

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07053

研究課題名(和文)ゲノム安定性維持機構の破綻による男性不妊の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanism of male infertility caused by disruption of genome stability maintenance mechanism

研究代表者

松下 暢子(Matsushita, Nobuko)

麻布大学・生命・環境科学部・教授

研究者番号：30333222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、エピゲノム情報の再構築によるDNA損傷修復反応の分子基盤を明らかにすることを目的とし、エピゲノム制御因子によるDNA損傷応答遺伝子の制御機構の解明を目指してきた。その結果、放射線照射や抗がん剤投与によるDNA損傷により、転写活性が変化するエピゲノム制御因子を明らかにしてきた。さらに、このエピゲノム制御因子のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子上流に導入したレポーターコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼベースのレポーターアッセイを行ってきた。その結果として、このエピゲノム因子を阻害し、DNA損傷修復を制御する新たな化合物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢や放射線などの環境要因によるゲノムDNA損傷の蓄積が、細胞にエピジェネティックな変化をもたらし、がんの発症や老化を促進することが報告され始め、DNA損傷修復とエピジェネティクスの関連の解明は生命科学の重要な課題に浮上している。本研究の目的は、エピゲノム制御因子によるDNA損傷修復応答制御機構を明らかにすることであり、DNA損傷後にどのようなメカニズムによってエピゲノム制御因子の転写が活性化され、ヒストン修飾を行い、DNA損傷修復応答の指標として機能するのか、エピゲノム情報の再構築によるDNA損傷修復反応の分子基盤を明らかにすることは癌の発症のメカニズムの解明に有用である。

研究成果の概要(英文)：In this study, I aimed to elucidate the molecular mechanism of DNA damage repair responses by reconstructing epigenomic information and to elucidate the regulatory mechanism of DNA damage-responsive genes by epigenetic regulators. As a result, I identified epigenetic regulators whose transcriptional activity was altered by DNA damage induced by irradiation or anticancer drugs. In addition, I created a reporter construct in which the promoter region of the epigenomic regulator was introduced upstream of the luciferase gene and performed a luciferase-based reporter assay. Therefore, I identified compounds that inhibit this epigenetic factor and regulate DNA damage repair.

研究分野：分子生物学

キーワード：DNA損傷修復 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

紫外線や大気汚染などの環境の変化や過労、睡眠不足などが引き起こす様々なストレスは精子の機能低下をもたらし、男性不妊の主要な原因となる。このときみられる精子の機能低下の大きな要因として精子 DNA の損傷であり、一見正常に見える精子でも DNA の損傷があることが最近明らかになってきた。また抗がん剤治療における男性不妊の影響は、特に若年者においては大きな問題となっている。環境やライフスタイルの変化によるストレスは細胞にエピジェネティックな変化をもたらすことより精巣においても同様な変化がおきていることが考えられる。また、遺伝子発現の転写制御を行っているエピゲノム修飾が、DNA 損傷修復応答の新たな機構として重要であり、これらのエピゲノム修飾の異常によってゲノム不安定性をひきおこすことが最近報告され始めた。これらのことより、精巣においてもエピゲノム制御因子による DNA 損傷修復応答制御が示唆されるが、その詳細な機能は未だ不明である。

## 2. 研究の目的

加齢や放射線などの環境要因によるゲノム DNA 損傷の蓄積が、細胞にエピジェネティックな変化をもたらし、がんの発症や老化を促進することが報告され始め、DNA 損傷修復とエピジェネティックスの関連の解明は生命科学の重要な課題に浮上している。本研究の目的は、エピゲノム制御因子による DNA 損傷修復応答制御機構を明らかにすることであり、DNA 損傷後にどのようなメカニズムによってエピゲノム制御因子の転写が活性化され、ヒストン修飾を行い、DNA 損傷修復応答の指標として機能するのか、エピゲノム情報の再構築による DNA 損傷修復反応の分子基盤を明らかにすることである。さらに精巣には多くのエピゲノム制御因子が発現していることから、生体における DNA 損傷応答に機能するエピゲノム制御因子の機能を解明することを目指す。

## 3. 研究の方法

本研究においては DNA 損傷応答に機能するエピゲノム制御因子の転写活性化制御機構を明らかにすることにより、DNA 損傷後にどのようなメカニズムによってエピゲノム制御因子の転写が活性化され、ヒストン修飾を行い、DNA 損傷修復応答の指標として機能するのか、エピゲノム情報の再構築による DNA 損傷修復反応の分子基盤を明らかにすることを目指していた。そのために次のような実験を行った。

### (1) エピゲノム制御因子の転写制御機構の解析

放射線照射による DNA 損傷により、その転写活性が増減するエピゲノム制御因子を同定し、その制御機構の解析を行う。まず、エピゲノム制御因子の転写活性に必要なプロモーター領域を明らかにし、この部位をルシフェラーゼ遺伝子上流に導入したレポーターコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼベースのレポーターアッセイを行なう。

### (2) エピゲノム制御因子欠損細胞の解析とエピゲノム制御因子による DNA 損傷修復機構の解明

同定したエピゲノム制御因子をノックダウンした細胞における放射線感受性を検討する。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いてエピゲノム制御因子欠損細胞と、その欠損細胞にエピゲノム制御因子遺伝子を恒常的に発現させた細胞を作製し、これらの細胞における放射線や抗がん剤への感受性を検討する。また IR 後におけるヒストンの翻訳後修飾について網羅的に解析する。

### (3) エピゲノム制御因子の転写活性を特異的に制御する化合物の探索

96 穴プレートにヒト線維芽細胞を播種し、化合物ライブラリを添加し抗がん剤投与後、ルシフェラーゼベースのレポーターアッセイを行い、エピゲノム制御因子の活性化を制御する化合物について探索する。

## 4. 研究成果

DNA 損傷応答に関与する可能性のあるエピゲノム制御因子を同定し、その転写活性化制御機構を明らかにすることにより、DNA 損傷後のエピゲノム制御因子の転写活性化制御とヒストン修飾を

解析し、エピゲノム情報の再構築による DNA 損傷修復反応の解析を行った。

(1) エピゲノム制御因子の転写活性化制御機構の解析

放射線照射 (IR) による DNA 損傷により図 1 のように、その転写活性が増加するエピゲノム制御因子を同定した。さらに図 1 に示す様にリアルタイム PCR 法により mRNA 量を計測し、Ataxia telangiectasia-mutated (ATM) キナーゼ依存的に転写が活性されることを見出した。また、抗癌剤である MMC 添加によっても同様な結果が得られた。

さらに、このエピゲノム制御因子の転写活性に必要なプロモーター領域を明らかにし、この部位をルシフェラーゼ遺伝子の上流に導入したレポーターコンストラクトを作製し、ルシフェラーゼベースのレポーターアッセイを行なった。

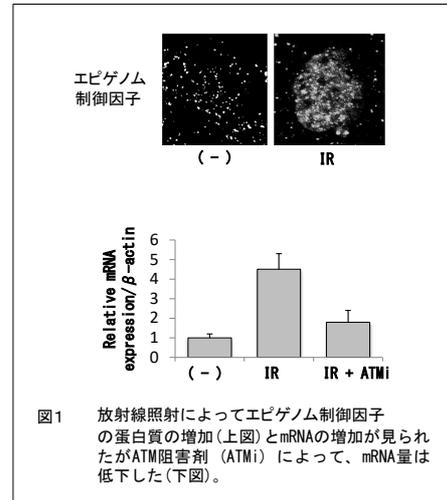


図1 放射線照射によってエピゲノム制御因子の蛋白質の増加(上図)とmRNAの増加が見られたがATM阻害剤(ATMi)によって、mRNA量は低下した(下図)。

(2) エピゲノム制御因子欠損細胞の解析とエピゲノム制御因子のDNA損傷修復機構の解明

同定したエピゲノム制御因子をノックダウンした細胞における放射線感受性を検討した。その結果、図2のようにエピゲノム制御因子をノックダウンした細胞では、コントロール細胞と比較して放射線照射 (IR) に対する感受性が亢進した。さらに、CRISPR-Cas9 システムを用いてエピゲノム制御因子欠損細胞と、その欠損細胞にエピゲノム制御因子遺伝子を恒常的に発現させた細胞を既に作製しており、これらの細胞においても放射線や抗がん剤への感受性の亢進が認められた。

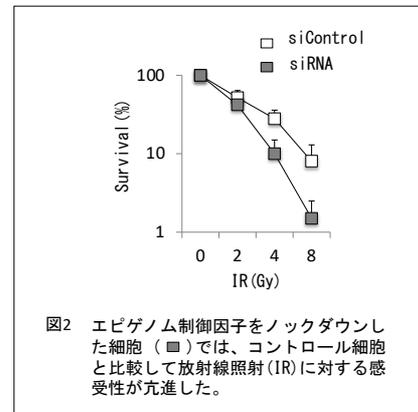


図2 エピゲノム制御因子をノックダウンした細胞 (■) では、コントロール細胞と比較して放射線照射 (IR) に対する感受性が亢進した。

(2) DNA 損傷後のエピゲノム制御因子の転写活性を特異的に制御する化合物の探索

化合物ライブラリを添加し抗がん剤投与後、ルシフェラーゼベースのレポーターアッセイを行い、標的となるエピゲノム制御因子の活性化を制御する化合物を同定した。この化合物の添加によって図3に示すように、濃度依存的に標的となるエピゲノム制御因子のプロモーター領域の転写活性が抑制された。この結果より同定した化合物によって、DNA 損傷後にその転写活性が亢進するエピゲノム制御因子の転写活性が抑制されることを明らかにした。さらに mRNA 量だけではなく、タンパク質量についても同様に抑制されることを明らかにした。

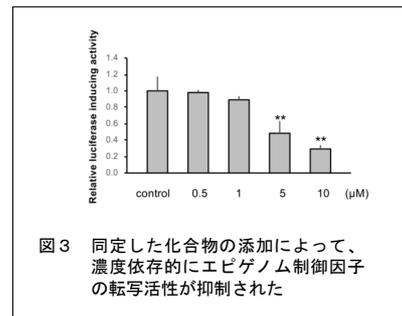


図3 同定した化合物の添加によって、濃度依存的にエピゲノム制御因子の転写活性が抑制された

これらの結果より、本研究では放射線照射や抗がん剤によって引き起こされるゲノム DNA 損傷によって転写が活性化されるエピゲノム因子を同定することができた。このエピゲノム因子の増加によって、DNA 損傷が蓄積した細胞においては何らかのエピジェネティックな変化が起こっていることを示唆することができる。その結果としてがんの発症や老化を促進される可能性が考えられる。さらに本研究の目的は、エピゲノム制御因子による DNA 損傷修復応答制御機構を明らかにすることであるが、このエピゲノム因子をノックダウンすることによって放射線や抗がん剤に対する感受性が亢進することから、エピゲノム情報の再構築による新たな DNA 損傷修復反応の制御機構が考えられる。また、今回同定することができた、このエピゲノム因子の阻害剤については、DNA 損傷修復反応を抑制する新たな抗癌剤としての可能性があり、今後は動物実験を用いた研究をさらに進めていきたい。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Takeda Keisuke, Nagashima Shun, Shiiba Isshin, Uda Aoi, Tokuyama Takeshi, Ito Naoki, Fukuda Toshifumi, Matsushita Nobuko, Ishido Satoshi, Iwawaki Takao, Uehara Takashi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 38
2. 論文標題 MITOL prevents ER stress-induced apoptosis by IRE1 ubiquitylation at ER-mitochondria contact sites.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The EMBO Journal	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embj.2018100999	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Nagashima Shun, Takeda Keisuke, Ohno Nobuhiko, Ishido Satoshi, Aoki Motohide, Saitoh Yurika, Takada Takumi, Tokuyama Takeshi, Sugiura Ayumu, Fukuda Toshifumi, Matsushita Nobuko, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 2
2. 論文標題 MITOL deletion in the brain impairs mitochondrial structure and ER tethering leading to oxidative stress	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Life Science Alliance	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.26508/lisa.201900308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Nagashima Shun, Takeda Keisuke, Shiiba Isshin, Higashi Mizuho, Fukuda Toshifumi, Tokuyama Takeshi, Matsushita Nobuko, Nagano Seiichi, Araki Toshiyuki, Kaneko Mari, Shioi Go, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 9
2. 論文標題 Critical role of CRAG, a splicing variant of centaurin-3/AGAP3, in ELK1-dependent SRF activation at PML bodies	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-56559-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Tokuyama Takeshi, Hirai Asei, Shiiba Isshin, Ito Naoki, Matsuno Keigo, Takeda Keisuke, Saito Kanata, Mii Koki, Matsushita Nobuko, Fukuda Toshifumi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 10
2. 論文標題 Mitochondrial Dynamics Regulation in Skin Fibroblasts from Mitochondrial Disease Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 450 ~ 450
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biom10030450	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuno Keigo, Nagashima Shun, Shiiba Isshin, Taniwaka Keito, Takeda Keisuke, Tokuyama Takeshi, Ito Naoki, Matsushita Nobuko, Fukuda Toshifumi, Ishido Satoshi, Inatome Ryoko, Yanagi Shigeru	4. 巻 168
2. 論文標題 MITOL dysfunction causes dwarfism with anterior pituitary hypoplasia	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 305 ~ 312
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa050	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taku Kaitsuka, Masayuki Matsushita, Nobuko Matsushita	4. 巻 529(4)
2. 論文標題 SIRT2 inhibition activates hypoxia-inducible factor 1 signaling and mediates neuronal survival	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun.	6. 最初と最後の頁 957-962
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2020.06.159.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiryu Sekine, Miyu Sekiguchi, Nobuko Matsushita	4. 巻 21
2. 論文標題 Enhanced transcription activity of histone acetyltransferase HB01 after genotoxic stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Gene Reports	6. 最初と最後の頁 100815
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.genrep.2020.100815	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kaitsuka Taku, Matsushita Masayuki, Matsushita Nobuko	4. 巻 10
2. 論文標題 Regulation of Hypoxic Signaling and Oxidative Stress via the MicroRNA/SIRT2 Axis and Its Relationship with Aging-Related Diseases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 3316 ~ 3316
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells10123316	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計2件

1. 著者名 井上英史・都築幹夫編集	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 228
3. 書名 基礎講義 生物学	

1. 著者名 田中弘文・井上英史編集	4. 発行年 2020年
2. 出版社 東京化学同人	5. 総ページ数 158
3. 書名 基礎講義 分子生物学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------