

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 22 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380204

研究課題名（和文） ゲノム安定性を制御するエピジェネティック分子機構の同定と解析

研究課題名（英文） Identification and analysis of epigenetic mechanisms involved in the maintenance of genome stability

## 研究代表者

原田 昌彦（HARATA MASAHIKO）

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70218642

## 研究成果の概要（和文）：

真核生物のゲノムはヒストンに結合してクロマチンを形成し、さらに細胞核に収納されている。このようなクロマチン・細胞核の構造が、エピジェネティック制御の基盤となっている。ゲノムは安定に維持される必要があり、ここにもエピジェネティック制御が関与しているが、その詳細は知られていない。本研究では、IN080 クロマチンリモデリング複合体やヒストンアセチル化複合体が、ゲノム安定性維持において、進化的に保存された重要な機能を有することを示した。

## 研究成果の概要（英文）：

In eukaryotic cells, the genome forms chromatin together with histones, and chromatin is packed into the nucleus in a highly organized manner. These chromatin and nuclear organizations are fundamentals of epigenetic regulation. The maintenance of genome stability is a subject of epigenetic regulation; however, molecular mechanisms involved in the genome stability are largely unknown yet. In this project, we showed that IN080 chromatin remodeling complex and histone acetylation complexes play important and evolutionarily conserved roles in the maintenance of the genome stability.

## 交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2011 年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：分子細胞生物学

科研費の分科・細目：境界農学、応用分子細胞生物学

キーワード：クロマチン、ゲノム安定性、エピジェネティック、アクチン関連タンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物において、ヌクレオソームを基本単位とするクロマチンの構造変化が、遺伝子発

現のエピジェネティック制御の分子基盤となっている。クロマチン構造を変換する分子機構として、ATP 依存的クロマチンリモデリ

ング(ADCR)複合体によるヌクレオソームの破壊・移動・変形と、ヒストンアセチル化(HAT)複合体などによるヒストンの化学修飾がある。これらの複合体の特徴として、その多くがアクチン関連タンパク質(actin-related protein; 以下 Arp と略称)を複合体中に含んでいることが挙げられる。

Arp は、アクチンに進化的・構造的に関連性を有する一群のタンパク質であり、アクチンと共にアクチンファミリーを形成する。Arp のサブファミリーとして Arp1~Arp10 が存在するが、これらの Arp は、当初、細胞質で機能すると考えられていた。しかし我々は Arp4, 5, 6, 7, 8, 9 が細胞核に局在して機能していることを世界で初めて明らかにした (PNAS, 1994; Mol Biol Cell, 1995)。その後の解析で、これらの Arp が ADCR 複合体や HAT 複合体の構成因子として存在することも示し、転写や修復のゲノム機能におけるアクチンファミリーの重要性を明らかにした (Mol Biol Cell, 1999; Nucl Acids Res, 2002, 2004, 2007)。さらに、Arp5, Arp8 の ChIP-chip (クロマチン免疫沈降とマイクロアレイの組合せ) 解析などにより、これらを構成因子とする INO80 ADCR 複合体が停止した DNA 複製フォークの進行再開に必要であることを、世界に先駆けて Current Biology 誌の Article として報告した。DNA 複製における複製フォークの進行はヌクレオソームによって妨げられるため、これまでも複製フォークの進行に伴ってクロマチン構造を変換する機構の存在が予想されていたが、その詳細は不明であった。我々のこの発見は、DNA 複製におけるエピジェネティック制御の機構の一つを始めて明らかにしたものである。さらに、我々のこれまでの解析から、複製フォークの進行には INO80 複合体以外のクロマチン構造変換複合体が関与していることを示唆する結果も得られている。特に、INO80 複合体や DNA ポリメラーゼと遺伝的相互作用を示す NuA4 HAT 複合体を第一候補と考えている。

複製フォークの停止は、ゲノム不安定化の大きな要因となる。停止した複製フォークでは DNA 二重鎖切断 (DSB) が起こりやすく、この DSB が適切に修復されないと、染色体欠失・転座などを介して細胞ガン化を引き起こす。興味深いことに、我々は INO80 複合体が DSB 修復にも関与することを示している。FRA16D などの染色体脆弱部位とよばれる領域では複製フォークの停止による不安定化が起こると予想されており、実際にこの領域での染色体切断がガン細胞で高頻度に観察される。また、停止した複製フォークが巻き戻されるとトリプレットリピート配列がヘアピン構造を形成し、これによりリピートの伸長がおこる。このようなトリプレットリピートの伸

長は、トリプレットリピート病と総称される疾病の発症を引き起こす。例えば、CAG や CGG リピートの伸長は、それぞれハンチントン病や脆弱 X 症候群を発症させる。染色体切断を伴うガンやトリプレットリピートの伸長が特定の組織で観察されるなど、ゲノム不安定化が時期特異的・組織特異的に観察されることから、ゲノム安定性を制御するエピジェネティクス機構の存在が予想されていたが、これまでその実体は明らかにされていなかった。

## 2. 研究の目的

本申請研究では、出芽酵母およびヒト培養細胞を用いて以下を達成することを目的とした。

(1) INO80 複合体と協調して複製フォーク進行・ゲノム安定化維持に関与する複合体の同定を行う。特に、DNA 複製と INO80 複合体機能への遺伝学的関連性が見出された NuA4 HAT 複合体を第一の候補として解析する。

(2) INO80 や NuA4 複合体などによるクロマチンの構造変換が、ゲノムの安定性維持にどのように寄与しているかを解明する。特に、DNA 複製フォークの停止により染色体切断が起こると予想される FRA16D などのヒト染色体脆弱部位の配列や、疾病の原因となるトリプレットリピート配列に注目して解析を行なう。

(3) ヒト染色体脆弱部位配列やトリプレットリピート配列の近傍に INO80 複合体を人工的に結合させ、これによりゲノム安定性を改善する実験系を構築する。これはゲノム安定性維持におけるエピジェネティック制御を評価・応用する上での新規実験系になると共に、将来の人工的なエピジェネティック制御によるゲノム安定性向上へのモデル系となる。

## 3. 研究の方法

目的達成のため、それぞれ以下の実験を実施した。

(1) INO80 複合体と協調して複製フォーク進行に関与する複合体の同定：クロマチン免疫沈降法 (Chromatin immunoprecipitation; ChIP) とマイクロアレイチップ (chip) 法を組み合わせた ChIP-chip 解析により、停止させた複製フォークへの NuA4 HAT 複合体などの結合を解析する。さらに、遺伝学的解析や複製フォーク進行の解析などを行ない、複製フォーク進行における INO80 や NuA4 複合体の機能を明らかにする。

(2) ゲノム安定性維持における INO80 および NuA4 複合体の機能解析：ヒト由来の染色体脆弱部位の配列やトリプレットリピートを挿入した酵母人工染色体を用いて、ゲノム安定

性維持におけるこれらの複合体の機能を解析する。また、既に作成したヒト INO80 複合体ノックアウト細胞を用いた解析によっても、これらの複合体機能を明らかにする。

(3)クロマチン構造変換複合体による人工的なゲノム安定性向上：上記の酵母人工染色体を用いた実験系を利用し、ヒト染色体脆弱部位の配列やトリプレットリピートの近傍に INO80 や NuA4 複合体を人工的に結合させる。この人工的なクロマチン構造変換によるゲノム安定性の向上を検証する。

#### 4. 研究成果

我々は、研究分担者である太田と共に、出芽酵母を用いた ChIP-chip 解析によって、ヒドロキシウレア (HU) 存在下で停止させた複製フォークに INO80 複合体が結合することを示した。転写制御においては、クロマチンリモデリング複合体と HAT 複合体との機能協調が多く報告されているが、複製フォークの進行についても、我々の解析によって INO80 複合体と NuA4 HAT 複合体が協調的に機能している可能性が示されている。そこで、NuA4 HAT 複合体の構成因子である Arp4 変異株を用いることで、NuA4 HAT 複合体も、複製フォークの進行に関与する可能性を示した。

以上の結果に基づいて、さらにヒト染色体の安定性を出芽酵母で解析することを目指した。出芽酵母を用いた実験は、遺伝学解析や遺伝子操作が容易であるほか、細胞周期が短いため、短時間で高感度にゲノムの不安定化を検出することができる。ヒト染色体脆弱部位の配列やトリプレットリピートを含む酵母人工染色体 (Yeast Artificial Chromosome; YAC) を、出芽酵母の野生株あるいは INO80 複合体機能破壊株に導入し、YAC に導入した配列の不安定化を解析した。この YAC は、不安定化領域での切断によりマーカーが失われる構造となっており、この特徴を利用してこの人工染色体の不安定性を高感度に評価することが可能である。ガン細胞で高頻度に切断・転座が観察される FRA16D 領域を挿入した YAC などを用いた。さらに、デグロンタグシステムを利用して、INO80 複合体の機能に必須な構成因子である Ino80 や Arp8 を温度処理により特異的かつ急速に分解誘導する酵母株を作成し、解析に用いた。これにより、特定の細胞周期で INO80 複合体機能を破壊することも可能となった。このシステムと上記の YAC を組み合わせることにより、INO80 複合体の存在が、出芽酵母に導入したヒト染色体の安定性維持に関与することを示した。

これまで INO80 複合体の機能解析のほとんどは出芽酵母で行われており、ヒトなどの脊椎動物細胞における INO80 複合体の機能解析

はまだ例が少ない。この理由の一つとして、INO80 複合体の機能を欠損した細胞株が存在しなかったことが挙げられる。我々は、ヒト INO80 複合体の機能に必須な構成因子である Arp5 および Arp8 の発現をテトラサイクリン存在下でノックアウトできる細胞株をヒト Nalm6 細胞を用いて樹立した。このノックアウト細胞における複製フォークの進行を、DNA ポリメラーゼ阻害剤アフィディコリンへの感受性や BrdU のゲノムへの取り込みなどを指標に解析した。その結果、このノックアウト細胞株において、複製フォークの進行異常に基づくゲノム不安定化が起こっている可能性が示された。さらに、分裂期染色体の異常も観察された。

出芽酵母の実験系を用いて、INO80 を過剰発現することで、YAC への INO80 結合の促進を図ったところ、YAC の安定性の増加が観察された。

これらの結果は、クロマチンリモデリング複合体や HAT 複合体が、ゲノム安定性維持において、進化的に保存された普遍的な機能を有することを示唆している。この知見は、がん治療や再生医療において、ゲノム安定性は大きな課題であり、このような分野に広く応用が可能であると考えられる。

#### 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 14 件)

- ① Maruyama, E. O., Hori, T., Tanabe, H., Kitamura, H., Matsuda, R., Tone, S., Hozak, P., Habermann, F. A., von Hase, J., Cremer, C., Fukagawa, T., Harata, M. The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei. *J Cell Sci* 125, 3739-3743 (2012) 査読有り
- ② Matsuda, R., Hori, T., Kitamura, H., Takeuchi, K., Fukagawa, T., Harata, M. Identification and characterization of two isoforms of the vertebrate H2A.Z histone variant. *Nucleic Acids Res* 38, 4263-4673 (2010) 査読有り
- ③ Yoshida, T., Shimada, K., Oma, Y., Kalck, V., Akimura, K., Taddei, A., Iwahashi, H., Kugou, K., Ohta, K., Gasser, S. M., Harata, M. Actin-related protein Arp6 influences H2AZ-dependent and -independent gene expression and links ribosomal

protein genes to nuclear pores. PLoS Genet 6, e1000910 (2010) 査読有り

- ④ Oma, Y., Harata, M. Actin-related proteins localized in the nucleus: from discovery to novel roles in nuclear organization. Nucleus 2, 38-46 (2011) 査読有り
- ⑤ Kitayama, K., Kamo, M., Oma, Y., Matsuda, R., Uchida, T., Ikura, T., Tashiro, S., Ohyama, T., Winsor, B., Harata, M. The human actin-related protein hArap5: nucleocytoplasmic shuttling and involvement in DNA repair Exp Cell Res 315, 206-217 (2009) 査読有り

〔学会発表〕(計 79 件)

- ① Hiroshi Kitamura, Eri Ohfuchi, Chikashi Obuse, Hideyuki Tanabe, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, Pavel Hozak, Masahiko Harata “Interaction between the actin-related protein Arp6 and nuclear myosin I and their contribution to the nuclear organization” Wenner-Gren Foundations International Symposium “Actin and actin-associated proteins from gene to polysomes” September 7-10, 2011, Stockholm, Sweden (招待講演)
- ② 原田昌彦「クロマチン・細胞核の機能構造を介したエピゲノム制御と環境応答」日本農芸化学会 2011 年度大会シンポジウムエピゲノムから見た微生物・動物・植物の環境対応とその応用ポテンシャル、2011 年 3 月 28 日(京都) (招待講演)
- ③ Yoshida T, Shimada K, Oma Y, Kugou K, Ohta K, Kitamura H, Tanabe H, Gasser SM, Hozak P, Harata M. “Roles of actin-related proteins in nuclear organization and genome function” 52<sup>nd</sup> Symposium of the Society for Histochemistry, September 1, 2010, Prague, Czech Republic (招待講演)
- ④ 原田昌彦「胞核アーキテクチャーにおけるアクチン関連タンパク質の役割」32 回日本分子生物学会年会シンポジウム「細胞核アーキテクチャーに基づくゲノム機能制御: そのコンセプトの最新像、2009 年 12 月 9 日-12 日 (横浜) (招待講演)

- ⑤ 原田昌彦「脊椎動物のアクチン関連タンパク質による染色体・細胞核機能構造の形成」日本遺伝学会第 81 回大会ワークショップ「核ダイナミクス研究の新展開」、2009 年 9 月 17 日(松本) (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

- ① 原田昌彦、染色体と細胞核のダイナミクス。(平岡泰、原口徳子編) 第 7 章「核タンパク質と核骨格」、化学同人、印刷中(2013) (ページ未定)
- ② 豊水正昭、牧野周、原田昌彦、金山喜則、遠藤宣成、中嶋正道 (編集) 農学生命科学を学ぶための入門生物学、東北大学出版会(2011) p289-324

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

原田 昌彦 (HARATA MASAHIKO)  
東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 70218642

### (2) 研究分担者

太田 邦史 (OHTA KUNIHIRO)  
東京大学・総合文化研究科・教授  
研究者番号: 90211789