

令和元年6月11日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2018

課題番号：25850242

研究課題名(和文)クロマチン構造変換複合体によるDNA損傷部位の核内配置制御とゲノム安定化への寄与

研究課題名(英文)Contribution of chromatin remodeling complexes to the spatial positioning of DNA damage region and to the genome integrity

研究代表者

尾間 由佳子(Oma, Yukako)

東北大学・農学研究科・JSPS特別研究員(RPD)

研究者番号：20443997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：DNA二本鎖切断(DSB)は最も重篤なDNA損傷である。DSB領域には損傷誘導的な姉妹染色分体間接着(コヒージョン)が形成され、効率的な相同組み換え修復に寄与する。損傷誘導的コヒージョンにはコヒーシンのSUMO化が関与するが、クロマチン構造変換複合体の機能欠損によるDSBのNPC移行欠損によって、その低下が認められた。さらに、SUMO化酵素のDSB近傍への人為的結合によりコヒージョン形成率が上昇したが、非SUMO化コヒーシンの過剰発現により喪失した。以上から、DSBのNPCへの係留がコヒーシンのSUMO化修飾を促進し、損傷誘導的コヒージョンと正確な組み換え修復を進行させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、DNA修復の実験材料として最も広く用いられている出芽酵母を用いて解析を行ったが、出芽酵母とヒトのクロマチン構造変換複合体の機能は保存されている。そのため、本研究でのDNA損傷領域の核内配置におけるクロマチン構造変換複合体の関与の解析は、核膜タンパク質の変異によって生じる早老症などの核膜病の原因や治療などの分野にも大きく貢献できる

研究成果の概要(英文)：DNA double-strand breaks (DSBs) are the most serious type of DNA damage. It has been shown that DNA damage-induced sister chromatid cohesion facilitates homologous recombination repair (HR) at DSB proximal regions. We found that the damage induced-cohesion was impaired in yeast mutants defected in nuclear pore complex (NPC) or in the DSB relocation to NPC. We also observed that damage-induced cohesion is impaired in yeast cells in which the association of SUMO ligase with NPC is abolished. We also showed the possible involvement of cohesin in this machinery. These results, we propose a model that the DSB relocation to NPC promotes the cohesin SUMOylation by SUMO ligase associated with NPC. This machinery is supposed to contribute to the maintenance of genome stability through facilitating HR of DSBs.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：クロマチン構造変換複合体 DNA損傷修復 姉妹染色分体間接着

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

遺伝子の転写に加え、DNA 修復・転写などのゲノム機能のエピジェネティックな制御にはクロマチン構造が重要な役割を果たしている。DNA 損傷修復の不適切な進行に基づくゲノム不安定化はがんなどの疾病の原因となるほか、育種・生殖工学での障害となる。したがって、DNA 修復のエピジェネティック制御を解明しそれを応用に結びつけることは、医学・農学などの分野において強いニーズがある。ATP 依存的クロマチン構造変換複合体は、クロマチン構造の変換を介したエピジェネティック制御に中心的な役割を果たしている。研究代表者は、酵母からヒトまで進化的に保存された SWR1 および INO80 クロマチン構造変換複合体に関して、これらの複合体の必須サブユニットであるアクチン関連タンパク質(Actin-related protein; Arp)に注目して、解析を行っている(Curr. Biol., 2008; PLoS Genet., 2010)。Arp は、アクチンに進化的・構造的に関連性を有するタンパク質で、アクチンと共にアクチンファミリーを形成する。研究代表者らは Arp がヒストン結合能を有することや、複合体の形成・解離に関与することなどを見出し、これらの複合体機能における Arp の重要性を明らかにしてきた(Mol. Biol. Cell, 1999; Yeast, 2005)。エピジェネティック制御は、クロマチンの局所的な構造のみならず、クロマチンの核内空間配置によっても制御されている。例えば、出芽酵母では DNA 二本鎖切断(DNA double-strand break; DSB)の切断領域が核膜近傍へ移行して、不必要な DNA の再編成を抑制している(Nagai et al., Science, 2008)。しかしこれまでに、クロマチンの核内配置のメカニズムの詳細については不明であった。我々は上で述べた Arp の研究の過程で、出芽酵母 SWR1 クロマチン構造変換複合体中の Arp6 が、リボソームタンパク質遺伝子の核膜孔複合体(nuclear pore complex; NPC)への移行に必要であることを明らかにした(PLoS Genet., 2010)が、これは、クロマチン構造変換複合体がクロマチン核内配置に関与する例として初めての報告である。出芽酵母においては、DSB 領域は NPC のみならず核膜タンパク質 Mps3 とも相互作用することが報告されている。しかし、NPC と Mps3 の機能の違いや、DSB 領域との結合に関わるクロマチン構造変換複合体は同定されていない。DSB が生じた際、SWR1 複合体と共に INO80 複合体が DSB 領域に結合し、DNA 修復に協調的に機能することが報告されている。また、INO80 複合体と SWR1 複合体は Arp4 を共通のサブユニットとして含み、研究代表者らの解析でもヒト INO80 複合体がヒトゲノムの安定性維持に関与することを見出している(PLoS ONE, 2010)。これらの結果から、INO80 複合体が SWR1 複合体と協調して DSB の核内空間配置を制御し、ゲノム修復のエピジェネティック制御に関与することが示唆される。

### 2. 研究の目的

SWR1 および INO80 構造変換複合体の変異株を用いて、DSB 領域の核膜近傍への移行の機構を明らかにすることを目的とした。第一として修復困難な DSB 領域が核内部から核膜近傍へ移行し、不必要な DNA 組換えの抑制などに関わる際に、SWR1 複合体と INO80 複合体が、DSB の NPC や Mps3 への移行および係留に関与するかをクロマチン免疫沈降法(chromatin immunoprecipitation; ChIP 法)により解析した。また、DSB 領域について、損傷誘導的に姉妹染色分体間接着(損傷依存的コヒージョン)を起こし、このことがゲノム安定性の維持に寄与することが知られている。そこで第二に、クロマチン構造変換複合体による DSB 領域の核膜近傍への移行および係留が損傷誘導的コヒージョンへ関与するか GFP の蛍光スポットの数を指標に検証した。

### 3. 研究の方法

第一に、DSB 領域の核膜近傍への移行に SWR1 および INO80 複合体が関与するか ChIP 法により解析した。実験系として、ガラクトース存在下で HO エンドヌクレアーゼを発現させることで特定の一か所だけに DSB を誘導的に起こすことのできる株を用いた。この株について SWR1 および INO80 複合体の変異株を作成し、これらの株について核膜近傍タンパク質である NPC や Mps3 に対する抗体を用いて ChIP を行った。次に、GFP スポット数を指標にコヒージョンを解析する系を用いて、DSB 領域の核膜近傍への移行・係留の阻害による損傷誘導的コヒージョンへの影響を解析した。この系ではそれぞれの姉妹染色分体上の DSB 領域近傍に結合した GFP のスポットが、コヒージョン不全の場合には別々の 2 つのスポットとして、コヒージョン形成の場合は 2 点が重なった 1 点のスポットとして観察される。野生株および DSB 領域の NPC 非移行株について損傷誘導前後での GFP スポット数の減少を計測し、損傷誘導的コヒージョンが形成された細胞の割合を算出した。さらに、損傷誘導的コヒージョンに必要なコヒーシタンパク質の SUMO 化修飾に DSB の NPC への結合が影響するか解析した。解析には DSB が NPC へ移行できない SWR1 複合

体の機能欠損株を用い、DSB 誘導後のコヒーシンの SUMO 化をウエスタンブロットにより解析した。

#### 4. 研究成果

遺伝子の発現のみならず、DNA 修復の進行にもエピジェネティクス制御は必須であり、その破綻によるゲノム不安定化はがんなどを引き起こす。クロマチン構造に加え、クロマチンの核内空間配置がエピジェネティック制御の分子基盤であり、DNA 二重鎖切断 (DSB) 部位の核膜近傍への移行が、出芽酵母で観察されている。出芽酵母においては、DSB 領域は NPC のみならず核膜タンパク質 Mps3 とも相互作用することが報告されている。これまでに SWR1 および INO80 複合体が DSB 領域に結合し、DNA 修復に協調的に機能することが報告されていることから、両複合体が協調して DSB の核内空間配置を制御し、ゲノム修復のエピジェネティック制御に関与することが示唆された。そこで、DSB 領域の核膜近傍への移行の機構を明らかにするために、ガラクトース添加により誘導的かつ継続的に DSB を起こすことのできる酵母株で作成された SWR1 および INO80 構造変換複合体の変異株を用い、両複合体が DSB の NPC や Mps3 への移行に関与するかをクロマチン免疫沈降法により解析した。その結果、DSB 領域と NPC や Mps3 との結合には SWR1 および INO80 複合体が必要であった。以上の結果から、修復の困難な DSB の正確な修復プロセス進行のために DSB 領域の核膜近傍への移行が必要であり、これには SWR1 および INO80 複合体が関与していることが明らかとなった。

次にクロマチン構造変換複合体による DSB 領域の核膜近傍への移行の意義を解明するため、損傷誘導的な姉妹染色分体間接着 (コヒージョン) に着目した。DSB 領域近傍には損傷誘導的にコヒージョンが形成され、効率的な相同組み換え修復に寄与する。2 つの DSB 領域の核膜近傍への移行経路のうち、SWR1 複合体による DSB 領域の NPC への移行が損傷誘導的コヒージョン形成に重要であることを明らかにした。損傷誘導的コヒージョンにはコヒーシンの SUMO 化が関与するが、クロマチン構造変換複合体の機能欠損による DSB の NPC 移行欠損によって、その低下が認められた。さらに、SUMO 化酵素の DSB 近傍への人為的結合によりコヒージョン形成率が上昇したが、非 SUMO 化コヒーシンの過剰発現により喪失した。以上から、SWR1 クロマチン構造変換複合体による DSB 領域の NPC への係留がコヒーシンの SUMO 化修飾を促進し、損傷誘導的コヒージョンと正確な組み換え修復を進行させることが示唆された。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) Sun Jiying, Shi Lin, Kinomura Aiko, Fukuto Atsuhiko, Horikoshi Yasunori, Oma Yukako, Harata Masahiko, Ikura Masae, Ikura Tsuyoshi, Kanaar Roland, Tashiro Satoshi  
Distinct roles of ATM and ATR in the regulation of ARP8 phosphorylation to prevent chromosome translocations.  
eLIFE, 査読有, 7 巻, 2018, e32222  
<https://doi.org/10.7554/eLife.32222>
- (2) Takahashi Daisuke, Orihara Yuki, Kitagawa Saho, Kusakabe Masayuki, Shintani Takahiro, Oma Yukako, Harata Masahiko  
Quantitative regulation of histone variant H2A.Z during cell cycle by ubiquitin proteasome system and SUMO-targeted ubiquitin ligases.  
Biosci Biotechnol Biochem. 査読有, 81 巻, 2017, 1557-1560  
DOI:10.1080/09168451.2017.1326087
- (3) Takahashi Yuichiro, Murakami Hirokazu, Akiyama Yusuke, Katoh Yasutake, Oma Yukako, Nishijima Hitoshi, Shibahara Kei-ichi, Igarashi Kazuhiko, Harata Masahiko  
Actin Family Proteins in the Human INO80 Chromatin Remodeling Complex Exhibit Functional Roles in the Induction of Heme Oxygenase-1 with Hemin  
Frontiers in Genetics, 査読有, 8 巻, 2017, Article 17  
DOI:10.3389/fgene.2017.00017
- (4) 原田昌彦, 山崎祥他, 尾間由佳子  
アクチンファミリー分子によるクロマチン・細胞核機能制御  
生化学会誌, 査読無, 87 巻, 2015, 629-632  
DOI:10.14952/SEIKAGAKU.2015.870629
- (5) 山崎祥他, 尾間由佳子, 原田昌彦

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 (特集号 細胞核内反応の分子科学)

ナノ学会会報 “The bulletin of the Society of Nano Science and Technology”、査読無、13、2015、73-77

- (6) Osakabe, A., Takahashi, Y., Murakami, H., Otawa, K., Tachiwana, H., Oma, Y., Hitoshi Nishijima, H., Shibahara, K., Kurumizaka, H., Harata, M.  
DNA binding properties of the actin-related protein Arp8 and its role in DNA repair.  
PLOS One、査読有、9、2014  
DOI:10.1371/journal.pone.0108354
- (7) 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、査読有、5巻、2014、626-639  
DOI:10.1016/j.molcel.2014.06.027

[学会発表](計 25 件)

- (1) Yukako Oma, Yuki Orihara, Daisuke Takahashi, Tatsunori Konishi, Masahiko Harata,  
DNA double-strand break relocation to nuclear pore complex contributes to DNA damage-induced sister chromatid cohesion.  
The 11th 3R & 3C Symposium、2018 年
- (2) 尾間由佳子, 折原行希, 高橋大輔, 小西辰紀, 原田昌彦  
DNA 損傷修復における細胞核構造の役割: 出芽酵母をモデル系とした解析  
日本農芸化学会 東北・北海道合同支部大会 (東北支部第 153 回大会) 口頭発表、2018 年
- (3) 尾間由佳子, 折原行希, 高橋大輔, 小西辰紀, 原田昌彦  
DNA 損傷誘導的コヒージョンにおけるコヒーシン SUMO 化と核膜孔複合体の関与  
酵母遺伝学フォーラム第 51 回研究報告会、ポスター発表、2018 年
- (4) Yukako Oma, Yuki Orihara, Daisuke Takahashi, Tatsunori Konishi, Masahiko Harata,  
Contribution of nuclear pore complex to DNA damage-induced sister chromatid cohesion through promoting SUMOylation of cohesion.  
第 70 回日本細胞生物学会第 51 回日本発生生物学会合同大会/The Joint Annual Meeting of 51st JSDB and 70th JSCB、2018 年
- (5) 尾間由佳子, 折原行希、小西辰則、堀籠智洋、Susan Gasser、原田昌彦  
DNA 損傷誘導的な姉妹染色分体接着における核膜孔複合体の関与  
酵母遺伝学フォーラム第 50 回研究報告会、2017 年
- (6) 折原行希, 尾間由佳子, 小西辰則, 原田昌彦  
DNA 損傷依存的な姉妹染色分体間接着確立における核膜孔複合体の関与  
第 69 回日本細胞生物学会大会、2017 年
- (7) Oma, Y., Takahashi, Y., Murakami, H., Horigome, C., Gasser, S.M., Osakabe, A., Kurumizaka, H., Harata, M.  
Roles of actin family proteins in the functional organization of chromatin and the nucleus  
Understanding the genome III - G60 Symposium、2015 年
- (8) 尾間由佳子, 折原行希、堀籠智洋、小西辰紀、Susan Gasser、原田昌彦  
DNA 二本鎖切断領域の核膜近傍への係留と損傷誘導的な姉妹染色分体接着に関する解析  
日本遺伝学会第 87 回大会、2015 年
- (9) Oma, Y., Takahashi, Y., Murakami, H., Horigome, C., Gasser, S., Osakabe, A., Kurumizaka, H. and Harata, H  
Roles of actin family proteins in chromatin and nuclear organization for DNA repair  
The 9th 3R (replication, recombination and repair) symposium、2014 年
- (10) 尾間由佳子, 小西辰則、堀籠智洋、折原行希、Susan Gasser、原田昌彦  
DNA 二本鎖切断部位の核内配置におけるクロマチン構造変換複合体の役割

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。