

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380183

研究課題名(和文) DNA修復におけるクロマチンと細胞核の機能：アクチンファミリーによる解析と展開

研究課題名(英文) Roles of chromatin and nuclear structure in DNA repair: approaches from actin family proteins

研究代表者

原田 昌彦 (Harata, Masahiko)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70218642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,100,000円

研究成果の概要(和文)：Arp4, Arp6を含むSWRクロマチンリモデリング複合体、およびArp4, Arp5, Arp8を含むINO80クロマチンリモデリング複合体のDNA損傷修復への関与の解析を行った。その結果、これらが損傷DNAの核内空間配置の決定を介して、DNA損傷修復に関与することが示された。また、これらの核内アクチンファミリーに結合するペプチドのスクリーニングを行い、高親和性結合を示すペプチドを得た。

研究成果の概要(英文)：We analyzed the contribution of the SWR chromatin remodeling complex, containing Arp4 and Arp6, and of the INO80 chromatin remodeling complex, containing Arp4, Arp5, and Arp8 to DNA damage repair. We showed that these nuclear actin-related proteins contribute to DNA damage repair through relocation of double strand break sites to nuclear periphery. We also performed screening of peptides which bind to these nuclear actin-related proteins, and got some candidates.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞核 アクチンファミリー クロマチン DNA修復

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷に伴うゲノム不安定化は、細胞のがん化の引き金となり、またがん化の促進にも関わる。DNA 損傷の中でも二重鎖 DNA 切断(double-strand break; DSB)は最も危険性が高く、染色体異常や遺伝情報の欠失などを引き起こす。しかし、DNA 損傷修復機構には不明な点が多く、そのため分子レベルでの解明が急がれている。このようなゲノム不安定に加えて、がんおよび他の悪性疾患の特徴として挙げられるのが、分化した細胞に特徴的な遺伝子発現パターンの変化である。DNA とヒストンを中心とした複合体であるクロマチンが遺伝子発現制御に関わることが知られているが、実際にこのような発現パターンの異常は、エピジェネティックと呼ばれるクロマチン構造の変化に起因することが報告されていた。このクロマチン構造の変化は、クロマチン構造を変換する複合体(クロマチンリモデラー)によって制御されている。実際に、クロマチンリモデラーの構成因子の多くが、がん遺伝子やがん抑制遺伝子産物として同定されていた。DSB 損傷修復においても、クロマチン構造変化が重要な役割を果たしている。まず、クロマチン構造変換が修復タンパク質のゲノムへの結合を可能とする。

さらに、転写、複製、修復などの様々なゲノム機能は、細胞核の様々な内部構造と結びついて起っていることが知られていた。たとえば、DNA 損傷修復においては、DSB、あるいは短小化した染色体末端テロメアが核周辺部の核膜近傍に移動することが観察され、その場で不適切な組み換え(転座)が抑制され、適切な修復が行われることが示されていた。

以上のように、クロマチンの構造や核内空間配置を制御する機構が DNA 修復には必要であるが、その解明は遅れていた。特に、クロマチンを核内で移動させる分子機構については、クロマチンの動きが細胞内の ATP 濃度によって影響されることから、何かしらの ATP 加水分解酵素がこの動きに関わると推測されていたが、分子機構は不明のままであった。

我々は、このクロマチン構造形成や核内移動性に関わるクロマチンリモデラーの特徴として、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に注目して解析を進めていた。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 (Arp1 ~ Arp10) は、当初、細胞質で機能すると考えられていた。しかし申請者は Arp4, 5, 6, 7, 8, 9 が細胞核に局在して機能していることを明らかにした (PNAS, 1994; Mol Biol Cell, 1995)。また、転写制御や DNA 修復におけるこれらの核内 Arp の重要性を明らかにした (Mol Biol Cell, 1999; Nucl Acids Res,

2002, 2004, 2007)。さらに、核内 Arp が DNA 損傷修復などを介してゲノム安定性維持にも重要な役割を果たすことを見出していた (Curr Biol, 2008; Nucl Acids Res, 2010)。また、研究分担者・太田と共同で、Arp が細胞核内でのクロマチン空間配置にも重要な役割を果たすことを見出していた (PLoS Genet, 2010; Nucleus, 2011)。

2. 研究の目的

クロマチン・細胞核機能構造形成におけるこのような Arp の重要な機能に注目し、Arp を主な研究対象とすることで、クロマチンおよび核構造が DNA 修復にどのように関与しているかを明らかにし、その応用への展開を図ることを目的とした。

(1)DNA 修復に必要なクロマチン・細胞核機能構造形成への Arp の役割を明らかにする。Arp が様々なクロマチンリモデラーの機能を制御していることが示されている。DNA 修復を効率的かつ安全に進行させるためには、特徴的なクロマチンや細胞核機能構造が形成されることが必要であり、このような DNA 修復のエピジェネティック制御に Arp がどのように関与するかを明らかにする。

(2)Arp に結合してエピジェネティック制御に影響を与える低分子化合物やペプチドを検索し、その解析によって創薬への応用展開を図る。アクチンに結合する化合物やその類似体の研究が広く行われている。Arp とアクチンの立体構造が類似していることから、これらの化合物には Arp に結合するものも含まれると予想される。Arp に結合することでクロマチンリモデラーの機能に影響を与える化合物やペプチドを同定し、がんや悪性疾患治療、再生医療における今後の創薬の基礎とする。

3. 研究の方法

(1)DNA 修復に必要なクロマチン・細胞核機能構造形成への Arp の関与

Arp4, Arp6 を含む SWR1 複合体と、Arp4, Arp5, Arp8 を含む INO80 複合体の解析を行う。両クロマチンリモデラーは共に進化的に保存されており、DNA 二重鎖切断(DSB)領域に結合することが示されている (Nucleus, 2011)。ヒトゲノムには染色体脆弱部位(chromosome fragile regions; CFRs)と呼ばれる欠失や転座の起こりやすい領域が存在している。CFRs はがん細胞で高頻度に切断を受けることから、がん研究における重要な解析対象となっている。CFR の一つである FRA16D 領域を含む酵母人工染色体(YAC)を Arp4, Arp5, Arp6 あるいは Arp8 を欠失させた酵母細胞に導入し、その切断頻度やクロマチン構造を解析する。FRA16D の不安定化がこのシステムで検出しにくい場合には、低濃度の DNA 複製阻害剤アフィディコリンで染

色体不安定化を増幅させて検出を行う。あるいは、FRA16D や他の CFR をタンデムに連結させたり、トリプレットリピート配列など挿入した YAC を解析に用いる。

ヒト培養細胞においても、申請者は Arp5, Arp6, Arp8 遺伝子の条件的ノックアウト (KO) 細胞株をすでに樹立している。これらの遺伝子 KO ヒト培養細胞を用いて、内在性の FRA16D や他の CFRs の安定性やクロマチン構造を解析する。

(2) Susan Gasser (FMI, Basel) との共同研究から、DSB 導入に伴ってそのゲノム領域が細胞核周辺部へ移動すること、そしてこの核内でのクロマチン再配置が DSB の修復に重要であることが示唆されていた。この核内クロマチン再配置においては、核膜孔タンパク質 (NPC) や、細胞核内膜タンパク質 Mps3 が DSB の結合領域となっている可能性がある。これまでに、クロマチン再配置のメカニズムや、再配置が修復にどのように影響するかについての詳細はほとんど明らかにされていないが、これまでにこのプロセスにクロマチンリモデラーが関与する可能性を示す結果を得ていた。この機構を明らかにするため、Arp 変異酵母株のゲノムに HO エンドヌクレアーゼ依存的な部位特異的 DSB を導入し、DSB の核内空間配置の時系列変化を蛍光顕微鏡により解析する。クロマチン上の DSB 領域は GFP-lacI-lacO システムを用いて顕微鏡下で可視化する。顕微鏡解析と並行して、DSB と NPC、および DSB と Mps3 との相互作用をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により観察することで、さらに DSB の空間的挙動について解析を行う。

(3) Arp がアクチンと共通した立体構造を有することを、申請者は以前の研究によって示しており、またこの結果は、最近の X 線構造解析によっても支持されている (Fen et al., EMBO J, 2011)。これまでにアクチンに結合する様々なタンパク質や化合物 (例えば、サイトカラシン、ラトランキュリン、ファロイジン、など) が知られていた。アクチンと Arp の構造の類似性などを考えると、これらのタンパク質に関連したペプチドや化合物が Arp に結合することが予想されるが、まだその解析は行われていない。DNA 修復や遺伝子発現に関与するクロマチンリモデラーの機能を制御するペプチドや化合物はこれまでに報告がなかった。このようなペプチドや化合物はエピジェネティック研究の重要なツールとなるばかりでなく、がんや疾病の治療薬の開発につながることを期待される。このようなペプチドのスクリーニングや解析を行う。

(4) 出芽酵母で DSB を誘導した際の、NPC や Mps3 への DSB の核内移動のタイミングを ChIP や定量蛍光顕微鏡解析により解析する。

また、核膜における潜在的な相互作用部位あるいは再配置に必要とされる因子に変異を入れた変異株を用いてそのタイミングの変化を解析する。また Arp 遺伝子欠損を誘導できるヒト培養細胞株を用いて、放射線あるいは DNA 損傷試薬により形成された DSB の核内空間配置の変化を gamma-H2AX 染色で比較すると共に、分裂期染色体核型解析によって、染色体切断や転座の効率を比較解析する。

4. 研究成果

(1) Arp4, Arp6 を含む SWR クロマチンリモデリング複合体と、Arp4, Arp5, Arp8 を含む INO80 クロマチンリモデリング複合体の、DNA 損傷修復への関与の解析を行った。ヒトゲノムに存在する染色体脆弱部位 (chromosome fragile regions; CFRs) と呼ばれる欠失や転座の起こりやすい領域を用いた解析を行った。CFRs の一つである FRA16D 領域を含む酵母人工染色体 (YAC) を酵母に導入した。野生株に加えて、Arp4, Arp5, Arp6 あるいは Arp8 を欠失させた酵母細胞に導入し、その切断頻度やクロマチン構造を比較解析した。その結果、これらのアクチン関連タンパク質が、ゲノム安定性維持に関与することが示された。

また、Arp8 の遺伝子を破壊したヒト培養細胞において、放射線あるいは DNA 損傷試薬による誘導された DSB の核内空間配置の変化を gamma-H2AX 染色によって比較したところ、DNA 損傷修復能が低下していることが示された。また、この Arp8 遺伝子破壊細胞を用いて分裂期染色体核型解析を行ったところ、染色体切断や転座の頻度が上昇していることが示された。さらに、Arp8 が一本鎖 DNA に高親和性結合をすることを明らかにし、この Arp8 の特性が損傷修復に重要な役割を果たすことを明らかにした。

(2) DNA 損傷に必要なクロマチン・細胞核機能構造形成へのアクチン・Arp の関与について解析を行った。その結果、INO80 や SWR などのクロマチンリモデリング複合体に含まれる Arp が、損傷 DNA の核内空間配置の決定に関与していることを明らかにした。また、出芽酵母で DSB を誘導した際の、核膜孔複合体や SUN ドメインタンパク質 Mps3 への DSB の核内移動のタイミングを、クロマチン免疫沈降 (ChIP) や、定量蛍光顕微鏡によって解析した。その結果、これらの核膜タンパク質への DSB への移行には、SWR クロマチンリモデリング複合体および INO80 クロマチンリモデリング複合体が関与していた。

(3) アクチンおよびアクチン関連タンパク質に結合するペプチドとして、二重環状構造を有する bicyclic peptide のファージライブラリーをスクリーニングすることにより、これらのアクチンファミリーに結合するペプチドを得た。これらが *in vitro* で、アクチン

ンおよびアクチン関連タンパク質に高親和性結合することを確認した。

(4)細胞核内に人為的にアクチン繊維を形成する実験系を用いて、細胞核内のクロマチン繊維が転写制御に与える影響について解析を行った。マイクロアレイ転写解析の結果、細胞核内のアクチン繊維が、転写制御において、重要な役割を果たすことが示された。

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 26 件)

Takemata, N., Oda, A., Yamada, T., Galipon, J., Miyoshi, T., Suzuki, Y., Sugano, S., Hoffman, C.S., Hirota, K. and Ohta, K. Local potentiation of stress-responsive genes by upstream noncoding transcription. **Nucleic Acids Res.** in press (2016) (査読有り)

Yamazaki, S., Yamamoto, K., de Lanerolle, P. and Harata, M. Nuclear F-actin enhances the transcriptional activity of β -catenin by increasing its nuclear localization and binding to chromatin. **Histochem. Cell Biol.** 145(4):389-399 (2016) (査読有り)
doi: 10.1007/s00418-016-1416-1419

Tashiro, S., Handa, T., Natsuda, A., Ban, T., Takigawa, T., Miyasato, K., Ishii, K., Kugou, K., Ohta, K., Hiraoka, U., Masukata, H. and Kanoh, J. Shugoshin forms and specialized chromatin domain at subtelomeres that regulates transcription and replication timing. **Nature Commun.**, 7, 10393 (2016) (査読有り)
doi: 10.1038/ncomms10393

Kitamura, H., Matsumori, H., Kalendova, A., Hozak, P., Goldberg, I.G., Nakao, M., Saitoh, N. and Harata, M. The actin family protein ARP6 contributes to the structure and the function of the nucleolus. **Biochem Biophys Res Commun.** 464, 554-560 (2015) (査読有り)
doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.005

Horigome, C., Oma, Y., Konishi, T., Schmid, R., Marcomini, I., Hauer, M.H., Dion, V., Harata, M. and Gasser, S.M. SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice. **Mol. Cell** 55, 626-639 (2014) (査読有り)
doi: 10.1016/j.molcel.2014.06.027

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. and 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)
doi: 10.1242/jcs.103903

[学会発表](計 78 件)

原田昌彦「アクチンファミリーによるクロマチン構造の階層的変換」、第 38 回日本分子生物学会年会 第 88 回日本生化学会 合同大会、2015 年 12 月 4 日(神戸)(招待講演)

原田昌彦「ヒストンバリエーションと核構造によるクロマチン機能構造制御」、遺伝研研究会「クロマチン・細胞核構造の形成とダイナミクスによるゲノム機能制御」、2015 年 10 月 29 日(三島)(招待講演)

Masahiko Harata "Contribution of nuclear actin filaments in transcriptional regulation." Institute for Protein research (IRP) Seminar "Nuclear organization and actin-dependent mechanisms in genome stability", May 19, 2015, Osaka (招待講演)

Masahiko Harata "Nuclear actin and ARPs involved in the functional organization of chromatin." The 2014 ASCB/IFCB Meeting, December 6, 2014, Philadelphia, USA (招待講演)

原田昌彦「細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能」アクチンファミリーによる細胞核・クロマチンの機能構造形成、第 86 回日本生化学会大会シンポジウム、2013 年 9 月 11 日(横浜)(招待講演)

Masahiko Harata "Actin family proteins involved in the functional organization of the nucleus." 23th Wilhelm Bernhard Workshop in the cell nucleus, August 19-56, 2013, Debrecen, Hungary (招待講演)

[図書](計 3 件)

小川(西秋)葉子、太田邦史、生命デザイン学入門、岩波ジュニア新書、(2016) p1-32

原田昌彦、ベーシックマスター分子生物学(改訂版)(東中川徹、大山隆、清水光弘編)第 8 章「翻訳の調節」、オーム社、(2013) p216-241

原田昌彦、染色体と細胞核のダイナミクス-DNA を操る細胞の仕組み-(原口徳子・平岡

泰編) 第 11 章「核タンパク質と核骨格」、
化学同人、(2013) p169-183

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称:空間的な近さの概念を用いた生体分子
データの 3 次元構造の再構成方法

発明者:平田祥人、小田有沙、太田邦史、合
原一幸

権利者:同上

種類:特許

番号:特願 2016-023214

出願年月日:2016 年 2 月 10 日

国内外の別:国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.harata-lab.org>

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・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号:90211789

(3)連携研究者

田代 聡(TASHIRO SATOSHI)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号:20243610

清田洋正(KIYOTA HIROMASA)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号:30234397