

## DNA 損傷修復に関与するヒストン修飾関連因子の同定と機能解析

### [1] 組織

代表者：長瀬 隆弘

(かずさ DNA 研究所)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

分担者：

小澤 馨史 (かずさ DNA 研究所)

研究費：物件費7万3千円，旅費2万6千円

### [2] 研究経過

本研究は DNA 修復に関わる蛋白質因子を同定するために、クロマチンリモデリング因子などにタグを付けた蛋白質をヒト細胞で発現させたクローンを作製し培養細胞を用いた実験を行った。具体的には UVA レーザー照射により誘発した DNA 損傷部位へのタグ付き蛋白質の集積を指標として、DNA 修復に関連する候補蛋白質をスクリーニングしてきた。クロマチンリモデリングにはヒストンの修飾によるクロマチンの構造変化と ATP 依存的なクロマチンの移動や解離をもたらす変化がある。その中でもまず後者に属する ARID1A と ARID1B 蛋白質の修復との関係を共同研究で調べた。DNA 損傷部位に集積する候補遺伝子の中で ARID1A と ARID1B に注目した理由は、最近の癌細胞の全ゲノム配列決定で、卵巣 (明細胞) 癌の 50%、胃がんの 11%で ARID1A の変異が見つかり、これらの細胞では ARID1A の発現自体が欠損しているという事実である。これらの因子は SWI/SNF ファミリーに属するリモデリング因子で ARID1A は p53 と結合して機能制御をしていると考えられている。そこで、これらの因子が DNA 修復にも関わり合っているかを調べた。

以下、研究活動状況の概要を記す。

#### 研究打ち合わせの開催状況

平成24年3月7日 14:00-17:00 (加齢研究所)

タグ付き蛋白質は、蛋白質の N 末端側に HaloTag と呼ばれる蛋白質タグを融合させたものであり、このタグはハロアルカンと速やかに共有結合する活性を有する。蛍光団やビーズなどの機能分子をハロアルカンと結合させた様々なリガンドを用いることに

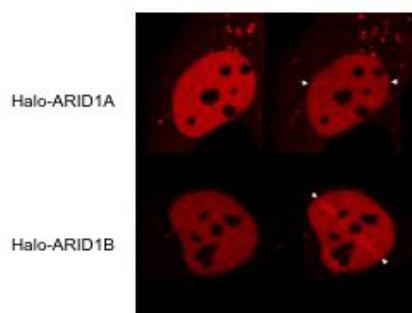
より、1つのタグ融合蛋白質コンストラクトで細胞内イメージング、同定や精製などの蛋白質機能解析が簡便に行える。培養細胞内で発現させたタグ融合蛋白質の DNA 損傷部位への集積は、TMR で蛍光標識した蛋白質を用いて行った。培養細胞内で発現させた HaloTag 融合 ARID1A と ARID1B 蛋白質をヒト U2OS 細胞で発現させ、顕微鏡のレンズを通して局所的に照射した 405 nm のレーザー光により生じた DNA 損傷への集積を観察した。

### [3] 成果

#### (3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

以下の図は、Halo-Tag 融合 ARID1A 及び ARID1B のレーザー照射域への集積を示す。集積はいずれも直ちに起き、集積の極大は照射後2分、集積は15分後も同じ程度の強さで確認出来た。



HaloTag 融合 ARID1A と ARID1B 蛋白質を高発現させた U2OS 細胞の核に、レーザーマイクロ照射を行った。Halo-ARID1A、Halo-ARID1B 共に、損傷部位に集積し、DNA 損傷修復への関与が示唆された。

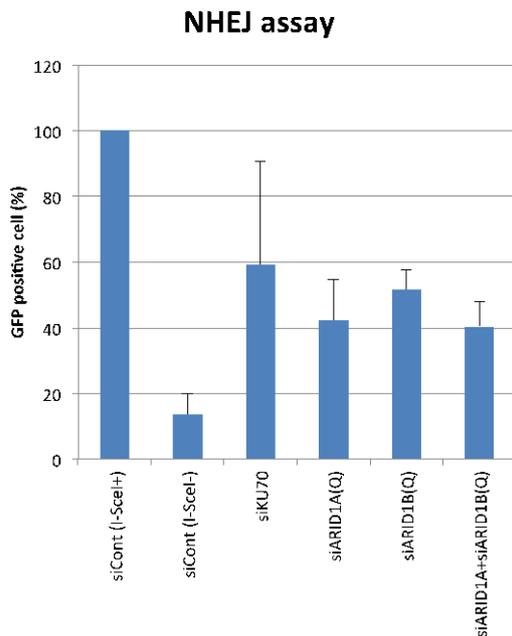
これらの結果は、ARID1A と ARID1B の双方が DNA 損傷に応答して損傷の場を集積する事を示唆している。そこで次ぎに、いずれか或は両方の遺伝子の発現を抑えたときにその細胞での DNA 二本鎖切断の非相同末端結合 (NHEJ) がどのように影響されるかを、ヒト細胞のゲノム上につらえた制限酵素部位での切断とその NHEJ による修復が起きたときに下流にある GFP 遺伝子の発現が起きる実験系 (Ogiwara et al. 2011) を用いて調べた。以下の図に示す様に、NHEJ の効率は GFP positive 細胞の%で表され、siARID1A 或は siARID1B を処

理したときの値は NHEJ に必須の KU70 蛋白質の発現を抑えたときに等しく、ARID1A と ARID1B を同時に抑えた時も同じような抑制効果であった。

への関与と発現解析を進めることにより、癌の効果的で特異的な治療法の開発につなげたいと考えている。

[4] 成果資料

本共同研究に関する研究成果について論文発表準備中である。



(3-2) 波及効果と発展性など

この報告で初めて ARID1A と ARID1B が DNA s 修復に関わっている事を示した。ここに示した実験結果は、DNA 修復の機能としては、DNA の二重鎖切斷の修復が考えられる。一方、卵巣がんや胃がん で変異が見られるのは ARID1A の方で ARID1B ではない。従って、細胞の癌化という観点では ARID1A に抑制機能が有ると考えられる。ARID1A と ARID1B 間は相同性が高く、これまで一方がないときに他方が相補すると考えられてきた。修復の機構としては、ARID1A と ARID1B が、DNA 修復の際のクロマチンリモデリングに働くと考えられる。この実験結果は、その修復の際には、ARID1A と ARID1B の両方が必要である事を示している。このことは、この研究で得られた事実を癌の治療に使う場合に有効である。もし、ARID1A のみが癌細胞で欠損をしても、その細胞は二重鎖切斷を作る処置に対して感受性となる筈である。これらのクロマチンリモデリング因子にはがん細胞で遺伝的変異が発見されているものもあるが、もっと頻繁な変化は epigenetic な発現抑制で、多くの癌細胞で頻繁に見られる。今後、他のリモデリング因子の DNA 修復