

令和 5 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04336

研究課題名(和文)放射線障害応答の多様性を規定する動的クロマチン制御を介したNAD代謝ネットワーク

研究課題名(英文) NAD metabolic network via dynamic chromatin regulation defining diversity of radiation-induced DNA damage response

研究代表者

井倉 毅 (Ikura, Tsuyoshi)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：70335686

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、デノボNAD合成酵素、NAD syn1が、クロマチンからTIP60によるH2AXのアセチル化依存的にDNA損傷部位に集積することをクロマチン免疫沈降法によってすでに明らかにしている。今回、ゲノム損傷ストレス応答における細胞核内でのこの酵素の役割について検討した。結果、このNAD syn1が、DNA損傷部位に集積することによりNAD産生の場合、細胞質でのサルベージ経路依存から細胞核内でのデノボ経路依存に変わることが示され、この細胞核内でのNADの産生が、ゲノム損傷ストレスによって誘発される細胞老化の異常加速とがん化の抑制に必要であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ニコチンアミドジヌクレオチド(NAD)は、老化やがん化において最も変動する代謝物の一つである。加齢に伴いNADが、低下することはよく知られており、NADのサプリメントは、健康食品としてもすでに販売されている。細胞は、いかなるストレスに対してもNADの低下を防ぐ戦略を持ち得ている。今回は、TIP60によるH2AXのアセチル化を介して細胞核内でNAD産生を行うことが、ゲノムストレスによるNADの産生が低下と細胞老化の異常加速を防いでいることを示した。今後はNADの低下を防ぐためにH2AXのアセチル化を亢進させる薬剤の開発が望まれる。

研究成果の概要(英文)：We have already shown by chromatin immunoprecipitation that de novo NAD synthase, NAD syn1, accumulates at sites of DNA damage in a TIP60-induced H2AX acetylation-dependent manner. In this study, we investigated the role of this enzyme in the cell nucleus in response to DNA damage stress. We found that the accumulation of NAD syn1 at the site of DNA damage shifts the cytosol-dependent production of NAD from the salvage pathway to the de novo pathway in the cell nucleus, and that the production of NAD in the cell nucleus is necessary to suppress the abnormal acceleration of cellular senescence and tumorigenesis induced by genomic damage stress.

研究分野：放射線生物学

キーワード：NAD H2AX acetylation DNA damage de novo pathway salvage pathway

1. 研究開始当初の背景

放射線障害に対する生体応答の多様性が生まれる仕組みを分子レベルで解明することは、放射線治療、低線量の放射線障害の個人差の問題を打開する上でも極めて重要である。昨今、網羅的解析とバイオイメージング技術の進歩により、ストレス応答蛋白質は、クロマチンの構成蛋白質であるヒストンのアセチル化、リン酸化、ユビキチン化などの化学修飾を介して、ストレス応答蛋白質ネットワークを形成することが明らかになっている。これらの化学修飾の程度は、ストレスの程度によって変化し、その変化の度合いも細胞ごとに異なることが明らかになっている。また最近、ヒストン蛋白質が、転写や DNA 修復の際に転写因子や修復因子の DNA へのアクセスに対して抑制的に働く、バリアー蛋白質から DNA 代謝に積極的に関与する **active player** としての機能があることも示され、この考え方は、クロマチン生物学の分野でトピックとして扱われている。実際、我々は、ヒストン H2AX が、TIP60 によりアセチル化されることによって損傷領域から放出され、シグナル因子として働き、DNA 損傷応答シグナルの活性化に寄与していることを明らかにしており、その際、シグナル因子としてクロマチンから放出された H2AX が、放射線障害などのストレスの質に応じて、ストレス応答因子と多様な結合様式を取ることを見出している。ヒストン化学修飾の変化とそれに伴うヒストン蛋白質の動的な変化が、ストレス応答蛋白質ネットワークに多様性をもたらしていると言える。

ヒストン蛋白質と同様に、エネルギー代謝に関わるメタボライト(代謝産物)も新たな役割が注目されている。興味深いのは、メチル化、アセチル化、ポリ ADP リボシル化などの化学反応の基質になる、S-アデノシルメチオニン (SAM)やアセチル CoA そしてニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) が、転写や DNA 修復が起こるクロマチン上で産生されることが示され、メタボライトが、単なる栄養源ではなく、エピジェネティック制御の担い手としてクロマチン制御に関わることが明らかになってきた。栄養飢餓状態は、老化の進行を抑制する方向に向かうという報告や、がん細胞のワールブルク効果のように、がん細胞が生き抜くために好んで利用する代謝経路の存在など、エネルギー代謝の変動は、細胞の多様な状態を反映していると思われる。放射線照射後の細胞応答あるいは感受性は、老化細胞と非老化細胞、がん細胞と正常細胞、あるいは臓器間において異なることは知られているが、分子レベルでの見解は、未だ不足している。エネルギー代謝の変動は、エピゲノムに変化を与え、その変化は、細胞内のストレス蛋白質ネットワークの多様性を規定しているのであれば、代謝変動の視点は、放射線障害応答における生体の多様性の理解に貢献できる可能性がある。

我々は、ヒストンアセチル化酵素 TIP60 による H2AX のアセチル化が、PARP-1 のポリ ADP リボシル化活性を高め、H2AX の交換反応を促進することを明らかにしている(Ikura, M *et al. Mol. Cell. Biol.*, 2016)。このメカニズムを知るために、H2AX 複合体を精製、解析し、細胞質にのみ存在すると考えられていた、*de novo* 経路の NAD 産生の律速酵素 NAD syn1 を H2AX の新規結合因子として同定した。この NAD syn1 は、H2AX のアセチル化を介して損傷部位に誘導され、NAD を産生する。この NAD を消費して PARP-1 が活性化して H2AX の交換反応が促進され、ゲノム損傷応答シグナルが活性化されることを明らかにした (Ikura, M *et al. Mol. Cell. Biol.*, 2022)。

細胞核内の *de novo* NAD 産生系の存在意義は如何なるものか？今回、我々は、細胞質の *de novo* NAD 産生系には影響を与えず、細胞核内のみ *de novo* NAD 産生系を阻害できるように核移行シグナル NLS を付与した酵素活性欠失型 NAD syn1 の遺伝子を細胞に発現させ、放射線照射後のエネルギー代謝への影響を検討した。その結果、この細胞では、ミトコンドリアにおける ATP 産生、細胞全体の NAD の絶対量と NAD/NADH が低下することを見出し、さらにメタボローム解析により、NAD syn1 の制御因子である TIP60 のアセチル化活性を阻害した細胞でも同様の結果

を得たことから、細胞核から細胞質に至る放射線障害応答に特化した NAD エネルギー代謝経路の存在が示唆された。

2. 研究の目的

細胞内で NAD が作られる経路は、現在、*de novo* 経路と *salvage* 経路の 2 つが知られている。この 2 つの NAD 経路は、細胞核、細胞質、そして細胞質でのミトコンドリアの膜に存在することが知られているが、NAD の合成に関わる酵素は、圧倒的に細胞質に存在していることが知られている。それでは何故、NAD 合成酵素 NADsyn1 が細胞核内に存在する必要があるのか？

本課題では、*de novo* NAD 産生経路の責任酵素である NAD syn1 に着目し、放射線による DNA 損傷応答における細胞核内 *de novo* NAD 産生経路を介した NAD エネルギー代謝経路活性化の役割とその意義について解明することを目的とする。

3. 研究の方法

我々は、デノボ NAD 合成酵素、NAD syn1 が、クロマチンから TIP60 による H2AX のアセチル化依存的に損傷部位のクロマチンに取り込まれるヒストン H2AX に結合し、それに伴って DNA 損傷部位に集積することをクロマチン免疫沈降法によって見出した。この結果は、*de novo* NAD syn1 が細胞核に存在することを示しているが、この酵素は、その多くは、細胞質に存在する。そこで、ゲノム損傷ストレス応答における細胞核内でのこの酵素の役割を明らかにするためにこの NAD syn1 遺伝子と NAD syn1 の酵素活性を阻害した変異体遺伝子のそれぞれに、核移行シグナルである NLS* を付与して細胞に発現させ、細胞核内でのみ NAD syn1 の酵素活性を阻害することにより細胞核内での NAD syn1 のゲノム損傷応答、エネルギー代謝およびがんシグナルの活性化における役割について検討する。

(1) NAD-syn1 酵素活性の測定

Myc-tagged NLS-NAD syn1-WT または G514E を HepG2 細胞で発現させ、c-Myc-tagged mild purification kit (MBL) を用いて精製した。精製した NLS-NAD syn1-WT および G514E 変異型の NAD 合成活性は、反応バッファー中 (2 mM ATP、5 mM MgCl₂、50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、56 mM KCl、0.2 mg/mL BSA) で測定した。基質には、1 mM NAAD (ニコチン酸アデニンジヌクレオチド) および 20 mM グルタミンを用いた。反応は 37°C で 180 分間で行い、ボイルすることで (3 min) 反応を終了させ、12,000rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収し、合成された NAD⁺ を測定した。NAD⁺ の定量には、NAD/NADH アッセイキット-WST (同仁堂) を使用した。WT と G514E 変異体の NAD⁺ 合成酵素活性は、各精製タンパク質の量あたりの NAD⁺ 合成酵素活性を算出し比較した。

(2) 細胞内のグルタミン酸およびグルタミン量を測定

HepG2 または HeLa 細胞に 2Gy を照射し、0 分、10 分、60 分、120 分培養した後、細胞を採取した。各時点で、 5×10^6 個の細胞を採取した。細胞はトリプシン処理で回収し、グルタミン酸アッセイキット-WST およびグルタミンアッセイキット-WST (同仁堂) を用いて細胞内のグルタミン酸およびグルタミン量を抽出し測定した。

(3) ASHRA (Assay for site-specific HR activity)

細胞内の相同組み換え活性は Crispr/Cas9 システムで ACTB 遺伝子座に二本鎖 DNA 切断を導入

し、切断部位への組み込み効率を定量 PCR で測定により算出する ASHRA 法を用いた(Yoshino Y et al., Sci. Reports, 2019)。まず、ACTB 遺伝子座の Cas9/gRNA 発現ベクター、ACTB 遺伝子座のドナーベクター (pBS-ACTB-GFP-DV) を細胞に共トランスフェクションさせ、48 時間後に、細胞を採取し、赤血球ゲノム DNA 抽出キット (SciTrove) を用いて、ゲノム DNA を採取した。回収したゲノム DNA を組み換えの可否の違いを見分けるプライマーセットを用い、Eco リアルタイム PCR システム (イルミナ社製) と KAPA SYBR Fast PCR キットを用いて、リアルタイム PCR により解析した。

(4) ミトコンドリアエネルギー代謝の検出

蛍光色素 JC-1 を用い、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence) でモニターし、ARVO-X 分光光度計 (Perkin Elmer) にて蛍光を定量した。細胞を JC-1 色素で染色すると、ミトコンドリアが膜電位を有する時には JC-1 色素は凝集し、590 nm/10 nm の発光フィルターで検出される。ミトコンドリアが機能を失い、膜電位が低下すると JC-1 は単量体となり、535nm の発光フィルターで検出される。NADsyn1G514E では凝集 JC-1 蛍光シグナルが観察されなかった。

(5) SA-β-Gal の in situ 染色

老化検出キット (Abcam, ab65351) を用い、SA-β-Gal 活性の定量は、細胞老化検出キット SPiDER-β-Gal (同仁堂, SG05) を使用した。SPiDER-β-Gal のシグナルは、ARVO-X 分光光度計を使用し、励起フィルター: 531nm と蛍光フィルター: 581nm とで検出し定量した。

(6) ソフトアガーコロニー形成アッセイ

Cytoselect 96-well cell transformation assay kit (CBA-130; Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA) を用いた。細胞を 0.4%アガロースを含む血清入りの DMEM 培地に懸濁し、96 ウェルプレートで 37°C、(5%CO₂) で 7 日間維持した。増殖した細胞数は、CyQuant GR 色素で染色し、ARVO-X 分光光度計を使用し、励起フィルター:485nm、蛍光フィルター: 520nm のフィルターで測定、定量した。コラーゲン培養には、AteloCell IPC-50 アテロコラーゲンをを用い、培養後、メタノール固定し、ギムザ染色を行った。

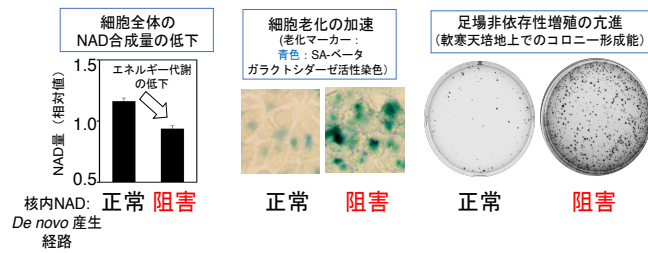
4. 研究成果

(1) 主な成果

我々は、*de novo* NAD 合成酵素、NAD syn1 が、クロマチンから TIP60 による H2AX のアセチル化依存的に損傷部位のクロマチンに取り込まれるヒストン H2AX に結合し、それに伴って DNA 損傷部位に集積することをクロマチン免疫沈降法によって示し、*de novo* NAD syn1 が細胞核に存在することをすでに明らかにしている。そこで、今回、ゲノム損傷ストレス応答における細胞核内でのこの酵素の役割を明らかにするためにこの NAD syn1 遺伝子と NAD syn1 の酵素活性を阻害した変異体遺伝子のそれぞれに、核移行シグナルである NLS を付与して細胞に発現させて、細胞核内でのみ NAD syn1 の酵素活性を阻害した。その結果、PARP-1 のポリ ADP リボシル化酵素活性の低下とクロマチンから放出された H2AX のアセチル化依存的な DNA 損傷部位への取り込み、および DNA 修復反応の低下が確認された。さらに興味深いことに、これらの細胞核内でのゲノム損傷ストレス応答への影響のみならず、細胞全体のエネルギー代謝の低下とそれに伴う細胞老化の加速と発がんのプロセスを示す足場非依存性のコロニー形成能の増大という予想外の結果が明らかになった。NLS を付与していないこれら遺伝子の発現細胞では、このよう

な表現型は全く見られなかった。従って、これらの結果は、放射線によるゲノム損傷ストレス下では NAD 産生の場合、細胞質でのサルベージ経路依存から細胞核内でのデノボ経路依存に変遷し、NAD が細胞核内で産生されるようになることがゲノム損傷ストレスによって誘発される細胞老化の異常加速とがん化の抑制に必要な新たなゲノム損傷応答であることを示唆している(図 参照)。

ゲノム損傷ストレス下において核内NAD *de novo*産生経路を阻害した際の細胞への影響



(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

今回、放射線によるゲノム損傷ストレスに対して H2AX^aのアセチル化が、細胞核内の *de novo* NAD 合成酵素を DNA 損傷領域に誘導することにより、NAD 産生が、細胞質での salvage 経路依存から細胞核内のデノボ経路依存に変遷することを見出し、この変遷を阻害すると細胞老化の異常加速のみならずがん化シグナル活性化の指標の一つである足場非依存性のコロニー形成能が増大することが明らかになった。一般的に NAD は、老化に伴い低下することが明らかにされている。またその一方で、老化に伴いがん発症が高まることも知られている。今回の結果は、H2AX のアセチル化を介した NAD 産生の経路と場の変遷、すなわち「空間的 NAD 代謝エピゲノム制御」が、新たなゲノムストレス応答となることを示し、その破綻が、細胞老化の過剰蓄積とがん化シグナルを亢進させることを示している。この成果は、将来、なぜ、老化するとがんの発症が高まるのかについての問題の解決のきっかけとなり、がんや細胞老化研究に大きな貢献をもたらすことが期待される。

(3) 今後の展望

今回の成果は、細胞がストレスに晒された時、NAD が、細胞核内で産生されることが重要であることを示している。例えば、放射線の生体影響を考えた時、普通ならがん化など到底起こらない微弱な放射線に対しても NAD が細胞核内で産生されなければ発がんのリスクが高まる可能性がある。本研究では、肝臓癌の細胞株 HepG2 を用いているが、今回の結果が、HepG2 細胞に特異的であるのか、あるいは普遍的なものであるのかは、他の細胞株においても検証する必要がある。またこの成果をマウス個体レベルで検証し、ヒト疾患との関わりについても検証し、発展させていく必要がある。

(4) 学術研究においては当初予想していないことが起こることがあるため、そういった事象が起きたことにより得られた新たな知見

今回の研究課題の中で、細胞核内で *de novo* NAD syn1 の酵素活性を阻害することにより、ゲノムストレス応答に不具合が生じることは想定内であったが、細胞老化が異常加速することは予想していなかった。この知見を得たことで TIP60 に着目することにより加齢に伴い細胞老化が亢進し、そのことががん発症の確率を高めてしまう仕組みを明らかにすることが可能である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Furuya Kanji, Ikura Masae, Ikura Tsuyoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 Machine learning extracts oncogenic specific H2AX foci formation pattern upon genotoxic stress	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 237 ~ 243
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13005	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 Ikura Masae, Furuya Kanji, Matsuda Tomonari, Ikura Tsuyoshi	4. 巻 42
2. 論文標題 Impact of Nuclear De Novo NAD Synthesis via Histone Dynamics on DNA Repair during Cellular Senescence To Prevent Tumorigenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular and Cellular Biology	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/mcb.00379-22	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 Ochiai Kyoko, Shima Hiroki, Ikura Tsuyoshi, Franke Marissa C., Sievert Evelyn P., Sciammas Roger, Igarashi Kazuhiko	4. 巻 2
2. 論文標題 Protocol for in vitro BCR-mediated plasma cell differentiation and purification of chromatin-associated proteins	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100633 ~ 100633
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100633	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 Sakai W, Yuasa-Sunagawa M, Kusakabe M, Kishimoto A, Matsui T, Kaneko Y, Akagi JI, Huyghe N, Ikura M, Ikura T, Hanaoka F, Yokoi M, Sugasawa K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Functional impacts of the ubiquitin-proteasome system on DNA damage recognition in global genome nucleotide excision repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-76898-2	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 該当する

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 古谷 寛治、井倉 正枝、井倉 毅
2. 発表標題 ゲノムストレス下におけるがん異常増殖の仕組みの分子理解への取り組み
3. 学会等名 日本放射線影響学会 第65回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井倉 毅、古谷 寛治、白木 琢磨、井倉 正枝
2. 発表標題 予測不可能なゲノム損傷に対応する多様なヒストン化学修飾の役割とその頑強性
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井倉 毅、古谷寛治、白木琢磨、井倉正枝
2. 発表標題 融合研究への挑戦：動的細胞老化を司るヒストンタンパク質の新知見
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井倉 毅、古谷寛治、白木琢磨、井倉正枝
2. 発表標題 多様なストレスに対峙するゲノムストレス応答タンパク質複合体の揺らぎ
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古谷 寛治、井倉 正枝、井倉 毅
2. 発表標題 オートファジーを介したリン酸化シグナル調節によるがん細胞のゲノムDNA損傷ストレス抵抗性獲得戦略
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 井倉 毅、古谷寛治、井倉正枝
2. 発表標題 NAD代謝変動から見たゲノムストレス応答ダイナミクス
3. 学会等名 第93回 日本生化学会大会シンポジウム(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 古谷寛治、井倉正枝、井倉 毅
2. 発表標題 オートファジー機構によるがん増殖におけるリン酸化シグナル経路の調節
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会(国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 井倉 毅
2. 発表標題 Histone sensing : a new insight for aging research
3. 学会等名 8th SYMPOSIUM Smart-Aging Research Center (S.A.R.C) TOHOKU UNIVERSITY (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<http://house.rbc.kyoto-u.ac.jp/mutagenesis2/>

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
---------	---------