25　アセチル化ヒストンの動的変化とがん抑制シグナル制御	井倉　毅

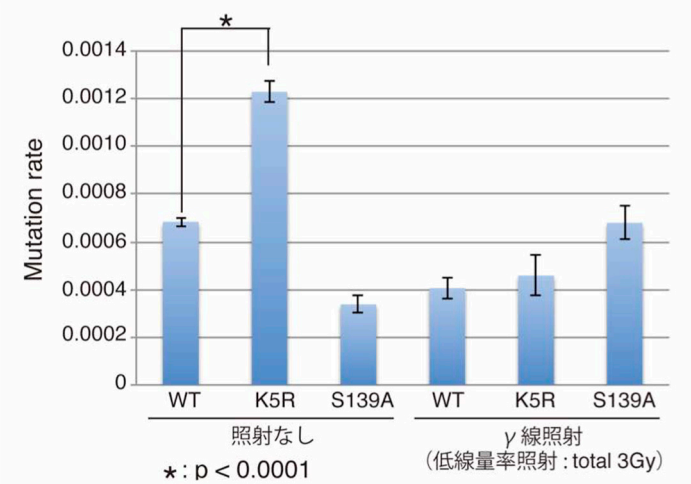
【目的】真核生物の DNA は、ヒストンタンパク質とクロマチン構造を形成している。我々は、DNA 損傷応答に関与する TIP60 ヒストンアセチル化酵素が、ヒストン H2A のバリアント H2AX をアセチル化し、クロマチンからの放出を促すことにより損傷領域のクロマチンを open に維持することを見出した。これまでヒストンは、DNA 修復因子などの DNA へのアクセスを阻害する、バリアータンパク質として認識されていたが、我々は、H2AX のクロマチンからの放出という一見、シグナル因子のような振る舞いが、active player として積極的に DNA 損傷応答反応に関与していることをこれまで明らかにしてきた。我々は、NIH3T3 細胞を用いたコロニーフォーメーションアッセイでコロニー形成能が、TIP60 をノックダウンすると高まることを明らかにしており、これらの結果は、クロマチンの動的変化を促す TIP60 による H2AX のアセチル化が、DNA 損傷応答シグナルを制御していると同時に、がん抑制シグナルとしても働いている可能性を示唆している。本研究の目的は、損傷領域のクロマチンの動的変化を制御する TIP60 による H2AX のアセチル化シグナルが、癌抑制シグナルとなる可能性を検討する。

【方法】TIP60 による H2AX のアセチル化とリン酸化酵素 ATM との関係とがん抑制シグナルとしての H2AX のアセチル化の役割について以下の方法で検討する。

1. TIP60 による H2AX のアセチル化の損傷部位への ATM の集積に対する影響をクロマチン免疫沈降法を用いて検討
2. NIH3T3 細胞における H2AX のアセチル化、リン酸化、および p53 のコロニー形成能比較実験
3. H2AX のアセチル化とリン酸化を細胞内で阻害した時の *HPRT*（ヒポキサンチン・グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ）遺伝子の変異原性解析
4. フローサイトメトリーを用いた H2AX アセチル化の DNA 損傷後のチェックポイント活性化への影響

【結果】TIP60 による H2AX のアセチル化を細胞内で阻害すると、H2AX のリン酸化を阻害した時よりもコロニー形成能が増大すること、また G1/S のチェックポイント活性化が阻害されることが明らかになった。さらに TIP60 の基質として知られているがん抑制因子 p53 にも着目し、H2AX と p53 が同一の経路でコロニー形成に作用しているのかについて検討し H2AX と p53 は、同一の経路で作用していることが示唆された。*HPRT* 遺伝子の変異原性解析の結果においても TIP60 による H2AX のアセチル化を細胞内で阻害すると *HPRT* 遺伝子の変異率が増大することが示されたが、低線量率放射線を与えた場合では、H2AX のリン酸化を阻害した時の方が、*HPRT* 遺伝子の変異率がやや増大する傾向となった。H2AX のアセチル化と ATM のリン酸化との関係については、H2AX のアセチル化を阻害するとリン酸化 ATM の DNA 損傷領域への集積が過剰になり、H2AX のアセチル化と ATM のリン酸化カスケードは、互いに補完的であることが示された。以上より、H2AX のアセチル化が、がん抑制シグナルとして働く可能性があることが示唆された。

H2AX のアセチル化とリン酸化を細胞内で阻害した時の *HPRT* 遺伝子の変異原性解析の結果



25. アセチル化ヒストンの動的変化とがん抑制シグナル制御

井倉　毅

京都大学 放射線生物研究センター

Key words : TIP60 ヒストンアセチル化酵素，アセチル化，ヒストン H2AX，p53，がん抑制シグナル

緒　言

真核生物の DNA は、ヒストンタンパク質とクロマチン構造を形成している。DNA 代謝の中でも DNA 修復研究は、がん研究と古くから密接な関わりがあり、修復因子の欠損や変異が、がん化の原因になることはすでによく知られている。また網羅的な遺伝子変異解析技術の進歩により、多くの癌細胞でクロマチン構造変換因子やヒストン蛋白質の遺伝子に変異が観察されている。我々は、DNA 損傷応答に関与する TIP60 ヒストンアセチル化酵素が、ヒストン H2A のバリアント H2AX をアセチル化し、クロマチンからの放出を促すことにより損傷領域のクロマチンを open に維持することを見出した［1〜3］。その一方で H2AX は、我々が見出したアセチル化に加え、リン酸化酵素 ATM/ATR によってリン酸化され、このリン酸化によって修復因子やチェックポイント因子が損傷部位に維持され、DNA 損傷応答シグナルを制御することが明らかになっている［4］。興味深いことに、H2AX のリン酸化は、損傷クロマチンからの放出には関与しない［1］。すなわち H2AX は、リン酸化をシグナルとする修復タンパク質の維持とアセチル化をシグナルとするクロマチン構造変換という 2 つの重要な働きを有することになる。我々は、NIH3T3 細胞を用いたコロニーフォーメーションアッセイでコロニー形成能が、TIP60 ノックダウンで高まることを明らかにしており、これらの結果は、クロマチンの動的変化を促す TIP60 による H2AX のアセチル化が、DNA 損傷応答シグナルを制御していると同時に、がん抑制シグナルとしても働いている可能性を示唆している。本研究において、損傷領域のクロマチンの動的変化を制御する TIP60 による H2AX のアセチル化シグナルが、癌抑制シグナルとなる可能性について NIH3T3 細胞を用いたコロニー形成能実験、HCT116 細胞を用いた *HPRT* 遺伝子の変異原解析、フローサイトメトリー解析を用いて H2AX のアセチル化のチェックポイント活性化への関与の有無について検討した。また既知の損傷応答リン酸化カスケードとの関係を探る目的で TIP60 による H2AX のアセチル化と DNA 損傷依存的に引き起こされる ATM のリン酸化との関係について、クロマチン免疫沈降法を用いて検討した。結果、TIP60 による H2AX のアセチル化を細胞内で阻害すると、H2AX のリン酸化を阻害した時よりもコロニー形成能が増大すること、また G1/S のチェックポイント活性化が阻害されることが明らかになった。変異原性解析の結果においても TIP60 による H2AX のアセチル化を細胞内で阻害すると *HPRT* 遺伝子の変異率が増大することが示されたが、低線量率放射線を与えた場合では、H2AX のリン酸化を阻害した時の方が、その変異率が増大する結果となった。H2AX のアセチル化と ATM のリン酸化との関係については、H2AX のアセチル化を阻害するとリン酸化 ATM の DNA 損傷領域への集積が過剰になり、H2AX のアセチル化と ATM のリン酸化カスケードは、互いに補完的であることが示された。以上より、H2AX のアセチル化が、がん抑制シグナルとして働く可能性があることが示唆された。

方法および結果

1. TIP60 による H2AX のアセチル化と ATM によるリン酸化カスケードの関係についてのクロマチン免疫沈降法（クロマチン IP）による検証

I-Sce1 による DNA 二本鎖切断を定量的に解析する DR-GFP のシステムを導入した細胞（DR-GFP 細胞）に TIP60、TIP60 アセチル化活性欠失変体である TIPM, H2AX の野生型（*H2AX WT*）H2AX のアセチル化部位の変異体（*H2AX K5R*）遺伝子をそれぞれ発現させ、I-Sce1 のアデノウイルスの感染前後で、ATM のリン酸化の抗体を用いてクロマチン IP を行った。回収した DNA を定量 PCR で解析し、損傷部位での ATM のリン酸化の濃縮の度合いを野生型と変異型細胞で比較検討した。

結果、*TIPM* および *H2AX K5R* 遺伝子を発現させた細胞において、I-Sce1 による DNA 二本鎖切断領域の ATM のリン酸化シグナルの濃縮は、*TIP60* および *H2AX WT* 遺伝子の発現細胞と比較して増大していることが明らかになった。

2. NIH3T3 細胞を用いた TIP60 による H2AX のアセチル化および H2AX のリン酸化のコロニー形成能の検討

TIP60 の基質として知られている H2AX とがん抑制因子 p53 に着目し［5］、*H2AX* の遺伝子をノックダウンおよび p53 の機能を阻害する Dominant Negative（*p53DN*）の遺伝子を NIH3T3 細胞に導入し、コロニー形成能を検討した［6］。

NIH3T3 細胞を 0.6×10^6 個/ ml で 10 cm dish に播種する。24 時間後に RNAi MAX にて siRNA を transfection する。さらに 36 時間後に 10 cm dish に 500 個／1 dish（10 cm）に播種する。8 日間培養後に、PBS wash し乾燥、100%エタノールにて固定、4%ギムザ染色後にコロニーカウントした。*p53DN* 遺伝子に関しては、Lonza にて遺伝子導入した。24 時間後に 500 個／1 dish 播種した。8 日間培養後に同様の方法で固定してコロニーカウントした。50 個以上の細胞集団を 1 つのコロニーとしてカウントした。

結果、*H2AX* ノックダウンあるいは *p53DN* 遺伝子を発現させた NIH3T3 細胞では、コントロール細胞に対して、コロニー形成能が増強することが明らかになった。*H2AX* ノックダウンの細胞に *p53DN* の遺伝子を同時に発現させても *H2AX* ノックダウンあるいは *p53DN* 単独で発現させた細胞と同様なコロニー形成能しか示さず、H2AX と p53 は、おそらく同一の経路で作用していることが示唆された。さらに *H2AX WT*、*H2AX K5R*、*H2AX S139A* を遺伝子導入し、コロニー形成能を比較した。結果、*H2AX K5R* を導入したものが最もコロニー形成能が高いという結論に達した。

3. H2AX のアセチル化とリン酸化を細胞内で阻害した時の *HPRT* 遺伝子の変異原性解析

ミスマッチ修復機構が欠失している HCT116 細胞に *H2AX WT, H2AX K5R, H2AXS139A* 遺伝子をそれぞれ発現させた細胞を樹立した。プリンサルベージ経路の酵素である *HPRT* 遺伝子に変異が生じている細胞を除外する目的でこれらの細胞をまず HAT 培地（Gibco 50xHAT Supplement 21060-017）で培養し、10 cm dish に 200 cells 播種し、これらについてコロニー形成能を調べた。それと同時にこれらの細胞を 5×10^5cells を 10 cm dish に播種し、24 時間後に 6-チオグアニン（6-TG：Sigma）を final 5 μg/ml になるように加えて 10 日間培養した。正常細胞では、*HPRT* は、6-TG を取り込んで死滅するが、*HPRT* が欠損あるいは変異が導入されて、その機能が阻害されると 6-TG を取り込むことができず、生存する。この特性を利用して変異率を求めた。変異率は、6-TG 投与後に生き残ったコロニー数／200 個播種後 の実際に形成されたコロニー数／$200\times5\times10^5$cells として算出した。

結果、*H2AX K5R* 遺伝子発現細胞の 6-TG 投与後のコロニー数が、*H2AX WT* および *H2AX S139A* 遺伝子発現細胞より多く、結果、*HPRT* 遺伝子の変異率が最も高いことが明らかになった。

4. フローサイトメトリー解析を用いたチェックポイント活性化における H2AX のアセチル化の役割

H2AX WT、*H2AX K5R* の遺伝子をそれぞれ HeLa 細胞に導入し Serum starvation によって G1／S で arrest 後にリリース、照射後に 4 時間ごとに細胞を回収し、70%エタノールで固定した。その後、PI 染色し、フローサイトメトリーで解析した。

結果、*H2AX WT* 遺伝子発現細胞でみられる放射線照射後の G1/S 期のチェックポイント活性化が、*H2AX K5R* 遺伝子発現細胞では、抑制されていることが明らかになった。

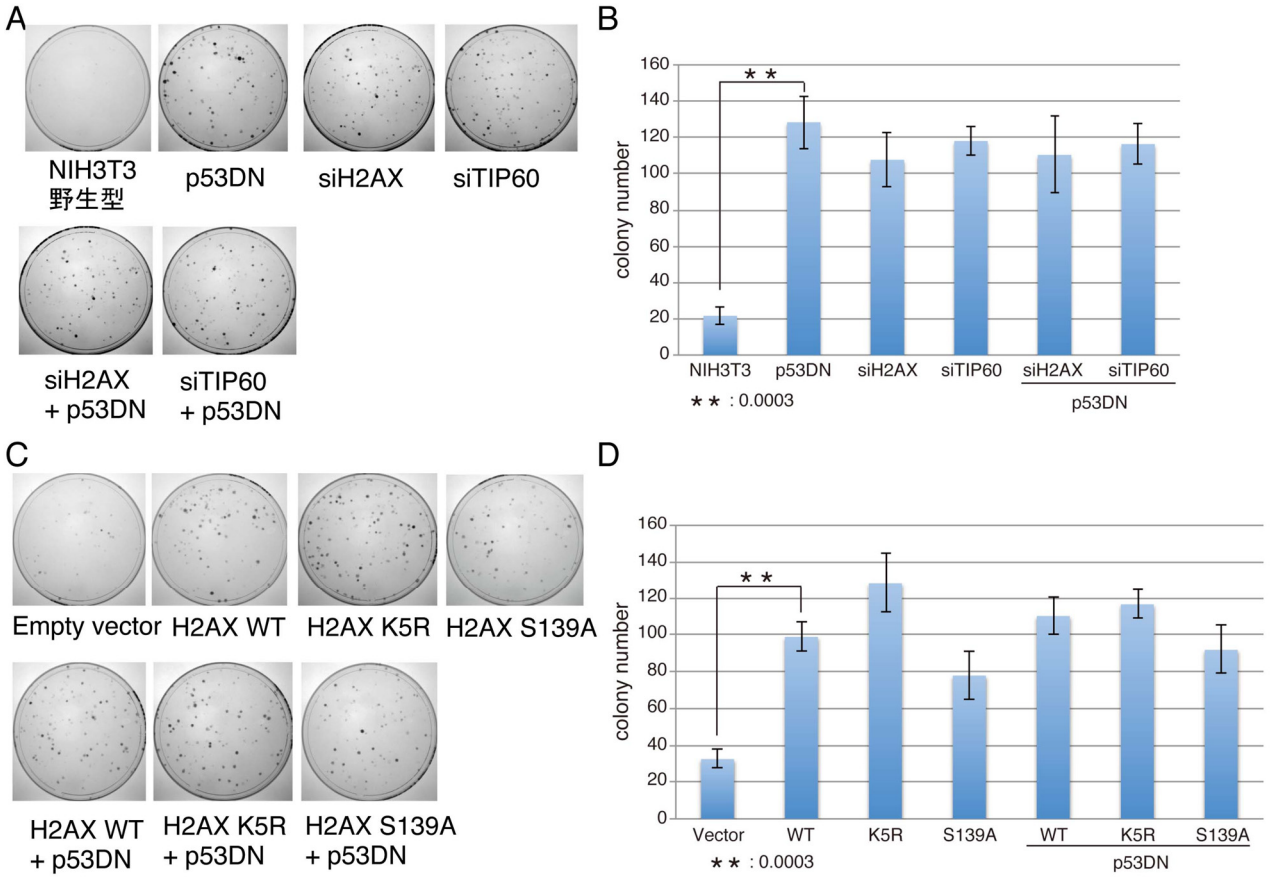


図 1. NIH3T3 細胞における H2AX のアセチル化、リン酸化、および p53DN のコロニー形成能比較実験

A）NIH3T3 細胞に *p53DN*、*siH2AX*、*siTIP60*（上段）*siH2AX+p53DN*、*siTIP60+p53DN*（下段）をそれぞれ導入し、10 日後にギムザ染色した時のコロニー形成像

B）A）のコロニー数をカウントし、定量した時の図（n = 3）、縦軸は、コロニー数を示す。＊P 値 : 0.0003（t-test）

C）NIH3T3 細胞に *H2AXWT*、*H2AX K5R*、*H2AX S139A*（上段）*H2AX WT*+*p53DN*、*H2AX K5R*+*p53DN*、*H2AX S139A+p53DN*（下段）をそれぞれ導入し、10 日後にギムザ染色した時のコロニー形成像

D）C）のコロニー数をカウントし、定量した時の図（n = 3）、縦軸は、コロニー数を示す。＊P 値 : 0.0003（t-test）

考　察

本研究課題によって、TIP60 ヒストンアセチル化酵素による H2AX のアセチル化が、細胞増殖に対して抑制的に働くことが示された。細胞内でアセチル化を阻害すると増殖が加速するばかりではなく、*HPRT* 遺伝子の変異率も亢進することから、H2AX のアセチル化が DNA の変異の蓄積を抑止し、がん抑制シグナルとして作用している可能性が高い。今後は、ヌードマウスなどを用いた個体解析を行い、実証して行く必要がある。

他のグループの研究では、TIP60 および H2AX のノックアウトマウスは、p53 に非依存的に B 細胞リンパ腫を発症することが報告されているが、今回の我々の NIH3T3 細胞を用いた実験では、TIP60 および H2AX は、p53 と同一経路で細胞増殖に対して抑制的に働いているという結果を得た。この見解の違いは、B 細胞と NIH3T3 細胞では、これら因子による蛋白質ネットワークが異なるのか、あるいは、ノックアウトとノックダウンの違いが、この相違をもたらしている可能性がある。すなわち TIP60 および H2AX のノックアウトでは、他の補完経路が活性化し、そのことが、ノックダウンの実験結果との違いを生み出している可能性がある。今後は、これらの点を検証する必要がある。

H2AX のアセチル化を阻害した細胞では、コロニー形成能が高まった。その一方で H2AX のリン酸化を阻害した細胞では、むしろ H2AX の野生型を導入した細胞に比較してコロニー形成能の低下が観察された。この理由として考えられることは、我々は、以前、H2AX のリン酸化を阻害すると H2AX のアセチル化が亢進することを見出しており[2]、このアセチル化の亢進が、コロニー形成能の低下の原因になっている可能性が高い。今回のリン酸化抑制によるコロニー形成能の低下という結果は、H2AX のアセチル化が細胞増殖に対して抑制的に働いていることと合致しており、H2AX のアセチル化が、がん抑制シグナルとしての機能があることを示唆している。

最後に、本研究提案の中で当初予定していた B 細胞を用いた c-myc／IgH の転座の頻度を PCR で検討する実験が、展開することができず、その代わりに *HPRT* 遺伝子の変異原性解析を行いました。この場を借りてお詫び申し上げます。また今回、上原記念生命科学財団にご支援頂いたことで現在、本提案に関連した論文は投稿準備中です。採択に向けてさらなる努力を続けて参りたいと思います。

共同研究者・謝辞

本研究を遂行するにあたり、京都大学大学院生命科学研究科附属放射線生物研究センター、ゲノム維持機構学分野の古谷寛治博士には、変異原解析について貴重なご意見を頂きました。また同センター、クロマチン動態制御学分野の井倉正枝博士には、研究全般の実験について多大なるサポートを頂きました。東京大学定量生命科学研究所の胡桃坂仁志博士には、ヒストンバリアントのがん抑制シグナルについて貴重なご意見を承りました。ここに感謝申し上げます。

文　献

1） Ikura T, Tashiro S, Kakino A, Shima H, Jacob N, Amunugama R, Yoder K, Izumi S, Kuraoka I, Tanaka K, Kimura H, Ikura M, Nishikubo S, Ito T, Muto A, Miyagawa K, Takeda S, Fishel R, Igarashi K, Kamiya K. DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. Mol Cell Biol. 2007 Oct;27(20）:7028-40. Epub 2007 Aug 20. PMID: 17709392

2） Ikura M, Furuya K, Matsuda S, Matsuda R, Shima H, Adachi J, Matsuda T, Shiraki T, Ikura T. 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. 2015 Dec;35(24）:4147-57. doi: 10.1128/MCB.00757-15. Epub 2015 Oct 5. PMID: 26438602

3） Ikura M, Furuya K, Fukuto A, Matsuda R, Adachi J, Matsuda T, Kakizuka A, Ikura T. Coordinated Regulation of TIP60 and Poly(ADP-Ribose） Polymerase 1 in Damaged-Chromatin Dynamics. Mol Cell Biol. 2016 May 2;36(10）:1595-607. doi: 10.1128/MCB.01085-15. Print 2016 May 15. PMID: 26976643

4） Matsuda S, Furuya K, Ikura M, Matsuda T, Ikura T. 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. 2015 Nov;54(4）:403-11. doi: 10.1007/s00411-015-0608-3. Epub 2015 Jun 19. PMID: 26088617

5） Tang Y, Luo J, Zhang W, Gu W. Tip60-dependent acetylation of p53 modulates the decision between cell-cycle arrest and apoptosis. Mol Cell. 2006 Dec 28;24(6）：827-39. PMID: 17189186

6） Arimura Y, Ikura M, Fujita R, Noda M, Kobayashi W, Horikoshi N, Sun J, Shi L, Kusakabe M, Harata M, Ohkawa Y, Tashiro S, Kimura H, Ikura T, Kurumizaka H. Cancer-associated mutations of histones H2B, H3.1 and H2A.Z.1 affect the structure and stability of the nucleosome. Nucleic Acids Res. 2018 Nov 2;46(19）:10007-10018. doi: 10.1093/nar/gky661. PMID: 30053102