

論文内容要旨

Reorganization of damaged chromatin by the exchange of
histone variant H2A.Z-2

(ヒストンバリエント H2A.Z-2 の交換反応による
損傷クロマチンの構造変換)

International Journal of Radiation Oncology, Biology,
Physics, 89 (4) : 736 – 744, 2014.

主指導教員：田代 聡 教授
(原爆放射線医科学研究所 細胞修復制御)

副指導教員：永田 靖 教授
(応用生命科学部門 放射線腫瘍学)

副指導教員：松浦 伸也 教授
(原爆放射線医科学研究所 放射線ゲノム疾患)

西淵 いくの

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

目的：DNA二本鎖切断（DNA double strand breaks, DSBs）の損傷応答の過程において、損傷クロマチンの構造変換は非常に重要な役割を担っている。DNA損傷応答におけるクロマチン構造変換機構として、ヒストンの翻訳後修飾やヒストン交換反応に加え、ヒストンバリエントの交換反応も重要な役割を果たしていることが近年明らかとなってきた。これまで、ヒストンH2AのバリエントであるH2A.Zは遺伝子の発現調節や染色体分離に関係しているとされてきたが、最近、出芽酵母では、H2A.ZがDNA修復に関与する可能性が示唆された。また、脊椎動物のH2A.Zには、H2A.Z-1およびH2A.Z-2という2種類のアイソフォームが存在することが新たに報告された。しかしながら、脊椎動物におけるH2A.Zの損傷クロマチンにおける役割やH2A.Zアイソフォーム各々の機能の違いについては、いまだ不明である。本研究では、DSBs誘導後のクロマチン構造変換におけるH2A.Zアイソフォームの役割について検討した。

材料と方法：細胞は、ヒト線維芽細胞（GM0637）およびニワトリB細胞株（DT40）、ヒト骨肉腫由来細胞株（U2OS）を用いた。まず、UVレーザーマイクロ照射法を用いて細胞核の一部にDSBsを誘導し、H2A.Zアイソフォームの動態はFRAPおよびinverted FRAP法を用いた生細胞実験系により解析した。GM0637にGFP-H2A.Zアイソフォームの発現ベクターを遺伝子導入し各々発現させ、核の上半分にUVレーザーによりDSBsを導入した。その後、FRAP法では、488nmレーザーを用いDNA損傷部およびコントロール部のGFPを帯状に褪色させGFPシグナル強度の回復を経時的に観察した。一方、inverted FRAP法では、DNA損傷部およびコントロール部のGFPの一部を残して褪色させ、GFP残存部のシグナル強度を経時的に解析した。引き続き、2Gy照射後のDT40細胞（野生型：WT、H2A.Z-1遺伝子破壊細胞：Z-1K/O、H2A.Z-2遺伝子破壊細胞：Z-2K/O）について、放射線照射後の相同組換え修復に関わる放射線誘発核内ドメインRAD51フォーカスの形成を免疫蛍光抗体法により比較した。さらに、コロニーアッセイ法により、DT40細胞およびU2OS細胞（野生型：WT、H2A.Z-1発現抑制細胞：Z-1K/D、H2A.Z-2発現抑制細胞：Z-2K/D）の照射後の生存率を比較検討した。

結果：GFP-H2A.Z-1発現細胞ではUVレーザーによる損傷導入部位のGFP蛍光強度の回復がわずかであるのに対し、GFP-H2A.Z-2発現細胞では顕著なGFP蛍光強度の回復することがFRAP法による解析で明らかになった。これにより、DNA損傷部でH2A.Z-2の取り込みが生じていることが示唆された。一方、inverted FRAP解析の結果、DNA損傷部のGFPシグナルはGFP-H2A.Z-1発現細胞では残存しているが、GFP-H2A.Z-2発現細胞では不明瞭となった。これは、DNA損傷部でH2A.Z-2の放出が生じていることを示唆しており、FRAPの結果と合わせると、損傷クロマチンにおいてH2A.Z-2の交換反応が起こって

いると考えられた。さらに、RAD51 フォーカスの形成は、Z-1K/O では WT と差がないのに対し、Z-2 K/O では抑制された。これにより、DNA 損傷誘導時の RAD51 フォーカスの形成は H2A.Z-2 により制御されている可能性が示唆された。DT40 細胞の 2Gy/4Gy/6Gy 照射後の生存率は、WT が 86%/43%/15%、Z-1K/O が 87%/37%/12%、Z-2K/O が 56%/29%/11% であり、Z-2K/O で照射後の生存率が低かった。また、siRNA を用いた H2A.Z-1 もしくは H2A.Z-2 の発現を抑制した U2OS 細胞の 1Gy/3Gy/5Gy 照射後の生存率は、WT が 92%/67%/41%、Z-1K/D が 90%/63%/40%、Z-2K/D が 76%/45%/28% と、U2OS においても H2A.Z-2 発現抑制細胞で照射後の生存率が低かった。これらの結果から、H2A.Z-2 の発現は放射線感受性に影響を与えることが示された。

結語：損傷クロマチンにおいて、DSBs 誘導後速やかに H2A.Z-2 の交換反応が生じていた。これは、DSBs 修復初期過程の制御に、H2A.Z-2 が関与している可能性を示唆している。さらに、H2A.Z-2 は DSBs 部位での RAD51 フォーカス形成に必要であり、正常細胞および腫瘍細胞いずれにおいても放射線感受性に影響を与えた。これらの結果から、H2A.Z-2 は放射線治療における増感剤の新たな標的となり得る可能性が示唆された。