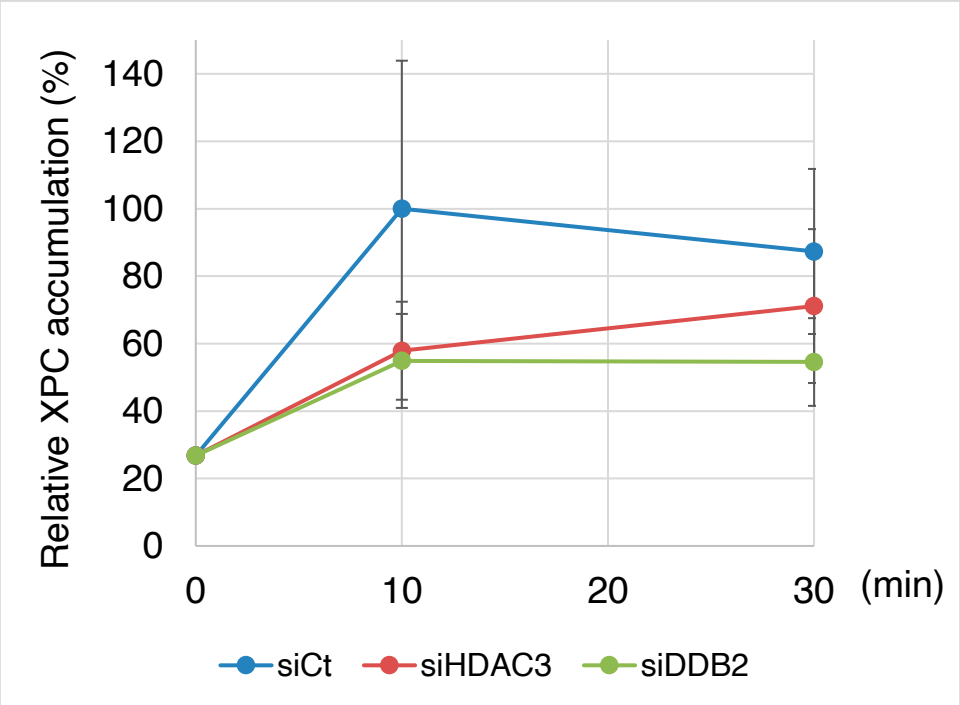
208　ヒストン脱アセチル化からNERへのアプローチ	丹伊田　浩行

【目的】生物にとり遺伝情報を担う DNA の安定性を維持することは最も重要なことである。この任務を達成するために生物は様々な DNA 損傷に対応する修復機構を発達させてきた。ヌクレオチド除去修復（NER）は最も多彩な DNA 損傷に働く修復機構である。最近の研究から NER が細胞内で効率よく働くために細胞内のクロマチン構造変換が重要であることが明らかになってきた。本研究においてクロマチンの構造に影響を与えるヒストン脱アセチル化と NER の関係を明らかにすることを目的とした。

【方法】ヒト細胞株 U2OS 細胞および HeLa 細胞を用いヒストン脱アセチル化酵素 3（HDAC3）が担う NER への影響を調べた。方法として局所紫外線照射（Local UV irradiation）した細胞内の修復タンパクを免疫染色することにより定量した。また UV に対する感受性をコロニーアッセイ法により検討した。

【結果】UV 照射によりクロマチンでヒストン H3 リジン 14（H3K14）が脱アセチル化されることがわかった。この脱アセチル化は主として HDAC3 が担うことを明らかにした。HDAC3 のシクロブタン型ピリミジン二量体（CPD）除去に関する影響を調べると NER の遂行に必要とされることが明らかにされた。HDAC3 が必要とされる NER 経路を調べると DNA 損傷の認識に必要な Xeroderma pigmentosum, complementation group C（XPC）タンパクの損傷部位への集積に関与することが示された。このため HDAC3 が欠損すると XPC の集積が阻害され NER の欠陥と紫外線感受性が出現するものと推測された。

紫外線照射による損傷部位における XPC タンパクの集積



208. ヒストン脱アセチル化から NER へのアプローチ

丹伊田　浩行

浜松医科大学 医学部 分子生物学講座

Key words：紫外線，ヌクレオチド除去修復，ヒストン脱アセチル化酵素，XPC

緒　言

我々ヒトを含め生物にとり遺伝情報を担う DNA の安定性を維持することは種を保存するために最も重要なことである。我々の生体は多くの外的・内的要因な刺激にさらされ常に DNA 損傷が誘発されている。これらの損傷を適切に修復することはガンをはじめとする遺伝的変異を原因とする疾病を防ぐために必要となる。ヌクレオチド除去修復（NER）は紫外線により DNA に生じるピリジン二量体を筆頭に DNA の立体構造の歪みを感知して損傷部位を除去修復する DNA 修復機構である［1］。NER には損傷の認識方法に二種類がある。その一つは転写が行われている DNA 鎖上に 損傷があると RNA ポリメラーゼⅡが衝突して NER を惹起する転写共役 NER（TC-NER）と呼ばれるものである［2］。もう一つの損傷認識機構は DDB1 と DDB2 からなる UV-DDB 複合体と Xeroderma pigmentosum, complementation group C (XPC) により DNA らせんの歪みが感知され修復が促進される全ゲノム NER (GG-NER) と呼ばれる［3］。最近の NER に関する研究から細胞内で NER が適切に働くためにはクロマチン構造の変換が必要とされることが明らかになってきた。筆者は紫外線（UV）照射後のチェックポイント反応の研究からヒストンアセチルトランスフェラーゼ (HAT) の一つ、HBO1 がリン酸化された後 DDB2 タンパクと結合することを明らかにした［4］。DDB2 は GG-NER において働く既知の修復因子であることから HBO1 の NER への関与を予測し、HBO1 の HAT 活性が GG-NER に必須であることを報告している［5］。HBO1 はヒストン H3 リジン 14（H3K14）を主にアセチル化する HAT であり H3K14 のアセチル化（H3K14AC）がヒストン H3K4 トリメチル化を誘引しクロマチンリモデリング因子を DNA 損傷部位へリクルートすることが示唆されている。このようにヒストン H3K14 のアセチル化と NER の関係が明らかになる一方、H3K14 脱アセチル化が NER に関与するのか否かについての報告はない。筆者は GG-NER による損傷の除去・DNA 再合成後 H3K14 の脱アセチル化が必要となるのではないかと予想し、その活性も染色体安定性に寄与するものと考えヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）と NER の関係について研究を開始した。筆者の予想に反し UV 照射後の細胞内において HDAC は NER 初期の XPC の DNA 損傷部位への集積に必要であることが明らかとなった。これまで XPC の集積に関しインヒビターを用いて検討した報告があるが筆者は RNA 干渉（siRNA）を用いて特異的な mRNA 発現抑制を行い、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC3）が UV 照射後の H3K14 の脱アセチル化に必要とされることを明らかにしたので報告する。

方　法

1. 細胞培養

ヒト U2OS 細胞、HeLa 細胞を Dulbecco's modified Eagle's medium に 10%FBS を添加し培地として培養した。

2. 抗体

次の抗体を実験に用いた。anti-HBO1 antibody（sc-13284、Santa Cruz、Dallas、TX、USA）、anti-DDB2 antibody（sc-81246、Santa Cruz）、anti-XPC antibody（sc-74410、Santa Cruz）、anti-TFIIH p89 antibody（sc-293、Santa Cruz）、anti-CSB antibody (sc-166042、Santa Cruz)、anti-CPD antibody (NMDND001、Cosmo Bio、Tokyo、Japan)、anti-acetyl-Histone H3K14 antibody（A-4023、EPIGENTEK、NY、USA）、anti-Histone H3 antibody（39763、ACTIVE MOTIF、Carlsbad、CA、USA）、anti-Chk1 antibody（sc-8408、Santa Cruz）、phospho S317 Chk1 antibody

（ab59239、Abcam、Cambridge、UK）、anti-HDAC1 antibody（sc-7872、Santa Cruz）、anti-HDAC2 antibody（sc-7899、Santa Cruz）、anti-HDAC3 antibody（sc-11417、Santa Cruz）、anti-HDAC3 antibody（ab7030、Abcam）、and anti-β-actin antibody（sc-47778、Santa Cruz）。

3. 局所的 UV 照射実験

コラーゲンコートしたカバースリップ上で培養した細胞に 8μm ポアサイズのポリカーボン製のフィルターを被せ 245 nm UV を照射した。細胞は培養後固定され実験に用いられた。

4. コロニーアッセイ法

500 細胞を直径 10 cm プラスチックディッシュに播種し 24 時間後 UV 照射を行った。37℃、CO_2インキュベーターで 10～14 日培養しメタノール：酢酸溶液で固定し、クリスタルバイオレッドでコロニーを染色した。UV 照射無しのコロニー数に対する相対コロニー数を計算し紫外線感受性を求めた。

5. CPD repair アッセイ

カバースリップ上の細胞に 15 Jm^2 UV を照射し、示された時間培養後パラフォルムアルデヒド溶液で固定した。DNA 上に残存するシクロブタン型ピリミジン二量体（CPD）を抗 CPD 抗体で免疫染色し CPD 量を定量した。

結　果

1. HDAC3 は UV 照射後のヒストン H3K14 を脱アセチル化する

UV 照射された細胞内の核ではヒストン H3K14 のアセチル化に変化が生じるのかを検討した。方法として UV 照射された核のヒストン H3K14AC を特異的抗体を用いて定量した。その結果、UV 照射により照射部位の H3K14 は脱アセチル化された（図 1）。このとき脱アセチル化を担う HDAC を同定するため、主に核に存在する HDAC1、2 および 3 をノックダウン（KD）した細胞を用いた。その結果、試験した HDAC KD 細胞の脱アセチル化は減弱したが、なかでも HDAC3 KD は最も脱アセチル化を抑制した。

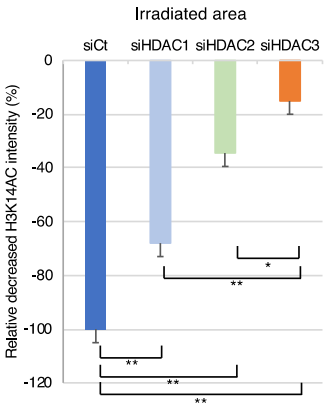


図 1. UV 照射後ヒストン H3K14 は脱アセチル化される

コントロールおよび HDAC1、2、3 KD 細胞は 50 Jm^{-2} UV 照射後 30 min で固定され特異的抗体（anti-acetyl-Histone H3K14 antibody）で免疫染色された。コントロール細胞の脱アセチル化と比較して脱アセチル化活性は定量された。*P＜0.05、**P＜0.01（Student's t-test）。

2. HDAC3 は CPD repair に必要とされ、その欠損は UV 感受性を招く

UV 照射後に照射部位の H3K14AC が脱アセチル化されたことより、脱アセチル化が正常な NER に必要とされるのか試験した。コントロールと HDAC1、2、3 および DDB2 KD 細胞に UV 照射し、24 時間までの CPD 除去修復をモニターした（図 2 左）。すると HDAC3 KD 細胞では CPD 除去に欠損を持つことが知られている DDB2 KD 細胞と共に 24 時間後においても除去修復が遅延していた。また HDAC3 KD 細胞の UV 感受性は増加していることも確認された（図 2 右）。これらの結果は HDAC3 が NER に関与し CPD 除去修復を促していることを示唆した。

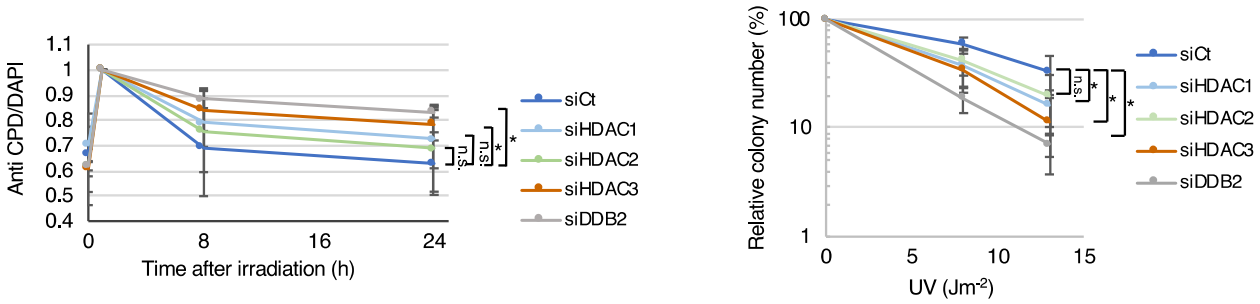


図 2. HDAC3 は CPD 除去修復に必要とされその欠損は UV 感受性を招く

（左） 15 Jm^{-2} UV 照射後、コントロール、HDAC1、2、3 および DDB2 KD 細胞の CPD 残存量は 24 時間までモニターされた。CPD は特異的抗体（anti-CPD antibody）で免疫染色された。照射後 1 時間の CPD 量に対する相対量をプロットした。*P<0.05、n.s.：not statistically significant（Student's t-test）。

（右） 0、7 および 13 Jm^{-2} UV を照射し 10 days 培養した。生存したコロニー数を 0 Jm^{-2}に対する相対値としてプロットした。*P<0.05、n.s.：not statistically significant（Student's t-test）。

3. HDAC3 は損傷部位への XPC の集積に必要とされる

HDAC3 が NER 経路のどのステップで関与するのかを既知の修復タンパクである DDB2、XPC および TFIIH の local UV した部位への集積量を定量することで明らかにした。すると DDB2 集積に HDAC3 KD は影響しなかったが XPC の集積に欠損があることが明らかとなった（図 3）。さらに下流の因子である TFIIH の集積も HDAC3 KD 細胞では低下していた（data n[illegible]）

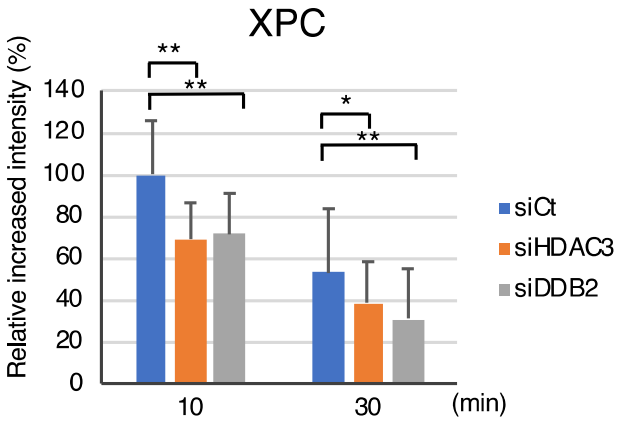


図 3. HDAC3 は損傷部位への XPC の集積に必要とされる

50 Jm^{-2} local UV 照射後、コントロール、HDAC3 および DDB2 KD 細胞の損傷部位への XPC の集積を特異的抗体（anti-XPC antibody）で免疫染色し定量した。コントロール細胞照射後 10 min の集積量に対する相対量（%）をプロットした。*P<0.05、**P<0.01、(Student's t-test)。

4. HDAC3 と HBO1 は共に損傷部位への XPC の集積を促す作用がある

ヒストン H3K14 に関し互いに相反する活性を持つ HDAC3 と HBO1 の NER に対する関係を調べるために HDAC3、HBO1 ダブル KD を行い、XPC および TFIIH の集積をそれぞれ単独の KD と比較した（図 4、data not shown）。興味深いことにダブル KD はそれぞれ単独の KD を相補しないことから、UV 照射後にクロマチン上では H3K14AC と脱 AC が起こることが XPC の集積に必要とされることがわかった。またダブル KD は HDAC3 KD と比べ XPC の集積能にさらなる低下を誘導しないことから、HDAC3 と HBO1 は共に同じ経路において機能していることが示された。

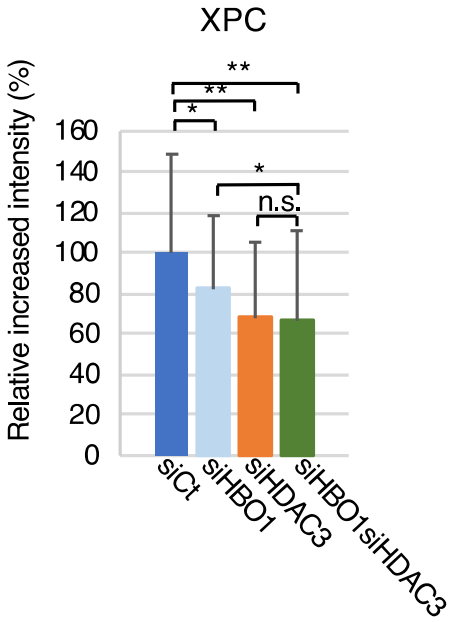


図 4. HDA34HBO1 と共に同じ経路において損傷部位への XPC の集積に機能している
50 Jm^{-2} local UV 照射後、コントロール、HBO1、HDAC3 および HDAC3 HBO1KD 細胞の損傷部位への XPC の集積を特異的抗体（anti-XPC antibody）で免疫染色し定量した。コントロール細胞照射後 30 min の集積量に対する相対量（%）をプロットした。
*P＜0.05、**P＜0.01. n.s.：not statistically significant（Student's t-test）。

考　察

UV照射によりDNA上に生じるCPDはNERにより除去修復される。細胞内においてこのシステムが機能するためにクロマチン構造が柔軟に変換する必要があることが明らかにされつつある。筆者はヒストンのアセチル化に注目し、まだよく研究されていないHDACについて検討を行った。筆者は以前ヒストンH3K14のアセチル化がGG-NERに必須であることを報告し、このヒストン修飾にはHBO1が働いていることを明らかにしている。今回この部位の脱アセチル化に注目し、いくつかのHDACを検討したところHDAC3がUV照射後に働くことを見出した。NERにおいてHDAC3はXPCの損傷部位への集積に必要とされていた。興味深いことにこの点についてはH3K14ACを行うHBO1と同じ影響を及ぼしていた。HDAC3、HBO1をダブルでKDしてもHDAC3、HBO1単独のKDを相補せず、また相乗的な欠損も示さないことから両タンパク質は共に同じ経路においてXPC集積に関与していることが示唆された。そのモデルとして筆者は次のように二つの可能性を考えている。1. XPCは非ダメージ存在下でRNA pol Ⅱと共局在していると報告されている［6］ことから、DNA損傷後HDAC3により転写活性化遺伝子のヒストンが脱アセチル化されることで転写抑制時に遊離されDNA損傷部位へリクルートされるのではないか？その損傷部位ではHBO1がヒストンのアセチル化を行いXPCのローディングを促進していることが予想される。あるいは2. XPCはヌクレオソーム内のCPDよりも裸のDNA内のCPDをよく認識する［7］ことからUVにより生じた損傷部位に効率よく集積するために非損傷部位のヒストンは脱アセチル化されタイトなヘテロクロマチン化される必要があるのかもしれない。このときHDAC3が脱アセチル化を担っていると考えられる。これらについてより詳細に検討をするために、細胞内においてXPC1分子の可視化と部位特異的にCPDを生じさせるアッセイ系の確立が必要になるであろう。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、浜松医科大学医学部分子生物学講座の北川正敏および内科学第二講座の西本幸司である。

文　献

1） Hoeijmakers JHJ. DNA Damage, Aging, and Cancer. N Engl J Med 2009;361:1475–1485. PMID:19812404

2） Lagerwerf S, Vrouwe MG, Overmeer RM, Fousteri MI, Mullenders LHF. DNA damage response and transcription. DNA Repair 2011;10:743–750. PMID:21622031

3） Spivak G. Nucleotide excision repair in humans. DNA Repair 2015;36:13–18. PMID:26388429

4） Matsunuma R, Niida H, Ohhata T, Kitagawa K, Sakai S, Uchida C, Shiotani B, Matsumoto M, Nakayama KI, Ogura H, Shiiya N, Kitagawa M. UV Damage-Induced Phosphorylation of HBO1 Triggers CRL4DDB2-Mediatedd Degradation To Regulate Cell Proliferation. Mol Cell Biol 2016;36:394–406. PMID:26572825

5） 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, Kitagawa M. Phosphorylated HBO1 at UV irradiated sites is essential for nucleotide excision repair. Nat Commun 2017;18:16102. PMID:28719581

6） Bidon B, Iltis I, Semer M, Nagy Z, Larnicol A, Cribier A, Benkirane M, Coin F, Egly JM, Le May N. XPC is an RNA polymerase II cofactor recruiting ATAC to promoters by interacting with E2F1. Nat Commun. 2018 Jul 4;9(1):2610. doi: 10.1038/s41467-018-05010-0 PMID:29973595

7） Yasuda T, Sugasawa K, Shimizu Y, Iwai S, Shiomi T, Hanaoka F. Nucleosomal structure of undamaged DNA regions suppresses the non-specific DNA binding of the XPC complex. DNA Repair (Amst). 2005 Mar 2;4(3):389-95. PMID: 15661662