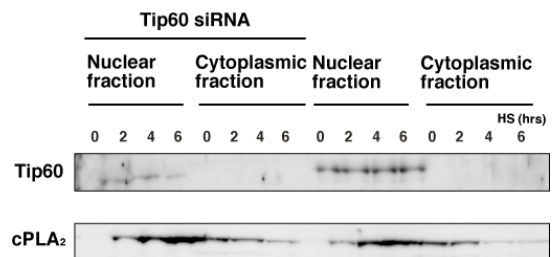
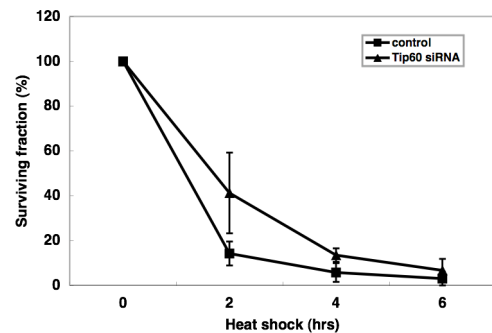
示した。



以上のことから、温熱感受性が cPLA<sub>2</sub> 発現と Tip60 の相互作用によって起こることを示唆された。

## (3) 温熱感受性には Tip60 が必要である

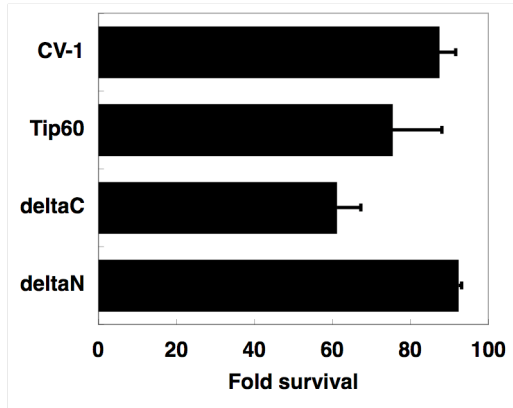
Heat-shock 致死感受性が高い HeLa S3 細胞の Tip60 の発現を抑制して温熱ストレスを与えると温熱致死感受性も抑制された。しかし、内在性 cPLA<sub>2</sub> 発現には影響なかった。以下に示す。



温熱感受性には Tip60 が必要であることが示唆された。

**(4) 温熱感受性には Tip60 の N 末端が重要な役割を果たしている**

Heat-shock 致死感受性が低い CV-1 細胞に遺伝子改変した Tip60 を遺伝子導入して Heat-shock 致死感受性を調べた。Heat-shock 2 時間後の生存率を以下に示す。Tip60 のアミノ末端が重要な働きをしていることが示唆された。



また、遺伝子改変した Tip60 について CV-1 細胞における局在を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。以下に示した。温度致死高感受性への移行に重要なアミノ末端側 30kDa は核に存在しているが、Heat-shock をしても foci は形成しなかった。また、cPLA<sub>2</sub> との相互作用についても重要な部位であり、カルボキシ末端側 30kDa については温熱ストレスにおいて cPLA<sub>2</sub> とは逆に細胞質へ移動した。

**B**

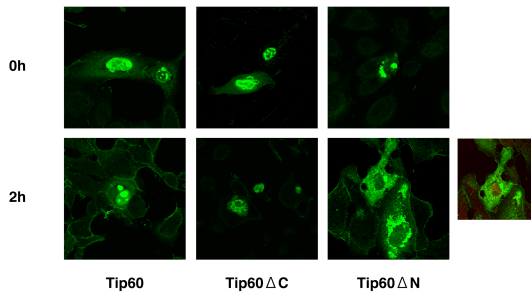


Fig. 5B

最後に cPLA<sub>2</sub> と Tip60 との相互作用について免疫沈降法で解析し、cPLA<sub>2</sub> とは Tip60 のカルボキシ末端で結合していることが示唆された。右に示した。

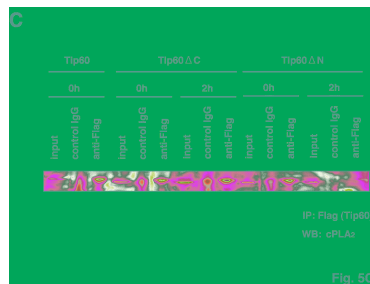
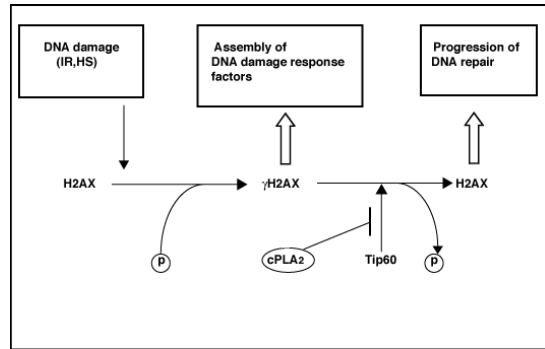


Fig. 5C

以上のことから cPLA<sub>2</sub> 発現と Tip60 は温熱致死感受性に深く関わっていることが示唆された。核内にある cPLA<sub>2</sub> は Heat-shock ストレスでの増殖には抑制的に働き、それはアセチル化酵素活性を持つ Tip60 と相互作用することによって行っていると考えている。

そして Tip60 によるアセチル化によって、DNA 二本鎖切断部位に集まってくるリン酸化型 H2AX が修復プロセスに入るための脱リン酸化を行うと予想している。簡単なスキームを以下に示した。



**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 2 件)

- ① Sumi M, Ichikawa Y, Katayama I, Tashiro S, Nakamura T.

Diffusion-weighted MR imaging of ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors: Differentiation by apparent diffusion coefficients of non-enhancing lesions

American Journal of Neuroradiology 29(10) 1897-1901 2008 査読有

- ② Takagi Y, Katayama I, Tashiro S, Nakamura T.

Parotid irrigation and cevimeline gargle for the treatment of xerostomia in patients without Sjögren's syndrome

The Journal of Rheumatology 35 (11) 2289-2291 2008 査読有

〔学会発表〕（計 1 件）

田代茂樹・中村卓

「ATM と cPLA2 と Heat-shock」

岩手医大・長崎大合同セミナー 2008

2008 年 01 月 26 日

長崎大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

田代 茂樹 (TASHIRO SHIGEKI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：20300882

### (2) 研究分担者

佛坂 由可 (HOTOKEZAKA YUKA)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：10244089

片山 郁夫 (KATAYAMA IKUO)

長崎大学・医学部・歯学部附属病院・助教

研究者番号：80295089

角 忠輝 (SUMI TADATERU)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：80284701

中村 卓 (NAKAMURA TAKASHI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：30172406