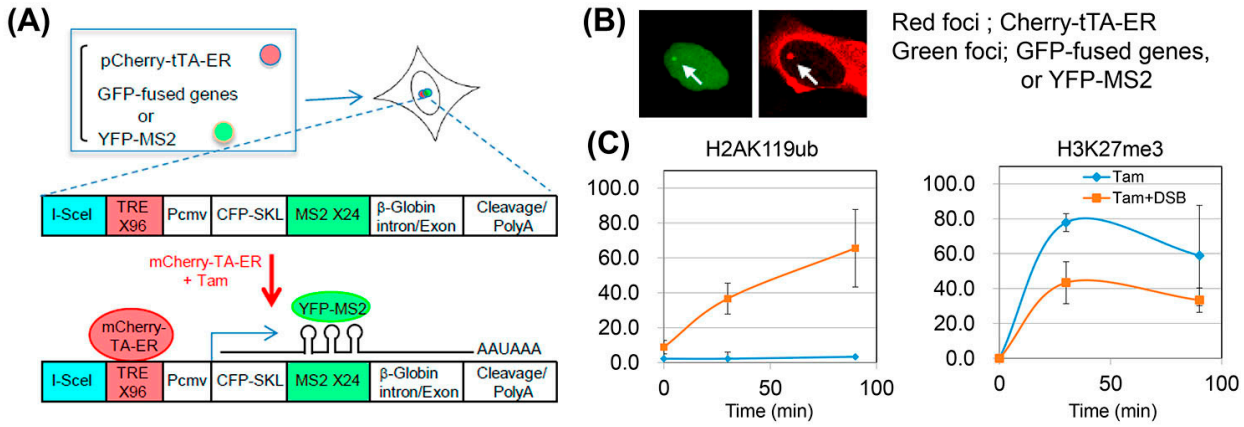
| 25　クロマチンリモデリングの染色体安定性における機能 | 宇井　彩子 |
|---|---|

**【目的】**クロマチンの構造変化に伴うクロマチンリモデリング・ヒストン修飾に関与する因子は、細胞がん化や細胞老化に関与していることが知られている。近年、我々は転写近傍で DNA 二重鎖切断が起きると、転写と DNA 修復が共役して働き、ゲノム安定性維持に寄与することを見出した。本研究では新たに、転写の伸長期に加えて開始期を観察するための実験系を構築し、転写の開始と伸長期において DSB の誘導した際の転写とヒストン修飾の変化を解析した。またがん細胞におけるクロマチンリモデリング因子の発現解析を行った。

**【方法】**近年、我々は U2OS 細胞のゲノムに転写を活性化し、ライブあるいは免疫染色により観察できる実験系を構築した（図 A)。この実験系を用いて、GFP タグをつけた転写因子クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾因子をトランスフェクションすることにより、これら因子の転写部位への結合がライブで観察できる（図 B)。また、ヒストン修飾を観察する際には、タモキシフェン処理より経時的に固定し、免疫染色を行った。転写活性化と同時に DSB を誘導する際には、上記 1 のプラスミドのトランスフェクションの際に I-SceI を発現するプラスミドを同時にトランスフェクションする。DSB の導入効率に関しては、DSB のマーカーであるγH2AX の免疫染色により確認する。

**【結果】**今回の結果より、DSB の誘導により転写の伸長に関わる因子の一部が転写活性化部位から離脱することにより、伸長の時期が抑制されることが明らかになった。また、転写伸長時期のマーカーである RNA polymerase Ⅱの S2 のリン酸化も減少した。このことにより、DSB が起きた際には、転写の開始よりも RNA polymerase Ⅱが RNA を合成している時期である転写伸長期の RNA polymecase Ⅱのリン酸化を制御することにより、RNA polymerase Ⅱのテンプレート DNA 上の移動が抑制されるのではないかと考えられた。また、この RNA polymerase Ⅱのリン酸化の変化に伴って、この際に特に H3K4 のジメチルとトリメチルが減少すること、それとは反対に H2AK119 のユビキチン化が誘導されることが明らかになった。このことにより、DSB の誘導により Trithorax 群に属する MLL の活性が弱まり、一方で Polycomb 群に属する PRC1 の活性が上昇することが明らかになった。このため、RNA polymerase Ⅱのテンプレート DNA 上の移動とクロマチン構造の変化が機能的に関連することにより、転写の伸長期が抑制される可能性が示唆された。今後はさらに、Trithorax 群と Polycomb 群の酵素と、これらのヒストン修飾に影響を与える因子のノックダウンした際の影響を観察することにより、どのようなクロマチンの構造変化が転写の伸長期を抑制しているのかを明らかにしたい。

転写・クロマチン構造変化と DSB 修復を同時に検出する実験系の構築



# 25. クロマチンリモデリングの染色体安定性における機能

宇井　彩子

東京工科大学 応用生物学部 疾患ゲノム制御

Key words : transcription, DSB(DNA double strand breaks), chromatin remodeling, histone modification, cancer

## 緒　言

転写・DNA 修復・クロマチンリモデリングなど DNA の代謝を伴う生命活動において、染色体の構造変化は非常に重要であり、そのメカニズムの解明が進められている。特にクロマチンの構造変化に伴うクロマチンリモデリング・ヒストン修飾に関与する因子は、細胞がん化や細胞老化に関与していることが知られている。我々は今までに、癌で高頻度に変異が検出され上記の様にクロマチン構造変化に関与する因子の BRG1、SNF5、ARID1A/B、CBP/P300、BMI1（ポリコーム）が DNA 二重鎖切断（DNA double strand breaks ; DSB）に機能し、染色体安定性維持に重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた［1〜9］。近年、我々は染色体の構造変化と、転写と DNA 二重鎖切断修復における双方の機能を比較・相関できる新たな実験系を構築し、ポリコームがヒストン修飾を介して、クロマチンの構造変化を制御することにより、転写と DNA 修復が共役して働き、ゲノム安定性の維持に寄与することを見出した［5］。そこで、本研究では転写抑制と DSB 修復におけるクロマチンリモデリング因子とヒストン修飾の機能の比較・相関を明らかにし、染色体不安定性のメカニズムの解明を目的としている。今回新たに、転写の伸長期に加えて開始期を観察するための実験系を構築した。この新たな実験系により、転写の開始と伸長期において DSB の誘導したところ、転写の伸長期が抑制が観察され、この抑制には Trithorax 群と Polycomb 群によるヒストン修飾の変化が関与することが明らかになった。

## 方　法

### 1. 転写の活性化

近年、我々は U2OS 細胞のゲノムに転写を活性化し、ライブあるいは免疫染色により観察できる実験系を構築した（図 1A）。この実験系では、U2OS-19 細胞［5］に、プラスミド pCherry-tTA-ER と pYFP-MS2 を Lipofectamin 3000 あるいはエレクトロポレーションによりトランスフェクションする。24 時間後、pCherry-tTA-ER が発現し細胞質に蓄積したことを確認し、タモキシフェンを処理する。タモキシフェン処理後の直後に pCherry-tTA-ER が細胞質から核内に移動することが観察され、その直後より転写が活性化されることが YFP-MS2 が転写部位に結合することにより観察できる（図 1B)。pYFP-MS2 の代わりに GFP タグをつけた転写因子クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾因子をトランスフェクションすることにより、これら因子の転写部位への結合がライブで観察できる。また、ヒストン修飾を観察する際には、タモキシフェン処理より経時的に固定し、免疫染色を行う。さらに、プラスミドのトランスフェクションより二日前に siRNA と Lipofectamin RNAiMAX を用いて関連因子をノックダウンすることにより、これらの因子の発現低下による転写活性化や、転写因子・クロマチンリモデリング因子・ヒストン修飾因子の転写部位への結合の変化を観察できる（図 1B)。

### 2. I-SceI による DSB の誘導

転写活性化と同時に DSB を誘導する際には、上記 1 のプラスミドのトランスフェクションの際に I-SceI を発現するプラスミドを同時にトランスフェクションする。DSB の導入効率に関しては、DSB のマーカーである γ H2AX の免疫染色により確認する。

### 3. がん細胞におけるクロマチンリモデリング因子の発現解析と放射線、抗がん剤感受性の測定

RIPA buffer によりがん細胞の細胞抽出液を作成した後、それぞれのクロマチンリモデリング因子の抗体を用いてウエスタンブロットを行った。さらに、クロマチンリモデリング因子の発現低下細胞に関しては、放射線と抗がん剤処理を行い、コロニー形成アッセイにより感受性を検討した。

## 結　果

### 1. DSB によるクロマチンの構造の経時的変化。

我々のシステムでは、転写を誘導してから、経時的に転写の活性化（伸長）をライブで可視化できる［5］。転写が活性化するステップとして、転写の開始と伸長の時期があるが、我々の構築したシステムでは転写の伸長期しか観察できなかった。そこで DSB が起きた時に転写活性化のどの時期で影響を受けるかを明らかにするために、新たに転写伸長のみならず、転写の開始も検出できる実験系の構築を行った。今回の実験系より、転写の開始期には転写部位に転写開始に関与する因子の結合が観察され、さらに RNA polymerase Ⅱの転写部位への結合に加えて S2 のリン酸化は観察されず S5 のリン酸化が観察されたため、転写開始がライブで観察できることが確認できた（図 1）。

この新たな実験系を用いて、ヒストン修飾・クロマチンリモデリングの抗体を用いて、転写活性化部位の近傍で DSB が起きた際に、クロマチン構造の経時的変化を可視化した。ヒストン H3 と H4 のメチル化の中でも H3K9me3、H3K27me3 は転写活性化部位の近傍に DSB を発生させると減少傾向にあった（図 1C）。さらに、H3K4me2 と H3K4me3 は DSB の発生により減少することが明らかになった（図 1）。また、ポリコームの基質である H2A のユビキチン化の H2A-K119ub は経時的に上昇することが明らかになった（図 1）。このため、DSB の誘導により転写の伸長が抑制され、転写抑制が起きていることが示唆された。

今後は、上記のヒストン修飾に関わるヒストン修飾酵素とクロマチンリモデリング因子に蛍光タンパクを付け、転写部位における挙動の経時的変化をライブで可視化する予定である。

### 2. 染色体の構造変化と、転写活性・DSB 修復活性との関連

このシステムでは、ライブで転写活性・DSB 修復活性が可視化できる。そこで、上記のクロマチンの構造変化と、これらの機能（転写活性・DSB 修復活性）を解析した。上記 1 で開発した、転写の開始と転写の伸長の両方を誘導し、更に I-SceI を発現させて DSB の誘導を行った。DSB を誘導したところ、転写伸長が抑制されることが明らかになった。現在、DSB 修復因子に GFP を付け、DSB 部位への集積を観察することにより、どのような DSB 修復が機能しているのかを明らかにする予定である。

### 3. DNA 二重鎖切断と転写の機能の比較・相関と、ゲノム安定性のメカニズム

さらに DSB 誘導時に、転写がどのような影響を受けるのかを、転写因子の挙動を観察することにより検討した。その結果、転写の開始に関与する因子は DSB 誘導により大きな影響を受けなかった一方、転写の伸長に関与する因子が DSB により転写部位より一部解離しているのが確認された。また、RNA polymerase Ⅱのリン酸化を観察したところ、転写伸長に関与する pS2 のリン酸化が DSB により減少することが示された。このことより、DSB により転写伸長が抑制される可能性が考えられた。現在、クロマチンリモデリング因子のノックダウンにより、これらの転写伸長がどのような影響を受けるのかを明らかにしたい。

転写・クロマチン構造変化と DSB 修復を同時に検出する実験系の構築

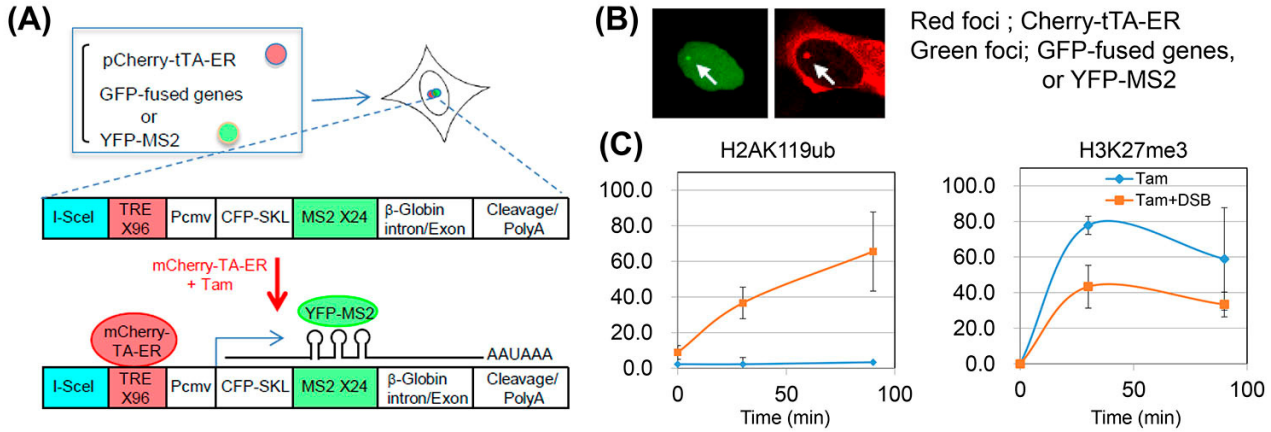



図 1.（A）本研究で用いた転写を経時的に観察するシステム（Ui et al., Mol Cell, 2015）。（B）この実験系を用いてタモキシフェンを処理すると、Cherry-tTA-ER が転写部位に結合して転写を誘導する。その結果、GFP タグをつけた転写因子や RNA に結合する YFP-MS2 が転写部位に結合する。（C）この実験系を用いて転写を活性化させた際に I-SceI により DSB を誘導すると、ヒストン H2A のユビキチン化が上昇したが、H3K27 のメチル化は減少した。

**4. 癌細胞における DNA 二重鎖切断修復に関与するクロマチンリモデリング因子の発現量と、DNA 二重鎖切断を誘導する抗がん剤に対する感受性の相関**

様々な癌細胞でクロマチンリモデリング因子の変異・欠失・増幅・エピジェネティックな変化などにより、発現量が変化していることが知られているが、特に肺がん細胞において、SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の BRG1 の変異が高頻度に観察されている。そこで肺がん細胞を用いて、他のクロマチンリモデリング因子の発現量を観察した。その結果、ISWI クロマチンリモデリング複合体の中でも特に触媒サブユニットの ACF1, SNF2H の発現が一部減少していることが明らかになった。現在、これらの発現低下癌細胞を用いて、放射線感受性と抗がん剤感受性を検討中である。

## 考　察

今回の結果より、DSB の誘導により転写の伸長に関わる因子の一部が転写活性化部位から離脱することにより、伸長の時期が抑制されることが明らかになった。また、転写伸長時期のマーカーである RNA polymerase II の S2 のリン酸化も減少した。このことにより、DSB が起きた際には、転写の開始よりも RNA polymerase II が RNA を合成している時期である転写伸長期の RNA polymecase II のリン酸化を制御することにより、RNA polymerase II のテンプレート DNA 上の移動が抑制されるのではないかと考えられた。また、この RNA polymerase II のリン酸化の変化に伴って、この際に特に H3K4 のジメチルとトリメチルが減少すること、それとは反対に H2AK119 のユビキチン化が誘導されることが明らかになった。このことにより、DSB の誘導により Trithorax 群に属する MLL の活性が弱まり、一方で Polycomb 群に属する PRC1 の活性が上昇することが明らかになった。このため、RNA polymerase II のテンプレート DNA 上の移動とクロマチン構造の変化が機能的に関連することにより、転写の伸長期が抑制される可能性が示唆された。今後はさらに、Trithorax 群と Polycomb 群の酵素と、これらのヒストン修飾に影響を与える因子のノックダウンした際の影響を観察することにより、どのようなクロマチンの構造変化が転写の伸長期を抑制しているのかを明らかにしたい。

## 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、東北大学加齢医学研究所加齢ゲノム制御プロテオーム研究部門の安井明先生である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

## 文 献


1) YasudaT, Kagawa W, Ogi T, Kato TA, Suzuki T, Dohmae N, Takizawa K, Nakazawa Y, M D., Genet, Saotome M, Matsumoto K, Aizawa Y, Hama M, Konishi T, Nakajima I, Hazawa M, Tomita M, Koike M, Noshiro K, Tomiyama K, Obara C, Gotoh T, Ui A, Fujimori A, Nakayama F, Hanaoka F, Sugasawa K, Okayasu R, Penny A. Jeggo, Tajima K. Novel Function of HATs and HDACs in Homologous Recombination through Acetylation of Human RAD52 at Double-Strand Break Sites. PLoS Genet. 2018 Mar 28;14(3):e1007277. doi: 10.1371/journal.pgen.1007277. eCollection 2018 Mar.

2) Niida H, Matsunuma R, Horiguchi R, Uchida C, Nakazawa Y, Motegi A, Nishimoto K, Sakai S, Ohhata T, Kitagawa K, Moriwaki S, Nishitani H, Ui A, Ogi, T and Kitagawa M.Nature Communication, Nat Commun. 2017 Jul 18;8:16102. doi: 10.1038/ncomms16102. Erratum in:

3) Watanabe R, Kanno S, Mohamadi A, Ui A, Yasui A. Nucleosome remodeling, DNA repair and transcriptional regulation build negative feedback loops in cancer and cellular aging. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2017 Oct 5;372(1731). pii: 20160473. doi: 10.1098/rstb.2016.0473.

4) Ui A, Yasui A. Collaboration of MLLT1/ENL, Polycomb and ATM for transcription and genome integrity. Nucleus. 2016 Apr 25;7(2):138-45. doi: 10.1080/19491034.2016.1177681.

5) Ui A, Nagaura Y, Yasui A. Transcriptional elongation factor ENL phosphorylated by ATM recruits polycomb and switches off transcription for DSB repair. Mol Cell. 2015 May 7;58(3):468-82. doi: 10.1016/j.molcel.2015.03.023. Epub 2015 Apr 23.

6) Kato K, Nakajima K, Ui A, Muto-Terao Y, Ogiwara H, Nakada S. Fine-tuning of DNA damage-dependent ubiquitination by OTUB2 supports the DNA repair pathway choice. Mol Cell. 2014 Feb 20;53(4):617-30. doi: 10.1016/j.molcel.2014.01.030.

7) Watanabe R, Ui A, Kanno S, Ogiwara H, Nagase T, Kohno T, Yasui A.SWI/SNF factors required for cellular resistance to DNA damage include ARID1A and ARID1B and show interdependent protein stability.Cancer Res. 2014 May 1;74(9):2465-75. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-3608.

8) Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC, Yokota J, Yasui A, Kohno T. Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining. Oncogene. 2014 Mar 27;33(13):1640-8. doi: 10.1038/onc.2013.125. Epub 2013 Apr 15.

9) Lan L, Ui A, Nakajima S, Hatakeyama K, Hoshi M, Watanabe R, Janicki S, Ogiwara H, Kohno K, Kanno S, Yasui A. The ACF1 complex is required for DNA double-strand break repair in human cells. Mol Cell. 2010 Dec 22;40(6):976-87. doi: 10.1016/j.molcel.2010.12.003.