

DNA 損傷応答における TIP60 複合体のリアルタイム可視化解析

[1] 組織

代表者：井倉 毅

(京都大学放射線生物研究センター)

対応者：安井 明

(東北大学加齢医学研究所)

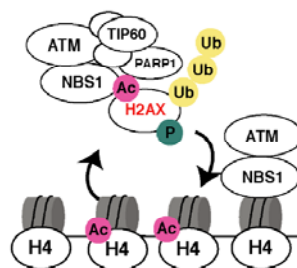
分担者：

井倉 正枝 (京都大学放射線生物研究センター)

研究費：物件費20万円

[2] 研究経過

転写、複製、修復などの DNA 代謝に伴いクロマチンは動的に変化し、これらの制御因子の DNA への結合を容易にする。DNA 損傷応答シグナルは、損傷を感知するセンサー蛋白質のクロマチンとの結合により活性化することが示されているが、損傷領域のクロマチンの動的変化の分子機構とその役割については、未だ明らかにされていない。申請者は、これまでに 1. DNA 損傷に伴い、クロマチン構成蛋白質であるヒストン H2AX がクロマチンから放出されること、2. この放出が、TIP60 ヒストンアセチル化酵素複合体により制御されることを明らかにした。次なる課題は、TIP60 ヒストンアセチル化酵素が、如何なる機構でヒストン H2AX をクロマチンからの放出を制御するのかを明らかにし、その役割と意義を明らかにすることである。申請者は、ヒストン H2AX 複合体を解析し、その構成因子として ADP-リボシル化酵素 PARP-1 を同定した。さらにこの PARP-1 が、ヒストン H2AX のクロマチンからの放出を制御していることを明らかにした。PARP-1 は、DNA 損傷に伴い損傷クロマチンに誘導され、様々な基質を ADP-リボシル化することにより損傷応答シグナルを活性化することが知られている。本課題では、TIP60 ヒストンアセチル化酵素が、ADP-リボシル化酵素、PARP-1 と如何なる連携をとりながらヒストン H2AX のクロマチンからの放出を制御しているのかを近年、その重要性が増している、生きた細胞を用いたイメージング技術を駆使して明らかにし、DNA 損傷領域におけるクロマチン構造変換機構を介した DNA 損傷応答シグナルの活性化機構の解明を目指す。



TIP60 ヒストンアセチル化酵素は、ADP-リボシル化酵素と連携してヒストン H2AX をクロマチンから放出させる。放出された H2AX は、シグナル因子のように働き、DNA 損傷のセンサー蛋白質である NBS1 や ATM と結合し、損傷部位にそれら因子を誘導、維持させる。しかしながら TIP60 がいかなる機構で PARP-1 を制御しているのかは不明である。本課題では、この点を解明する。

以下、研究活動状況の概要を記す。

我々は、TIP60 野生型および TIP60 のアセチル化変異体の遺伝子を発現させた細胞からクロマチン分画を調整し、DNA 損傷後のクロマチンと PARP-1 との結合状態を Western Blotting 法を用いて生化学的に解析し、TIP60HAT 変異体遺伝子の発現細胞では、PARP-1 と損傷クロマチンとの結合が抑制されていることを示し、TIP60 が PARP-1 のクロマチンへの結合を制御していることを明らかにしている。本研究では、安井教授のこれまで蓄積された手法を参考にし、単一細胞でのレーザー照射によるリアルタイム可視化解析系を用いて、TIP60 が PARP-1 の損傷領域でのクロマチンへの結合を制御しているか否かについて生きた細胞を用いて検討することが目的である。昨年の震災の影響により、研究のスタートがかなり遅れたのは否めないが、研究遂行にあたり実験のポイントなる損傷条件などをこれまでのこの共同研究に関連した学会（京都での RBC 国際シンポジウム、横浜での分子生物学会、平成 23 年 12 月に開催）の場で議論し、安井教授よりイメージング解析についてのアドバイスを受けた。現在も今後の研究の方向について密に連絡をとりながら研究を行っている。

[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。

まず第1に、単一細胞でのレーザー照射によるリアルタイム可視化解析系を用いて PARP-1 が損傷領域に集積することを明らかにした。

第2に、TIP60 ヒストンアセチル化酵素は、PARP-1 の DNA 損傷領域への誘導には関与せず、PARP-1 の損傷クロマチンへのダイナミックな結合活性を制御することを明らかにした。

(3-2) 波及効果と発展性など

本共同研究と関連して、昨年12月に京都で開催された第27回RBC国際シンポジウムに安井教授を招待講演者として招待し、学外研究者との交流の中でDNA損傷応答研究領域についての今後の方向性について有意義な議論を展開した。また昨年度の分子生物学会では、井倉は、安井教授とともに新学術領域のメンバーとしてワークショップをオーガナイズし、クロマチン構造に視点を置いた、転写、複製、修復のカップリング機構について活発な議論を行った。

[4] 成果資料

共同研究の成果については現在、論文を投稿準備中である。