

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430114

研究課題名(和文) クロマチン変換因子INO80による染色体転座形成の制御

研究課題名(英文) involvement of INO80 chromatin remodeling factor in 11q23 chromosome translocations

研究代表者

孫 継英 (Sun, Jiying)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：80397926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：染色体転座は放射線や化学物質などによるDNA二本鎖切断の誘導とその修復エラーにより形成されると考えられているが、その詳細は未だ不明である。我々は、抗がん剤エトポシドによる11q23転座形成をモデルシステムとして、染色体転座形成の分子機構の解明に取り込んだ。本研究では、クロマチン構造変換因子INO80がRAD51の11q23転座切断点集中領域(BCR)への過剰な集積を促進すること、及びDNA損傷修復に関与するリン酸化酵素ATMがINO80複合体の構成因子をリン酸化することによりINO80及びRAD51の11q23 BCRへの過剰な集積を抑制し、転座形成を阻止することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Chromosome translocations induced by ionizing radiation and chemotherapeutic agents, has been shown to lead to malignant transformation. However, the mechanism of chromosome translocations is still unclear. Chromosome translocations involving the MLL gene on 11q23 are the most frequent chromosome abnormalities in secondary leukemias associated with chemotherapy employing etoposide. Dysfunction of ATM, a DNA damage signaling regulator, increases the incidence of 11q23 chromosome translocations. We showed that ATM deficiency results in the excessive binding of the DNA recombinase RAD51 at the translocation breakpoint cluster region (BCR) of MLL gene after etoposide exposure. In this study, we showed that a phosphorylated subunit of INO80 complex by ATM, plays an important role in the appropriate regulation of INO80 and RAD51 binding to the BCR of MLL gene and prevention of 11q23 chromosome translocations after etoposide treatment.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：染色体転座形成 DNA repair

## 1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA は、放射線などさまざまな外因による損傷を受けているが、通常は損傷の種類に応じた DNA 修復機構により適切に修復され染色体の安定性が維持される。放射線や一部の抗がん剤は染色体 DNA の二本鎖切断(DNA double strand breaks: DSBs)を誘導することが知られている。ヒト細胞での DSBs 修復機構には、主に損傷部位と相同的配列を持つ染色体 DNA を鋳型として用いて DSBs を正確に修復する相同組換え修復機構 (homologous recombinational repair: HR) と、断端を直接融合して修復する非相同末端結合 (non-homologous end joining: NHEJ) が存在することが知られている。一般に、染色体転座形成には、遺伝子塩基配列を確認しないため修復エラーが多い NHEJ 経路が関与しているとされている。一方、HR 経路で最も重要な DNA 組換え酵素 RAD51 の過剰発現が一部のがん細胞で認められており、さらに染色体不安定性を増悪させる可能性も示唆されている。しかし、HR 経路がどのように染色体転座の形成に関与するのかについては、未だ不明な点が多い。

抗がん剤エトポシドなどを用いた化学療法後に発症する治療関連性白血病では、11q23 に切断点を持つ染色体転座が最も多く認められる。我々は、エトポシドによる 11q23 転座形成をモデルシステムとして、染色体転座形成の分子機構の解明に取り込んできた。DNA 損傷シグナル伝達調節因子 ATM 変異の患者は白血病を含む悪性腫瘍の発症が高頻度であることが認められる。我々は、ATM の欠失細胞を用いた解析で、エトポシドによる 11q23 転座形成の増加と 11q23 転座点集中領域 (BCR) への RAD51、INO80 クロマチン変換因子など HR 経路に関連する因子の過剰な結合を見出した。これらの知見は、ATM が HR 関連因子の BCR への結合を制御することにより転座形成を抑制している可能性を示唆している。

## 2. 研究の目的

INO80 複合体は ATP 依存的にクロマチン構造の再構成を行うたんぱく質複合体であり、クロマチン構造を不安定化させることによって転写因子の結合を促進することや、DNA 損傷場所に修復因子の集積に関連すると言わ

れている。一方、DNA 損傷シグナル伝達調節因子 ATM は様々なたんぱく質分子をリン酸化することで、細胞周期の停止や、DSBs 修復の生化学反応を活性化させる。このため、我々は、ATM による INO80 のリン酸化がエトポシド処理後の RAD51 の BCR への過剰な結合を抑制し、11q23 転座形成の阻止に重要な働きをしているのではないかと仮説を立てて染色体転座形成の分子機構の解明に取り組んだ。(図 1)

Mechanism of 11q23 chromosome translocation

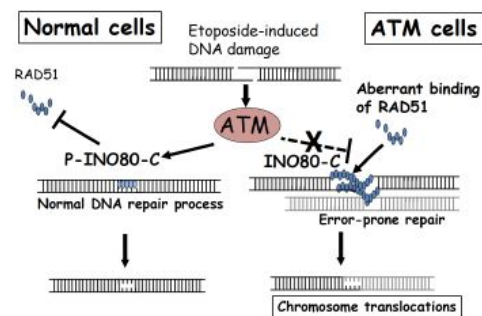


図1 染色体転座形成のモデル

ATMは、INO80複合体のリン酸化を介してエトポシド処理後のBCR領域へのINO80及びRAD51の結合を適当に制御して転座形成を阻止する。

## 3. 研究の方法

(1) RAD51 が DNA 損傷後 foci 形成することが知られている。短鎖 RNA 干渉による INO80 発現抑制の RAD51 foci 形成への影響について免疫細胞染色法を用いて検討する。

(2) 相同組み換え修復の制御における INO80 の役割を検討する。相同組換え活性測定法 DR-GFP reporter システムを用いて相同組み換え修復により GFP 発光する細胞の割合を FACS (fluorescence activated cell sorting) で INO80 発現抑制による HR 活性への影響を定量的に解析する。同様に、姉妹染色分体交換 (SCE) 頻度の定量的解析を行う。

(3) 生化学的解析及び細胞生物学的解析法を用いて、エトポシド処理前後の細胞について RAD51 と INO80 の相互作用を解析する。

(4) INO80 発現抑制細胞について、クロマチン免疫沈降法を用いて INO80 による RAD51 の BCR に集積の調節についての役割を検討する。

(5) 11q23 染色体転座を検出するプローブを用

いた FISH 法により、INO80 の発現抑制による 11q23 染色体転座形成の影響について検討する。

(6)ATM による INO80 及び INO80 複合体の構成因子のリン酸化について検討する。放射線照射もしくはエトポシド処理によるリン酸化されたタンパク質について、イムノプロット法や最近開発されたリン酸化たんぱく質を検出する Phos-tag 技術などを用いた検討を行う。

#### 4. 研究成果

(1)INO80 が RAD51 foci 形成に関連するかどうかについて、放射線照射した細胞を免疫蛍光抗体法を用いて検討した。その結果、INO80 発現抑制により RAD51 foci の形成が低下することが明らかになった。(図 2)

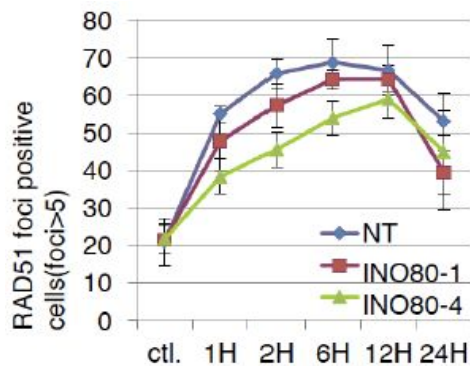


図2 INO80がDNA損傷後によるRAD51 foci形成を促進する。

(2)HR 活性への INO80 の関与を検討するため、INO80 発現抑制により、DR-GFP reporter 細胞を用いた実験では HR 活性の低下が示された。また、姉妹染色分体交換(SCE)頻度の低下も観察された。これらの実験結果から、INO80 は、HR を促進することが確認された。(図 3)

(3)酵母では、INO80 が HR の早期段階の end resection 及び RAD51 と replication protein A の交換を促進することが報告されている。しかし、哺乳類細胞では後者の作用について不明である。本研究は、共免疫沈降法を用いて、INO80 と RAD51 との相互作用を見出した。また、INO80 と RAD51 の相互作用に必要なドメインについて、INO80 変異体を用いた実験で同定した。INO80 と RAD51 との相互作用に

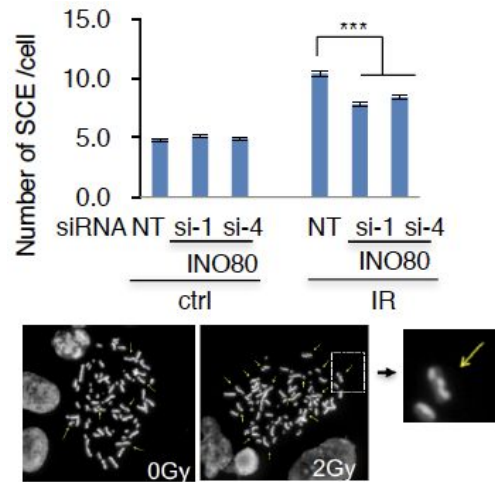


図3 INO80がSCEを促進する。

ついては哺乳類細胞で初めて確認することができ、INO80 より RAD51 の損傷場所への集積に関与する可能性が示唆された。

(4)エトポシド処理による BCR 領域への RAD51 集積を、INO80 が促進することを INO80 発現抑制細胞のクロマチン免疫沈降法で確認した。また、DR-GFP reporter システムを用いた実験においても、RAD51 のゲノム損傷部位への集積が INO80 の発現抑制により減少することがわかった。これらの結果から、INO80 が RAD51 の DNA 損傷場所への集積を促進することが示された。(図 4)

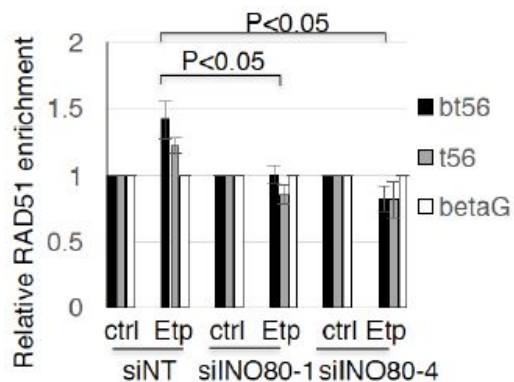


図4 INO80がエトポシド処理後の11q23 BCRのRAD51の集積を促進する。

(5)エトポシド処理による 11q23 染色体転座形成における INO80 の関与を検討した。FISH 法を用いて 11q23 染色体転座の頻度を調べたところ、ATM 欠失細胞ではエトポシドによる 11q23 染色体転座頻度の上昇が INO80 の発現抑制により抑制されることが観察された。一方、ATM 正常細胞では、INO80 の発現抑制により転座頻度が明らかに高くなった。これらの結果から、ゲノム損傷部位への INO80 による RAD51 の過剰な集積により 11q23 染色体

転座を引き起こされる可能性が示された。

(6) 抗 INO80 抗体で免疫沈降された産物をイムノプロット法や Phos-tag 技術で得られた実験結果から INO80 が直接的な ATM のリン酸化標的ではないことが示唆された。

(7) INO80 は ATM によりリン酸化されないため、INO80 複合体において ATM によるリン酸化ターゲット配列を有する構成因子について検討した。その結果、構成因子のひとつで、ゲノム損傷依存的に ATM によりリン酸化されるタンパク質が確認された。さらに、この構成因子のリン酸化部位に変異を導入して作成したリン酸化模倣変異体を用いた解析では、ATM 欠失細胞での INO80 及び RAD51 の BCR の過剰の集積及び 11q23 染色体転座形成が抑制された。現在、その詳細な分子機構について解析を進めている。

#### 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 8 件)

1. Enhanced gefitinib-induced repression of the epidermal growth factor receptor pathway by ataxia telangiectasia-mutated kinase inhibition in non-small-cell lung cancer cells. Misumi K, Sun J, Kinomura A, Miyata Y, Okada M, Tashiro S. *Cancer Sci*. 107(4):444-51. 2016. 査読有

2. Relaxed Chromatin Formation and Weak Suppression of Homologous Pairing by the Testis-Specific Linker Histone H1T. Machida S, Hayashida R, Takaku M, Fukuto A, Sun J, Kinomura A, Tashiro S, Kurumizaka H. *Biochemistry*.

2;55(4):637-46. 2016. 査読有

3. hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. Okimoto S, Sun J, Fukuto A, Horikoshi Y, Matsuda S, Matsuda T, Ikura M, Ikura T, Machida S, Kurumizaka H, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y, Kiuchi Y, Tashiro S. *Genes Cells*. 20(9):681-94. 2015 査読有

4. Regulation of homologous recombinational repair by lamin B1 in radiation-induced DNA damage. Liu NA, Sun

J, Kono K, Horikoshi Y, Ikura T, Tong X, Haraguchi T, Tashiro S.

*FASEB J*. 29(6):2514-25. 2015 査読有

5. The transcription repressors Bach2 and Bach1 promote B cell development by repressing the myeloid program.

Itoh-Nakadai A, Hikota R, Muto A, Kometani K, Watanabe-Matsui M, Sato Y, Kobayashi M, Nakamura A, Miura Y, Yano Y, Tashiro S, Sun J, Ikawa T, Ochiai K, Kurosaki T, Igarashi K. *Nat Immunol*. (12):1171-80. 2014 査読有

6. Reorganization of Damaged Chromatin by the Exchange of Histone Variant H2A.Z-2.

Nishibuchi I, Suzuki H, Kinomura A, Sun J, Liu NA, Horikoshi Y, Shima H, Kusakabe M, Harata M, Fukagawa T, Ikura T, Ishida T, Nagata Y, Tashiro S. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 89(4):736-44. 2014 査読有

7. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1.

Machida S, Takaku M, Ikura M, Sun J, Suzuki H, Kobayashi W, Kinomura A, Osakabe A, Tachiwana H, Horikoshi Y, Fukuto A, Matsuda R, Ura K, Tashiro S, Ikura T, Kurumizaka H. *Sci Rep*. May 6;4:4863. 2014 査読有

8. Bach1 Deficiency and Accompanying Overexpression of Heme Oxygenase-1 Do Not Influence Aging or Tumorigenesis in Mice. Ota K, Brydun A, Itoh-Nakadai A, Sun J, Igarashi K. *Oxid Med Cell Longev*.

2014;2014:757901. 査読有

[学会発表](計 16 件)

1, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Tsuyoshi Ikura, and Satoshi Tashiro Molecular mechanism of etoposide induced 11q23 chromosome translocations 5<sup>th</sup> international symposium of the mathematics on chromatin live dynamics, 20170307-9, Hiroshima

2, 孫継英, 木野村 愛子, 原田昌彦, 井倉 毅, 田代聡 染色体転座形成におけるクロマチン再構成因子の関与, 第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会 20170111-13, 千葉

3, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Tsuyoshi Ikura, and Satoshi Tashiro Molecular mechanism of etoposide induced 11q23 chromosome translocations the 59th放射線影響学会, 20161026-28, 広島

4, Jiying Sun, Tsuyoshi Ikura, and Satoshi Tashiro Involvement of a chromatin remodeling factor in chromosomal translocations75<sup>th</sup>日本癌学会20161008横浜

5, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Tsuyoshi Ikura, and Satoshi Tashiro Molecular mechanism of etoposide induced 11q23 chromosome translocations 89<sup>th</sup>日本生化学会, 20160925, 仙台

6, 孫継英 染色体転座形成の分子機構の解明原医研セミナー, 20160616, 広島

7, 孫継英、木野村愛子、田代聡 11q23 染色体転座形成の分子機構第1回放射線災害・医学研究拠点カンファレンス, 2016年6月4日, 長崎

8, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Tsuyoshi Ikura, and Satoshi Tashiro Involvement of a chromatin remodeling factor in chromosomal translocations 第38回日本分子生物学会年会第88回日本生化学会大会合同大会, 20151201-04, 神戸

9, Jiying Sun, Tsuyoshi Ikura, Satoshi Tashiro Molecular mechanism of etoposide induced 11q23 chromosome translocations 第84回癌学会 20151008-1010, 名古屋

10, 孫継英、11q23 染色体転座形成の分子機構の検討 平成27年度広島大学・長崎大学連携研究カンファレンス, 平成27年6月6日, 広島

11, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Tsuyoshi Ikura Dipanjan Chowdhury and Satoshi Tashiro Involvement of recombination repair proteins in 11q23 chromosome translocation. 15<sup>th</sup> international congress of radiation research, 20150525-29, Kyoto

12, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura and Satoshi Tashiro Involvement of recombination repair proteins in 11q23 chromosome translocation. 5th International Symposium, 20150302, Hiroshima

13, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura and Satoshi Tashiro

Involvement of recombination repair proteins in 11q23 chromosome translocation, 第32回染色体ワークショップ・第13回核ダイナミクス研究会20141215-17, 広島

14, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura and Satoshi Tashiro Involvement of recombination repair proteins in 11q23 chromosome translocation 第87回日本生化学会, 20141017, 京都

15, Jiying Sun, Aiko Kinomura, Hidekazu Suzuki, Tsuyoshi Ikura and Satoshi Tashiro Involvement of recombination repair proteins in 11q23 chromosome translocation 第57回放射線影響学会 20141001-3, 鹿児島

16, 孫継英、木野村愛子、鈴木秀和、田代聡 染色体転座形成の分子機構：DNA損傷部位におけるRAD51過剰集積の原因を探る 第10回広島大学・長崎大学連携研究事業カンファレンス・長崎, 2014, 5, 31

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

孫継英 ( SUN JIYING )  
広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師  
研究者番号：80397926

### (2)研究分担者

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

### (3)連携研究者

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