

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26550028

研究課題名(和文) DNA損傷記憶のエピジェネティクス解析

研究課題名(英文) The epigenetic regulation for DNA damage memory

研究代表者

井倉 正枝 (Ikura, Masae)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号：40535275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：IL2-R/DRGFPカセットをU2OS細胞に安定に発現させ、I-SceIによるDNA二本鎖切断後にGFP Positive細胞をソーティングして回収した。クロマチン免疫沈降によってDNA損傷領域でのヒストンの化学修飾の状態を検討した。その結果、H2AXのリン酸化については、DNA損傷に伴い、損傷領域で増幅が確認され、その後DNA修復の完了とともに減弱していくことが明らかになった。DNA損傷領域のアセチル化を含めた他の化学修飾とDNA損傷前後でのクロマチン構造の変化は、同じくクロマチン免疫沈降法とMNaseの感受性を定量PCRの系で現在検討中である。

研究成果の概要(英文)：It is known that histone modifications including the phosphorylation, acetylation, ubiquitination and methylation have been detected after induction of DNA damage. However, it is unclear whether these modifications are removed or still observed after DNA damage-repair. Thus we investigated the status of these modifications including the phosphorylated H2AX at the DNA damage-repaired sites by the chromatin immunoprecipitation (Chromatin IP). As a result, the phosphorylated histone H2AX was decreased as DNA damage is repaired. We are still analyzing the status of some other histone modifications by using chromatin IP method. As for the chromatin status at the DNA damage site by I-SceI by using real-time PCR for the sensitivity for MNase, we observed the chromatin opening at the damage site. We will analyze the chromatin status after DNA repair in the near future.

研究分野：放射線生物学

キーワード：DNA損傷記憶 ヒストン化学修飾 クロマチン構造変換 クロマチン免疫沈降

1. 研究開始当初の背景

真核生物の DNA は、ヒストン蛋白質と複合体を形成し、クロマチン構造を形成していることはよく知られた事実である。クロマチン構造の最小単位は、約 146 bp の DNA が、8 量体のヒストン蛋白質に巻き付いたモノヌクレオソームで、このモノヌクレオソームどうしの間隔が狭く、非常に密になれば、クロマチンは凝集した状態になり、いわゆる、ヘテロクロマチンになる。テロメアやセントロメアなどは常にヘテロクロマチン化状態が維持されている。逆にモノヌクレオソームどうしの間隔が、広く保たれた状態は、ユークロマチンと言われ、**immediate early genes** など常に転写が活発なところは、ユークロマチン化状態が維持される。このようにクロマチン構造は、染色体の部位によって様々であり、世代を超えて維持されなければならない箇所もある。また複製や一過的に起きる転写反応においてもクロマチン構造が変換されるが、それら反応が終了すれば、クロマチンの構造も元のポジションに戻ると考えられているが、その詳細は明らかにされていない。

放射線による DNA 二本鎖切断は、染色体上でランダムに生じる。放射線による DNA 二本鎖切断領域のクロマチン構造変換が、DNA 修復あるいは DNA 損傷応答シグナルの活性化に関与していることは知られているが、DNA 修復が完了した後に修復された箇所のクロマチンが損傷前と全く同じように元に戻るのか、あるいは損傷修復前とは異なる状態のクロマチン構造になり、それが維持されてしまうのかなどは、未だに殆ど明らかにされていない。我々は、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体によるヒストン H2AX のアセチル化が、損傷領域からヒストン H2AX を放出させ、クロマチン構造変換を促すことを見出している (Cell. 2000. Front Biosci. 2003. Mol.Cell.Biol. 2007)。興味深いのは、DNA 損傷依存的に起こるヒストン H2AX のリン酸化は、H2AX のクロマチンからの放出には関与しない。このことから DNA 損傷依存的にヒストン H2AX に施されるアセチル化とリン酸化は、DNA 損傷応答に対してお互いに異なった役割をもっていることが示唆される。

2. 研究の目的

本研究課題では、損傷領域で増幅されるヒストン H2AX のアセチル化とリン酸化および H4 のアセチル化に焦点をあて、それらヒストンの化学修飾が、DNA 修復完了後に消去されるのか、あるいは修復完了後も維持されるのか、またそれに伴い損傷領域のクロマチン構造は変化するかについて検討し、DNA 損傷メモリーのエピジェネティクス制御の実体について明らかにしたい。先にも述べたが、TIP60 による H2AX のア

セチル化は、クロマチン構造変換に関与し、H2AX のリン酸化は、関与しない。そこでクロマチン構造変換に対して役割の異なるこの2つの修飾に着目して、DNA 損傷領域でのヒストン H2AX のアセチル化とリン酸化について DNA 修復完了前と後での変化をクロマチン免疫沈降法で検討する。このとき H2AX のアセチル化の責任酵素である TIP60 および TIP60 によってアセチル化されるヒストン H4 についての変化も同様に検討する。さらに DNA 損傷時に損傷領域で生じるヒストンの化学修飾の中には、損傷前のヌクレオソームの位置をメモリーする為に存在しているものもあるかも知れない。この化学修飾の存在をクロマチン構造の変化を修復完了前後で解析することにより探る。

3. 研究の方法

Jasin 博士による DR-GFP のシステム (Methods Mol Biol. 2005) は、HR によって修復された細胞のみが GFP を発現する仕組みで DNA 二本鎖切断を定量的に解析する手段として非常に優れている。本課題で我々は、このシステムに IL2R をマーカーとした細胞選択システムを組み合わせ、DNA 二本鎖切断後に HR によって修復された細胞のみを選択的に集める系を確立する。損傷領域周辺のヒストンの化学修飾の変化を損傷前の状態と比較し、修復完了後も DNA 二本鎖切断領域で増幅されたヒストンの化学修飾が、メモリーとして維持されるのか、あるいは修復に伴い消去されるのかをクロマチン免疫沈降法を用いて解析する。今回は、DNA 二本鎖切断領域でのヒストン H4 および H2AX のアセチル化修飾について検討する。また DNA 修復完了後のヌクレオソームのポジショニングの変化をマイクロコッカスヌクレアーゼの感受性を指標に修復完了領域のクロマチン構造の変化についても検討する。DNA 修復完了後にかつての損傷領域に存在しているヒストンの化学修飾は、2つの意味合いがある。一つは、修復完了後に消去されるべきものが残ってしまい、不具合を生じさせるもの、もう一つは、損傷によって位置が変化したヌクレオソームの位置を損傷前の状態に戻すためのものである。これを区別するためには、それら化学修飾に対する抗体で免疫沈降し、マイクロコッカスヌクレアーゼ (MNase) 処理後に修復領域近傍のプローブでのサザンプロット解析により、クロマチン構造の変化を損傷前後で比較する。損傷領域のクロマチン構造の変化は、MNase に対する感受性で解析することが可能である。MNase は、モノヌクレオソーム間のみを切断し、ヌクレオソーム上での DNA は切断することができない。すなわち、クロマチンが緩んだ状態では、MNase の感受性は増し、PCR での反応は遅くなり、またサザン

では、クロマチンが、モノヌクレソームになる割合が増す。凝縮されたクロマチン領域は、感受性は低下する。この性質を利用する。この解析法で、クロマチン構造が損傷前の状態になっていれば、その化学修飾は、ヌクレオソームメモリーに関与している可能性が高い。クロマチン構造が損傷前と大きく異なれば、それは消去されるべき修飾と判断できる。

4. 研究成果

IL2-R/DRGFP カセットを U2OS 細胞に安定に発現させ、I-SceI による DNA 二本鎖切断を行い、DNA 修復が完了したことを示す GFP Positive 細胞をマグネットビーズを付与した IL2-R の抗体で、ソーティングした。ソーティングによって回収した細胞を用いて、クロマチン免疫沈降によって DNA 損傷が修復した領域でのヒストンの化学修飾の状態を検討した。その結果、H2AX のリン酸化については、DNA 修復の完了とともに減弱している様子が確認できた。その他の化学修飾であるアセチル化については現在検討中である。その一方で、我々は、定量プロテオミクス解析によって放射線障害によって引き起こされる H2AX のアセチル化とリン酸化の度合いが、細胞ごとに異なることを見出しており、このことから、DNA 損傷が修復された領域でのヒストンの化学修復の状態は、多様であることが示唆された (Matsuda, S., et al., *Radiat. Environ. Biophys.* 54: 403-411)。従って、細胞の種類によって結果が異なる可能性があり、その点は今後検討していきたい。

また、IL2-R/DRGFP カセットが挿入されている領域が、ヘテロクロマチン領域かあるいはユークロマチン領域かで、得られる結果に違いが生じる可能性があるため、この点に関してはいくつかのクローンで、検討することも昨年より始めているが、この点については、クロマチン免疫沈降法で、ヘテロクロマチン蛋白質 HP1 の濃縮を見定めることにより解決しようと考えている。

DNA 損傷前後でのクロマチン構造の変化は、サザンプロテイングでの方法は、うまくいかなかったが、MNase の感受性を定量 PCR で検討する方法は系が確立できた。現在は、DNA 損傷前後でのクロマチン構造の変化を検討中である。

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. 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 (2014). Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered

chromatin containing histone H1. *Sci Rep.*4: 4863.

2. 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. (2015). hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes to cells.* 20: 681-694

3. Matsuda, S., Furuya, K., Ikura, M., Matsuda, T., Ikura, T (2015). Absolute quantification of acetylation and phosphorylation of the histone variant H2AX upon ionizing radiation reveals distinct cellular responses in two cancer cell lines. *Radiat Environ Biophys.* 54: 403-411

4. Matsuda, S., Furuya, K., Ikura, M., Matsuda, T., Ikura, T (2015). Absolute quantification of acetylation and phosphorylation of the histone variant H2AX upon ionizing radiation reveals distinct cellular responses in two cancer cell lines. *Radiat. Environ. Biophys.* 54: 403-411

5. Matsuda, S., Adachi, J., Ihara, M., Tanuma, N., Shima, H., Kakizuka, A., Ikura, M., Ikura, T., Matsuda, T (2015). Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor. *Nucleic Acids Res.* 44: 636-647

6. Ikura, M., Furuya, K., Matsuda, S., Matsuda, R., Shima, H., Adachi, J., Matsuda, T., Shiraki, T., Ikura, T (2015). Acetylation of histone H2AX at Lys 5 by the TIP60 histone acetyltransferase complex is essential for the dynamic binding of NBS1 to damaged chromatin. *Mol Cell Biol.* 35: 4147-4157.

7. Matsuda, S., Matsuda, Y., Yanagisawa, SY., Ikura, M., Ikura, T., Matsuda, T (2016). Disruption of DNA Damage-response by Propyl Gallate and 9-Aminoacridine. *Toxicol Sci.* [Epub ahead of print]

8. Ikura, M., Furuya, K., Matsuda, R., Adachi, J., Matsuda, T., Kakizuka, A., Ikura, T (2016). Coordinated regulation of TIP60 and PARP-1 in damaged chromatin dynamics. *Mol Cell Biol.* 36:1595-1607

〔学会発表〕(計 11 件)

口頭発表

1. 井倉 毅、松田 涼、井倉正枝 「DNA 損傷応答におけるヒストン H2AX 化学修飾の時空間的制御」第 87 回日本生化学会大会 2014 年 10 月 15-16 日 京都市

2. Tsuyoshi Ikura, Hiroki Shima, Sun Jiyang, Ryo Matsuda, Masae Ikura and Satoshi Tashiro 「Activation of the SUMO modification system is required for the accumulation of RAD51 at sites containing DNA damage」第 5 回日米修復会議 2014 年 10 月 28-29 日 鳴門、徳島

3. Tsuyoshi Ikura, Ryo Matsuda, Satoshi Tashiro and Masae Ikura 「The role of histone H2AX dynamics in DNA damage response」The 4D Nucleome 2014 2014 年 12 月 17-20 日 広島市

4. Tsuyoshi Ikura, Shun Matsuda, Masae Ikura and Tomonari Matsuda 「The role of the pyruvate kinase M2 (PKM2) in the Arylhydrocarbon Receptor-mediated Transcription」5th meeting of the Asian Forum for chromatin and chromosome Biology 2015 年 1 月 13-19 日 Bungalow, India.

5. Tsuyoshi Ikura, Shun Matsuda, Masae Ikura and Tomonari Matsuda 「The coupling of epigenetic regulation with metabolism in cancer」The 30th RBC-NIRS International Symposium "Frontier Radiation Biology, Now and In the future". 2015 年 2 月 20-21 日

6. 井倉 毅、古谷寛治、松田 俊、松田知成、松田 涼、田代 聡、井倉正枝 「DNA 損傷応答における動的クロマチン平衡とその意義」ワークショップ ゲノムストレス応答における普遍性と多様性の相互転換 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 1 日～4 日、神戸市

ポスター発表

1. Masae Ikura, Ryo Matsuda, Satoshi Tashiro, and Tsuyoshi Ikura 「Chromatin dynamics in DNA damage response」IIAS Research Conference 2014 Chromatin

decoding 2014 年 5 月 12-14 日 京都市

2. 町田晋一、高久誉大、井倉正枝、孫継英、鈴木秀和、小林航、木野村愛子、越阪部晃永、立和名博昭、堀越保則、福戸敦彦、松田諒、浦聖恵、田代聡、井倉毅、胡桃坂仁志 「Nap1 は高次クロマチンでの相同組換えを促進する」第 32 回 染色体ワークショップ 2014 年 12 月 15-17 日 広島市

3. Masae Ikura, Ryo Matsuda, Satoshi Tashiro, and Tsuyoshi Ikura 「Histone H2AX dynamics coordinates DNA repair with chromatin reorganization」The 5th International Symposium of RIRBM, Hiroshima University 2015 年 3 月 2-3 日 広島市

4. 郡司未佳、井倉正枝、土生敏行、井倉毅、古谷寛治 「DNA チェックポイント因子 Rad9 の分解を促進する Cdk-Plk1 依存的機構」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 1 日～4 日、神戸市

5. 松田俊、足立淳、伊原賢、田沼延公、島礼、垣塚彰、井倉正枝、井倉毅、松田知成 「ピルビン酸キナーゼとピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体によるアセチル CoA の治産池消モデル」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 1 日～4 日、神戸市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

井倉 正枝 (IKURA MASAE)

京都大学・放射線生物研究センター・研究員

研究者番号 : 40535275