

## 230. DNA 損傷修復の基盤となる核微小環境の解明

野澤 竜介

がん研究会 がん研究所 実験病理部

Key words : クロマチン構造, DNA 損傷応答, Oligopaint DNA-FISH, がん

### 緒言

がんは、がん遺伝子の活性化とがん抑制遺伝子の不活性化に加えて、DNA 損傷に対して的確に応答し修復する役割を担うゲノム安定化遺伝子の機能不全によって、発生・進展すると考えられている。実際に、がんの全ゲノム解析が進み、がん細胞で DNA 損傷が相当に蓄積していることがわかってきた [1]。しかし一方で、損傷修復に関わるゲノム安定化遺伝子の機能がいかに制御されているのか、不明な点が多い。

野澤はこれまでに、転写の抑制に伴いクロマチンが収縮し、一方で転写の活性化の際にはクロマチンが弛緩することを見出し、それぞれの分子メカニズムの一端を明らかにした [2, 3]。凝縮と脱凝縮のどちらのクロマチン構造変換も、タンパク質が局所に集合することで作り出される微小環境により誘導される。特に転写に誘導されるクロマチン構造変換は、スプライシングをはじめとした適正な転写制御に重要であった。こうした観察から、DNA 損傷修復の制御においても、その局所に適切な場が作り出されることが必要であると考えた。そこで本研究では、適正な DNA 損傷修復反応がいかに制御されているのか、その局所に作り出される微小環境についての理解を目指し、DNA 損傷に伴ってクロマチンにいかなる構造変換が誘導されるのかを解析した。

### 方法

#### 1. 材料

本研究では、DNA 損傷に伴うクロマチンの構造変換を解析することを目的とした。研究を進めるにあたり FlpIN および T-REx (tetracycline-regulated mammalian expression) システムが導入された、正常 2 倍体のヒト培養細胞の hTERT-RPE1 を用いた [4]。Flp-IN は、FRT (flippase recognition target) サイトに相同組換えを介して目的遺伝子を挿入できるシステムであり、T-REx は、Doxycycline の添加により目的遺伝子の発現を誘導できるシステムである。

#### 2. Oligopaint DNA-FISH 法を用いたクロマチンの可視化

DNA 損傷に誘導されるクロマチン構造変換を解析するために、標的クロマチン領域全体を蛍光標識する手法である Oligopaint DNA-FISH (Fluorescence *in situ* hybridization) 法を用いた [5]。DNA 損傷の標的としたヒト 3 番染色体 3q29: 194,500,000~196,500,000 (Ch3Rep) の 2 Mb のゲノム領域に対して、DNAoligo を 1 Kb あたり平均 10 個の密度で設計し、それらに蛍光分子である Cy3 を付加した。これらの Oligopaint プローブをゲノム DNA に対してハイブリダイズすることで、標的クロマチン領域を蛍光標識した。

#### 3. very fast CRISPR 法を用いた DNA 損傷誘導

同調的かつ効率的に DNA 損傷を誘導するために、UV 照射により DNA 損傷を誘導可能な very fast CRISPR (vfCRISPR) 法 [6] を用いた。vfCRISPR 法は、光感受性の化合物が修飾された shot guide RNA (sgRNA) を用いることで、その立体障害により DNA 切断活性が不活性な状態で Cas9 を標的ゲノム領域にターゲットすることができ、その後 365 nm の UV 照射により sgRNA の化学修飾を除去することで Cas9 を活性化させ、標的 DNA の二本鎖切断を誘導する手法である。ヒト 3 番染色体の Ch3Rep 領域に分布する高度な繰り返し DNA 配列をその標的とした。

## 結果

### 1. DNA 損傷に伴った 53BP1 の局在変化の解析

DNA に損傷が生じると、DNA 損傷応答が誘導され速やかに DNA 修復経路が活性化される。53BP1 (p53-binding protein 1) は、主要な DNA 損傷応答タンパク質の 1 つであり、DNA 二本鎖切断が生じたクロマチン領域に蓄積し、他の DNA 損傷関連タンパク質を呼び込む足場として働く [7]。そこで、どのくらいの時間で 53BP1 が DNA 二本鎖切断を認識するかを調べるために、生細胞観察により 53BP1 の挙動を解析した (図 1a)。GFP-53BP1 の発現誘導細胞を用いて、GFP-53BP1 の発現をドキシサイクリンの添加により誘導してから 24 時間後に、1 Gy の放射線照射により DNA 損傷を導入した。その結果、放射線照射後 10 分で GFP-53BP1 の点状のシグナルが観察され、その数は 30 分で最大となり、その後徐々に減少した。この観察結果は、DNA 損傷導入後から 30 分までの間に、53BP1 が DNA 損傷を認識しその局所に高度に集合していることを示している。次に、53BP1 の集合体の形態が時間経過につれて変化するかどうかを検討するために、共焦点レーザー顕微鏡を用いて解析を行った (図 1b)。放射線照射から 3 分後では 53BP1 は小さく丸みのある集合体を形成し、DNA 損傷のマーカであるリン酸化ヒストン H2AX (gH2AX) と共局在した。そしてその 30 分後では、53BP1 の集合体は細長いフィラメント状へと形を変え、また gH2AX とは部分的に共局在した。さらにその 2 時間後では、53BP1 の集合体は gH2AX を取り囲むように観察された。これらの観察結果から、53BP1 はクロマチンに結合する性質を持つことより、53BP1 集合体の形の変化はクロマチンの構造変化を反映していると考えられ、損傷を受けたクロマチンは時間経過とともに修復に向けてその構造を再編成することが示唆された。

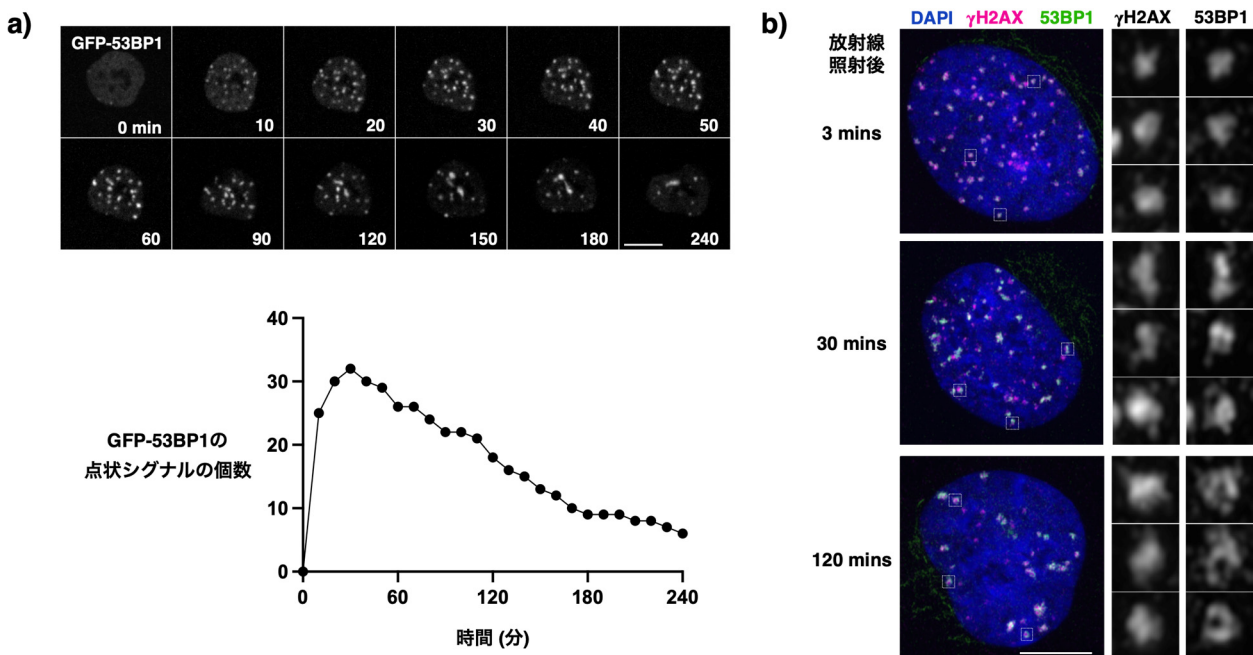


図 1. 53BP1 の DNA 損傷領域への蓄積とその局在変化

- 生細胞観察により放射線照射後から GFP-53BP1 の局在を 10 分おきに観察した。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$ 。(上図)。細胞核内の GFP-53BP1 の点状のシグナルの個数を数えた (下図)。
- 共焦点レーザー顕微鏡により gH2AZ と 53BP1 の局在を観察した。スケールバーは  $10 \mu\text{m}$ 。

## 2. Oligopaint DNA-FISH 法を用いたクロマチン構造解析手法の構築

DNA 損傷によってクロマチンの構造変換が誘導されることが予想されたので、クロマチン構造変換の解析手法を確立する目的で、標的クロマチン全体を標識する Oligopaint DNA-FISH 法を検討した。ヒト 3 番染色体の 3q29 ; 194,500,000~196,500,000 (Ch3Rep) 領域に対して約 16,000 種のオリゴ DNA を設計し、Cy3 で標識した (図 2a)。続いて、細胞に対して転写阻害剤である  $\alpha$ -amanitin を添加後 5 時間培養し、Ch3Rep 領域を Oligopaint DNA-FISH により可視化した (図 2b)。これまで、野澤は転写活性なクロマチン領域は弛緩した状態にあり、転写阻害処理により顕著に凝縮することを明らかにしている [3]。そこで遺伝子密度が高く転写活性である Ch3Rep 領域について、転写阻害によって誘導されるクロマチン構造変換を Oligopaint DNA-FISH 法により評価できるかどうか検討した。その結果、 $\alpha$ -amanitin 処理により蛍光標識された Ch3Rep の領域が顕著に縮小した。さらに、Ch3Rep の体積を定量すると、 $\alpha$ -amanitin 処理すると未処理と比較して約 1.9 倍減少した (図 2c)。これらの解析により、転写阻害に誘導されるクロマチンの凝縮を定量的に解析することができたため、Oligopaint DNA-FISH 法を用いた定量解析が、クロマチン構造変換の解析に有効であることを検証できた。

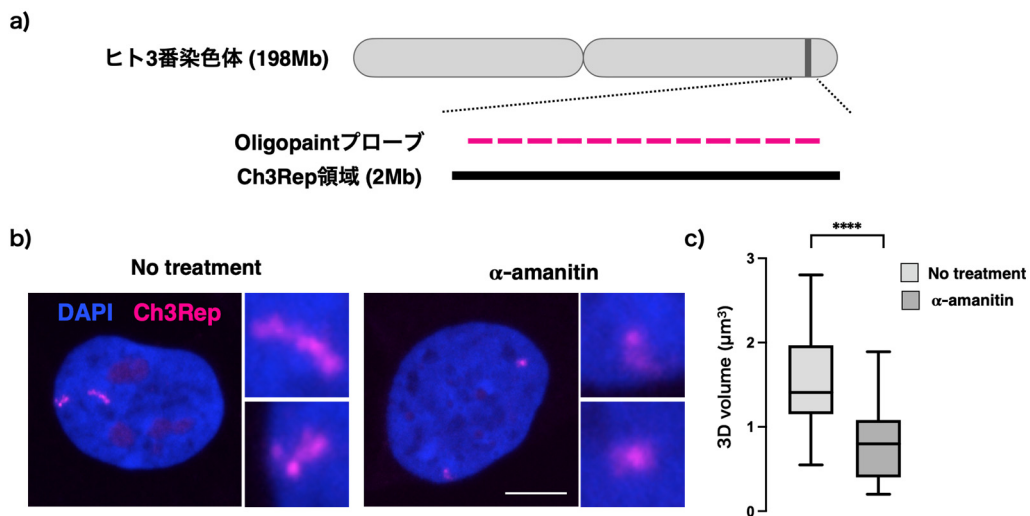


図 2. Oligopaint DNA-FISH 法によるクロマチン構造解析系の構築

- 3q29 ; 194,500,000~196,500,000 (Ch3Rep) に、合計 16,428 箇所の Oligopaint プローブを設計した。
- 転写阻害剤  $\alpha$ -amanitin を 50  $\mu$ g/mL の濃度で 5 時間処理した細胞と、未処理の細胞に対して Oligopaint DNA-FISH により Ch3Rep 領域を可視化した。スケールバーは 10  $\mu$ m。
- Z 軸 0.3  $\mu$ m 間隔で 11 切片の画像を取得し、ImageJ plugin 3D object counter を用いて、標識されたクロマチンの体積を計測した。\*\*\*\* $p < 0.0001$  (Wilcoxon test)。

## 3. DNA 損傷に誘導されるクロマチン構造変換の解析

DNA 損傷に誘導されるクロマチン構造変換を解析するために、DNA 損傷を同調的に誘導する手法として vfCRISPR 法を導入した。光感受性の化合物が修飾された sgRNA と Cas9 の複合体をエレクトロポレーション法により細胞内に導入し、その 16 時間後に UV 照射により Cas9 を活性化することで DNA 損傷を誘導し、さらにその 30 分後に観察を行った (図 3a)。その結果、Ch3Rep の領域に DNA 損傷のマーカである gH2A の局在が観察され、vfCRISPR 法により DNA 損傷を迅速に導入できることを確認した。そこで、vfCRISPR 法を用いて DNA 損傷を誘導した時の Ch3Rep 領域のクロマチンの構造変換を Oligopaint DNA-FISH 法により解析した (図 3b)。53BP1 が最も高度に DNA 損傷クロマチンに集合することが観察された、DNA 損傷誘導から 30 分後に Ch3Rep 領域のクロマチンを観察すると、Ch3Rep は顕著に収縮して観察された。Ch3Rep のクロマチンの体積を解析すると、UV を照射していない細胞と比較して、約 1.3 倍減少した。この結果から、DNA 損傷によりクロマチンの凝縮が誘導されること明らかとなった。

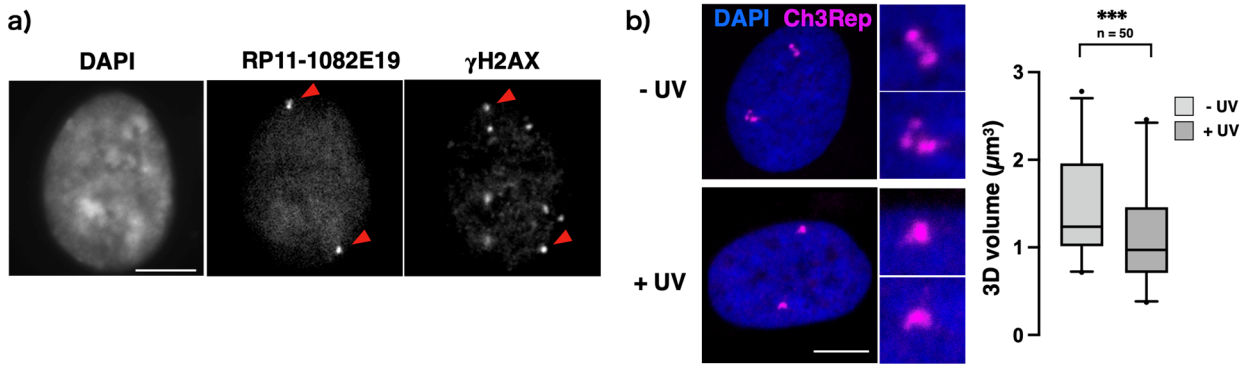


図3. DNA 損傷に伴うクロマチン構造変換の解析

- a) vfCRISPR 法を用いて DNA 損傷を誘導し、BAC クローン RP11-1082E19 (3q29 ; 194,462,692～194,689,993) を用いた DNA-FISH により Ch3Rep の一部を可視化し (赤矢頭、免疫染色により gH2AX を可視化した。スケールバーは 10 μm。
- b) UV 照射を介した Cas9 を活性化により DNA 損傷を誘導し、Ch3Rep 領域を Oligopainting DNA-FISH 法により可視化し、クロマチンの体積を定量解析した。スケールバーは 10 μm。\*\*\*p<0.001 (Wilcoxon test)。

## 考 察

本研究では、Cas9 による DNA の二本鎖切断を誘導する実験系を用いることで、DNA 損傷誘導後から 30 分で損傷を受けたクロマチンが顕著に凝縮することを明らかにした。これまで、DNA が損傷を受けると、損傷領域に特異的に蛍光標識されたヒストンは、損傷導入後からおよそ 10 分間で損傷部位を中心に広がるが、その後に顕著に収束することが観察されていた [8]。この DNA 損傷領域のヒストンの収束は、本研究により見出された DNA 損傷に伴ってクロマチンが凝縮するタイミングとよく一致している。このことから、ヒストンの動態がクロマチンの構造変換を反映していると考えられ、これに基づくと、損傷を受けたクロマチンは弛緩しその後凝縮するというダイナミックな構造変換を進めながら DNA 損傷の修復反応の場を作り出していることが推察される。また、DNA 損傷クロマチンに集合し、時間の経過とともにその局在を変化させた 53BP1 は、自己集合活性を持つことが近年報告された [9, 10]。クロマチンに結合した 53BP1 どうしが互いを引き寄せ合うことでクロマチン構造の制御に寄与する可能性がある。

本研究で立ち上げた Oligopaint DNA-FISH と vfCRISPR 法を組み合わせることで、任意のクロマチン領域の DNA 損傷に伴うクロマチンの構造変換を解析することが可能である。これらの技術を用いることにより、クロマチンの構造変換が DNA 損傷修復反応にいかに関与するかを問うことで、DNA 損傷修復反応を制御する微小環境の理解への進展が期待される。さらに正常細胞とがん細胞との間で DNA 損傷に伴うクロマチン構造変換の動態を比較し、クロマチンの再編成と DNA 損傷修復反応の効率や確度と結びつけることができたならば、なぜがんで DNA 損傷が蓄積しているのかという未だ解明されていない謎にアプローチするための足がかりが得られるだろう。

## 共同研究者・謝辞

本研究は、公益財団法人がん研究会がん研究所実験病理部にて行いました。ご指導やご助言いただきました、広田亨部長をはじめ研究室の皆さんに深く感謝申し上げます。そして、本研究を遂行するにあたり、ご支援賜りました公益財団法人上原記念生命科学財団に深く御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Jr., Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58. doi: 10.1126/science.1235122. PubMed PMID: 23539594; PubMed Central PMCID: PMC3749880.
- 2) Nozawa RS, Nagao K, Igami KT, Shibata S, Shirai N, Nozaki N, et al. Human inactive X chromosome is compacted through a PRC2-independent SMCHD1-HBiX1 pathway. *Nat Struct Mol Biol*. 2013;20(5):566-73. Epub 20130331. doi: 10.1038/nsmb.2532. PubMed PMID: 23542155.
- 3) Nozawa RS, Boteva L, Soares DC, Naughton C, Dun AR, Buckle A, et al. SAF-A Regulates Interphase Chromosome Structure through Oligomerization with Chromatin-Associated RNAs. *Cell*. 2017;169(7):1214-27 e18. doi: 10.1016/j.cell.2017.05.029. PubMed PMID: 28622508; PubMed Central PMCID: PMC5473940.
- 4) Mansfeld J, Collin P, Collins MO, Choudhary JS, Pines J. APC15 drives the turnover of MCC-CDC20 to make the spindle assembly checkpoint responsive to kinetochore attachment. *Nat Cell Biol*. 2011;13(10):1234-43. Epub 20110918. doi: 10.1038/ncb2347. PubMed PMID: 21926987; PubMed Central PMCID: PMC3188299.
- 5) Boettiger AN, Bintu B, Moffitt JR, Wang S, Beliveau BJ, Fudenberg G, et al. Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states. *Nature*. 2016;529(7586):418-22. Epub 20160113. doi: 10.1038/nature16496. PubMed PMID: 26760202; PubMed Central PMCID: PMC4905822.
- 6) Liu Y, Zou RS, He S, Nihongaki Y, Li X, Razavi S, et al. Very fast CRISPR on demand. *Science*. 2020;368(6496):1265-9. doi: 10.1126/science.aay8204. PubMed PMID: 32527834; PubMed Central PMCID: PMC7608738.
- 7) Panier S, Boulton SJ. Double-strand break repair: 53BP1 comes into focus. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(1):7-18. Epub 20131211. doi: 10.1038/nrm3719. PubMed PMID: 24326623.
- 8) Burgess RC, Burman B, Kruhlak MJ, Misteli T. Activation of DNA damage response signaling by condensed chromatin. *Cell Rep*. 2014;9(5):1703-17. Epub 20141120. doi: 10.1016/j.celrep.2014.10.060. PubMed PMID: 25464843; PubMed Central PMCID: PMC4267891.
- 9) Kilic S, Lezaja A, Gatti M, Bianco E, Michelena J, Imhof R, et al. Phase separation of 53BP1 determines liquid-like behavior of DNA repair compartments. *Embo j*. 2019;38(16):e101379. Epub 20190701. doi: 10.15252/embj.2018101379. PubMed PMID: 31267591; PubMed Central PMCID: PMC6694294
- 10) Zhang L, Geng X, Wang F, Tang J, Ichida Y, Sharma A, et al. 53BP1 regulates heterochromatin through liquid phase separation. *Nat Commun*. 2022;13(1):360. Epub 20220118. doi: 10.1038/s41467-022-28019-y. PubMed PMID: 35042897; PubMed Central PMCID: PMC8766474.