

北里大学大学院理学研究科

平成 2 7 年度博士論文

哺乳動物細胞における DNA 損傷応答機構及び、一過的な
H2AX 安定化を介した DNA 損傷の修復機構に関する研究

熱 海 悠 子 (D S - 1 3 9 0 1)

指導教授 分子生物学 中 釜 齊

目 次

論文要旨	3
------	---

序章 緒言

第一節 本研究の背景	5
第二節 DNA 損傷応答機構	
第三節 DNA 損傷時におけるヒストン H2AX の修飾	
第四節 SIRT6/SNF2H の損傷応答への関与	
第五節 正常細胞における H2AX の減少に伴う細胞恒常性維持機構	
第六節 本研究の目的	

第一章 静止状態の正常細胞における損傷応答と修復	10
--------------------------	----

第一節 序	
第二節 静止状態の MEFs への DNA 損傷と γ H2AX foci 形成	
第三節 一過性の H2AX 発現誘導	
第四節 H2AX の一過的な発現誘導と修復	
第五節 各種 H2AX 抗体間における H2AX 誘導の評価	
第六節 考察	

第二章 H2AX の恒常的な分解と損傷後の一過的な安定化	19
------------------------------	----

第一節 序	
第二節 非損傷下における H2AX のプロテアソーム系を介した分解	

第三節	H2AX ポリユビキチン化に関与するユビキチンリガーゼの同定	
第四節	損傷依存的な H2AX 安定化への HUWE1 の関与	
第五節	考察	
第三章	ATM 依存的な H2AX 安定化機構	28
第一節	序	
第二節	DNA の損傷に依存的な H2AX 安定化への ATM の関与	
第三節	DNA 損傷に依存した H2AX 安定化への H2AX C 末領域の重要性	
第四節	考察	
第四章	損傷時における SIRT6/SNF2H 依存的な H2AX のクロマチンへの取込み	33
第一節	序	
第二節	γ H2AX foci 形成への SIRT6、SNF2H ノックダウンの影響の解析	
第三節	考察	
第五章	総合考察	37
第六章	実験材料と方法	41
謝辞		47
引用文献		48

要旨

生物の遺伝情報は DNA にコードされている。このため、放射線の照射などにより、重篤な DNA 損傷（DNA 二本鎖切断：DSBs を含む）が生じた細胞では、その生存が脅かされる。これに対し、各細胞には DNA 損傷を即座に修復する防御機構が備わっている。この過程での迅速な損傷応答機構の活性化と、修復機構の活性化には、ヒストン H2AX の Ser139 部位へのリン酸化（ γ H2AX foci の形成）が非常に重要である。一方で、最近の我々の解析から、*in vivo* 及び *in vitro* で増殖停止している正常細胞では、H2AX レベルが著しく減少していることが明らかになった。このため、H2AX を殆ど持たない細胞では、どのように DNA の損傷を修復するのか、という点に興味を持たれた。

そこでまず、H2AX を殆ど持たない静止状態の正常細胞の損傷応答を解析したところ、これらの細胞では、DNA 損傷に応答して H2AX 自体が一過的に発現上昇し、これに伴って γ H2AX foci を形成し、DSBs が修復されることが見出された。詳細に分子機構を解析した結果、損傷を受けていない状態では、合成された H2AX が、E3 リガーゼ HUWE1 によってポリユビキチン化され、これを介して常に分解され続けていること、これに対し、損傷時には ATM（損傷センサータンパク質）依存的に分解が阻害されていることが明らかになった。また、H2AX の発現上昇には ATM によるリン酸化部位 Ser139 が必須であることが分かった。さらに、H2AX の安定化はクロマチン導入を介した機構であり、クロマチン再構成因子 SNF2H と、その上流の制御因子であるサーチュインタンパク質 SIRT6 をノックダウンした背景では、損傷に応答した H2AX の安定化が阻害された。

また、HUWE1、SIRT6、SNF2H は効率よく DSBs 修復を誘導するために必要であることが見出された。

以上の結果より、DNA 損傷時には HUWE1 によるポリユビキチン化が ATM 依存的に阻害されることで H2AX が安定化し、続く SIRT6 と SNF2H を介したクロマチン導入によって効果的に γ H2AX foci を形成し、修復を誘導することが明らかになった。

序章 緒言

第一節 本研究の背景

生物の遺伝情報は DNA にコードされている。このため、重篤な DNA 損傷を受けた細胞では、その生存が脅かされる。これに対し、各細胞には DNA の損傷を即座に修復する機構が備わっている。

放射線照射などにより DNA 二本鎖切断 (DNA double-strand breaks; DSBs) が生じた際、生体には損傷を素早く修復する機能が備わっている。DSBs は非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ) や相同組み換え (homologous recombination; HR) 等の機構を介して修復されるが、これらの修復に関わる因子のリクルートには、損傷部位の付近に誘導される γ H2AX (ヒストン H2A バリエーションの一種で、DSBs 損傷部位で形成される H2AX のリン酸化フォーム) foci の形成が重要な役割を担う (Stucki and Jackson 2006, Bonner, Redon et al. 2008)。最近の我々の研究から、H2AX レベルは加齢に伴い著しく減少することが明らかになった (Atsumi, Fujimori et al. 2011)。このことは、中高年以降のヒトの臓器内に存在している殆どの細胞と、これまで損傷応答研究の対象とされてきた癌細胞株とでは、背景となる H2AX 発現レベルが全く異なることを意味している。しかしながら、H2AX を殆ど持たない正常細胞が損傷にどのように応答し、修復するのか、については不明であったため、本研究では、正常細胞における損傷応答及び修復機構の活性化機構の解明を目指した。

第二節 DNA 損傷応答機構

DSB の直後、損傷応答を上流で制御し、損傷センサータンパク質として機能する ATM が活性化し、これが損傷部位の付近にある H2AX の S139 をリン酸化することで、 γ H2AX foci が形成される(Bonner, Redon et al. 2008)。続いて、DNA 損傷メディエータータンパク質 MDC1 が γ H2AX に結合し、これを介して MRE11-RAD50-NBS1 複合体が損傷部位へリクルートされる(Stucki and Jackson 2006)。これによって ATM がさらに活性化され、 γ H2AX foci は拡大し、損傷シグナルの応答が増強される。実際、放射線照射後の数分以内に生じた γ H2AX foci は、照射後 30 分程で 30Mb までリン酸化領域が広がり、foci が拡大していく様子が、蛍光免疫染色で観察されることが知られている(Rogakou, Boon et al. 1999)。損傷部位に形成された γ H2AX foci は DNA 修復因子の誘導やクロマチン再構成に関わる因子群の足場として働くため、損傷応答機構の活性化において重要な役割を担っている(van Attikum and Gasser 2009, Pinder, Attwood et al. 2013)。

第三節 DNA 損傷時におけるヒストン H2AX の修飾

損傷応答の過程で、H2AX は S139 へのリン酸化だけでなく、K119/K120 へのモノユビキチン化(Facchino, Abdouh et al. 2010, Ismail, Andrin et al. 2010, Bentley, Corn et al. 2011, Gijjala, Nacerddine et al. 2011, Wu, Kang et al. 2011)、K13/K15 へのポリユビキチン化(Gatti, Pinato et al. 2012, Mattioli, Vissers et al. 2012)、などの修飾を受ける。これらのユビキチン化修飾は、修復因子のリクルートに関与していることが知られている。このうち、K119 又は K120 へのモノユビキチン化は、

RNF2-BMI1 によって恒常的に 5-15%の H2A で付加されており、これによって ATM の DNA 二本鎖切断部位へのリクルートが可能になる(Pinder, Attwood et al. 2013)。また、K13 又は K15 へのポリユビキチン化は、DNA 二本鎖切断部位の γ H2AX を認識した MDC1, NBS1, RNF8 に依存的に、RNF168 によって修飾されることが知られている(van Attikum and Gasser 2009)。また、RNF168 は RNF8 とともに、K63 へのポリユビキチン鎖の形成を触媒し、それを目印に BRCA1 や 53BP1 などの修復因子がリクルートされる(Doil, Mailand et al. 2009, Mattioli, Vissers et al. 2012, Fradet-Turcotte, Canny et al. 2013)。

第四節 SIRT6/SNF2H の損傷応答への関与

長寿遺伝子として知られるサーチュインファミリーの一種である SIRT6 は、老化の制御だけでなく(Jia, Su et al. 2012, Martinez-Pastor and Mostoslavsky 2012, Gertler and Cohen 2013)、DSBs の修復にも関与することが知られている(McCord, Michishita et al. 2009, Kaidi, Weinert et al. 2010, Mao, Hine et al. 2011)。SIRT6 は ISWI ファミリークロマチン再構成複合体の触媒サブユニットである SNF2H を損傷部位へリクルートし、DSBs の修復を促進する働きを持つ(Toiber, Erdel et al. 2013)。最近、SNF2H の損傷部位への誘導が γ H2AX 誘導よりも早いことが示された(Min, Jo et al. 2014)。このことは、クロマチン再構成が迅速な損傷応答と効果的な γ H2AX foci 形成に関与していることを示している。

第五節 正常細胞における H2AX の減少に伴う細胞恒常性維持機構

コアヒストン H2A には、H2AX、H2AZ、H2A.Bbd、macroH2A の 4 種類のバリエーションが存在する。そのうち、H2AX は H2A よりも C 末端が十数アミノ酸長く、ATM によるリン酸化部位 (S139) を含んでいる。H2AX は、損傷応答や修復、細胞増殖に重要な因子であるが、細胞の種類によってその発現量は大きく異なる。実際、HeLa 細胞は全 H2A のうちの 2%、ヒト神経膠腫細胞 SF268 では 20% であるのに比べ(Bonner, Redon et al. 2008)、正常細胞における H2AX 量は少なく (Lal, Pan et al. 2009, Atsumi, Fujimori et al. 2011)、特に、静止状態にある細胞では、増殖が活発な細胞に比べて H2AX タンパク質量が 100 分の 1 以下となり、殆ど検出されないレベルに至る (Atsumi, Fujimori et al. 2011)。これは、正常細胞では、がん抑制遺伝子産物 ARF と p53 依存的な静止状態が、H2AX 量の低下に伴って形成・維持されるためである。実際、正常に機能している各種臓器は、H2AX を殆ど発現していない増殖停止した細胞で構成され、その状態で安定的に細胞機能が保持されている (Atsumi, Fujimori et al. 2011)。しかしながら、H2AX は損傷応答の活性化や修復機構の活性化にも重要な役割を担うため、これらの H2AX を殆ど持たない細胞は、DNA 損傷には感受性が高い状態と考えられる。実際、この状態の細胞は過剰な増殖刺激や癌遺伝子の亢進に起因する DNA 複製ストレスや酸化ストレスによる DNA 損傷を修復できずに蓄積しがちである (Atsumi, Fujimori et al. 2011)。そして蓄積された DNA 損傷は、細胞老化の誘導要因となり、また、ゲノム不安定性導入に伴って ARF または p53 への変異が導入された場合には、細胞の形質転換の引き金となる。

第六節 本研究の目的

重篤な DNA 損傷は細胞の生存を脅かすことが知られている。様々な DNA 損傷の中で、細胞が放射線に暴露された場合は、DSBs が生じることが知られている。DSBs の修復には、 γ H2AX foci の形成を含め、損傷応答の活性化機構が重要である(Stucki and Jackson 2006, Bonner, Redon et al. 2008)。しかし、静止状態を維持している細胞では H2AX の発現レベルが低下していることから、どのように損傷応答を活性化するのか、という点に疑問が持たれた。そこで本論文では、第一章で静止状態の細胞における損傷応答、第二章と第三章では損傷応答機構の詳細なメカニズム、そして第四章でクロマチン再構成機構の関与について解析した結果をまとめている。

第一章 静止状態の正常細胞における損傷応答と修復

第一節 序

殆どの正常細胞は一定回数の分裂の後、増殖を停止し、静止状態を形成する。最近我々は、マウス胎仔腺維芽細胞（mouse embryonic fibroblasts; MEFs）を用いた研究から、MEFs は *ex vivo* 培養を始めてすぐは活発に増殖するが（初代培養 MEFs）、7 回から 8 回の継代の後に H2AX レベルの著しい減少を伴って増殖停止する（静止状態の MEFs）ことを見出した (Atsumi, Fujimori et al. 2011)。細胞は、H2AX 量が減少した状態で恒常性を維持し、ゲノム不安定性と不死化から防御される。一方で、H2AX は DNA 損傷応答や修復機構の活性化にも重要な因子であるため、静止状態の MEFs（H2AX を殆ど持たない）が DNA 損傷に応答できるのか、どのように修復を誘導するのか、疑問が持たれた。そこで本章では、静止状態の MEFs における損傷応答を、H2AX を豊富に持つ初代培養 MEFs とで比較しつつ、解析した。

第二節 静止状態の MEFs への DNA 損傷と γ H2AX foci 形成

静止状態の MEFs における DNA 損傷応答を解析するため、継代を 8 回行った増殖停止状態の MEFs へ放射線様の DNA 損傷を与える薬剤である Neocarzinostatin（以下、NCS）を 100 ng/ml で添加し、H2AX 及び γ H2AX の経時変化をウエスタンブロットで解析した。また、このとき *ex vivo* 培養を始めてすぐの初代培養 MEFs（H2AX を豊富に発現）をコントロールとして比較した。そ

の結果、静止状態の MEFs は NCS 処理後 1.5 時間で H2AX レベルの一過的な発現増加を示し、これに伴って γ H2AX もタンパク質量レベルで増加していることが分かった (Figure 1A and 1C)。

同様の実験は、蛍光免疫染色でも解析し、NCS 処理後 1 時間の静止状態 MEFs において、H2AX レベルの増加と γ H2AX foci の形成を認めた (Figure 1B)。この過程では、NCS 処理の 5 分後には H2AX と γ H2AX foci は重なって染色されたが、1 時間後には γ H2AX で染まらない部分にも H2AX が検出された。このことから、損傷に応答して増加した H2AX は、直ちに DSBs 部位に誘導され、その後核全体に広がることが分かった (Figure 1D)。

損傷後の H2AX レベルの増加は、紫外線照射 ($40 \text{ J/m}^2 \text{ UV}$:DNA 架橋を誘導) やハイドロキシウレア処理 (0.2 mM HU :DNA 複製ストレスに伴う損傷を誘導) によっても認められたが、その誘導は NCS 処理や放射線照射による DNA 二本鎖切断時と比較して非常に遅く、約 12 時間後に H2AX レベルの増加がピークに達していた (Figure 1E)。

第三節 一過性の H2AX 発現誘導

Figure 1A の結果から、損傷依存的な H2AX の増加は一過的であることが分かったが、同様の結果は、ヒト正常繊維芽細胞 WI38 や不死化形質を獲得した MEFs (不死化 MEFs) (Figure 2A, 2B)、さらに HeLa、MCF7、HCT116 などの癌細胞でも認められた (Figure 2C)。しかし、背景の H2AX 発現レベルが高い形質転換した細胞では、損傷依存的な H2AX の増加は、静止状態の MEFs ほど劇的

なものではなかった。また、HeLa 細胞を、チミジン添加によって同調させ、S 期の初期、S 期の後期-G2 期、及び G1 期の細胞（Nocodazole 処理で M 期細胞を回収した後に接着に伴って G1 期に同調したもの）を準備し、各細胞周期での損傷（NCS 処理）による影響を解析したところ、いずれの場合でも損傷依存的に H2AX の増加が認められたため、この機構は特定の細胞周期に依存したものではないことが分かった（Figure 2D）。

第四節 H2AX の一過的な発現誘導と修復

一過的に発現レベルが上昇した H2AX は γ H2AX foci の形成を誘導することが、第三節までの解析から明らかになった。そこで次に、この γ H2AX foci 形成によって DSBs の修復が誘導されるかどうかについて検証した。

まず始めに、増加した H2AX が存在する分画を調べたところ、これらはコアヒストンの H3 と同じクロマチン分画で検出され、安定にクロマチンに導入されて存在していることが示唆された（Figure 3A）。

続いて、修復能力を調べるために、コメット解析を行った。初代培養 MEFs と静止状態の MEFs に対し、NCS 処理によって DSBs を誘導したところ、どちらの状態の細胞も損傷の 1 時間後には DNA 鎖の切断に伴って尾を引く様子が観察できたが、これらのコメットの尾は静止状態の MEFs でさえも約 6 時間後には消失していた。このことは、修復が誘導されたことを示唆している（Figure 3B）。また、蛍光免疫染色による γ H2AX foci の観察によっても、DSBs に伴う γ H2AX foci が、6 時間程度で殆ど減退していることが見出された。これらのことから、H2AX

を殆ど発現していない静止状態の細胞においてさえ、一過的な H2AX 発現に伴って、DSBs が修復されることが示唆された (Figure 3C)。

第五節 各種 H2AX 抗体間における H2AX 誘導の評価

これまでの先行研究では、DSB 損傷を受けた場合でも H2AX の発現レベルには変化が認められてこなかった。その一因として、これまでの研究では、主に形質転換した細胞が用いられてきたため、背景の H2AX 発現レベルが高く、変化を見辛いという点が挙げられる。しかし、その他にも原因があるのではないかと考え、複数の H2AX 抗体を用意し、H2AX の認識能を評価することとした。

本研究では主に Bethyl laboratories 社製の A300-082A を用いて H2AX を検出しているが、ここではその他に Bethyl 社製抗体の異なる 2 種類のロットである IHC-00008 と A300-083A、そして abcam 社の ab11175 と ab10475 について検証した。まず始めに、これらの抗体が H2AX を特異的に認識しているかどうかを検証するために、H2AX のノックダウン及び、過剰発現を行った HeLa 細胞でウェスタンブロットを行い、各抗体で検出した。その結果、A300-082A, IHC-00008, A300-083A, ab11175 では H2AX の発現に特異的な認識が確認されたが、ab10475 は H2AX に対する特異性が低いことが分かった (Figure 4A)。さらに、損傷に対する H2AX の一過的な発現について、静止状態の MEFs を用いて検証したところ、A300-083A 及び ab11175 では DSBs 依存的な H2AX の安定化が認められなかった (Figure 4B)。そこで、これらの抗体が、リン酸化された状態の H2AX を H2AX として認識できないのではないかと考え、脱リン酸化処理を試みた。

NCS 処理前後の HeLa 細胞でウェスタンブロットを行い、転写後のメンブレンを脱リン酸化処理した後に各種抗体で検出を行った。その結果、A300-083A と ab11175 の両方で損傷依存的な H2AX の一過的な増加を検出することができた (Figure 4C)。これらのことから、損傷に依存した H2AX の一過的な発現の解析には、抗体の認識特異性に注意することが重要であることが分かった。

第六節 考察

本章では、H2AX を殆ど持たない静止状態の細胞では、どのように DNA 損傷応答が活性化されているのか、という点を明らかにすることを目的とした。静止状態の MEFs と初代培養 MEFs は H2AX レベルに 100 倍程度の差があるが、どちらも形質転換していない正常細胞である。この 2 状態の正常細胞に対する DNA 損傷応答の解析から、細胞には、損傷に応答して一過的に H2AX を発現させる機構があることが明らかになった。この H2AX 誘導は、 γ H2AX foci の形成を可能にしており、これによって DSBs の修復も誘導されることが示唆された。また、同様の機構は MEFs だけではなく、ヒト正常細胞、そして不死化 MEFs や癌細胞などの形質転換した細胞にも備わっていることが明らかになった。

一方で、NCS 処理による DSBs への応答とは異なり、紫外線照射やハイドロキシウレアによる DNA 損傷では、迅速で一過的な H2AX の増加は認められなかった。このことは、本章で見出された機構が、DSBs を誘導するような重篤な DNA 損傷に依存的に誘導されるためと考えられる。

Figure 1

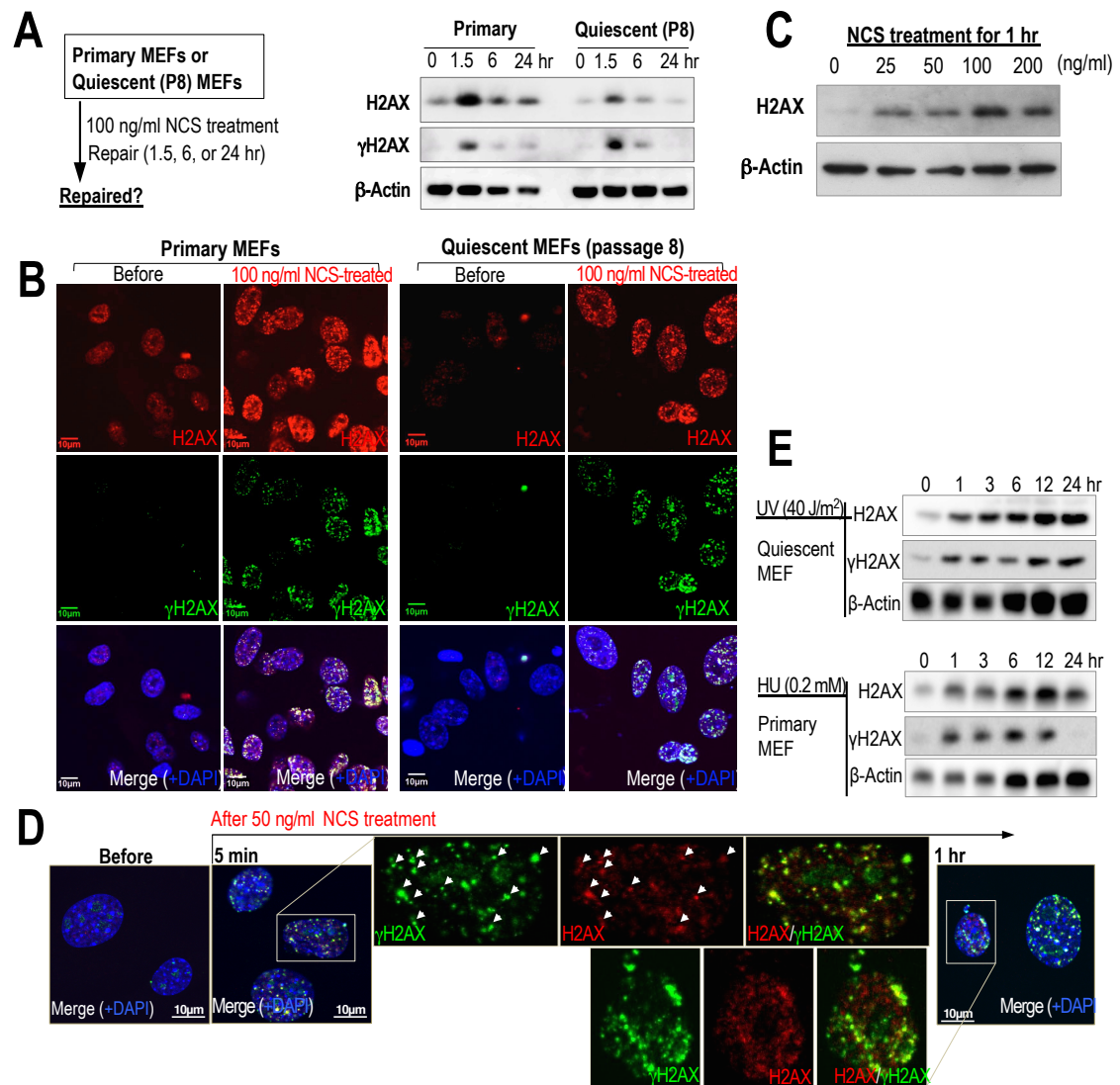


Figure 1. DSBsによるH2AXの安定化はγH2AX fociの形成を誘導する。

- (A) 静止状態のMEFsにおけるH2AXとγH2AXの応答。初代培養MEFs (Primary)と静止状態のMEFs (Quiescent)に100ng/mlでNCS処理を行い、損傷の1.5時間、6時間、24時間後のH2AXとγH2AXの経時変化をウエスタンブロットで解析した。いずれのMEFsも、H2AXの一過的な増加とそれに伴うγH2AXシグナルの増加を示した。
- (B) H2AXの安定化を介したγH2AX fociの形成。初代培養MEFsと静止状態のMEFsにおける100ng/ml NCS処理前及び、損傷1時間後のH2AXとγH2AX fociの状態を蛍光免疫染色により比較した。静止状態のMEFsは、劇的なH2AXの増加を伴って、γH2AX fociを形成した。スケールバーは10 μmを示している。
- (C) 静止状態のMEFsにおけるNCSの濃度依存的なH2AXの安定化。静止状態のMEFsへ表示の濃度でNCSを添加し、1時間後のH2AX量をウエスタンブロットで解析した。H2AXの安定化は、NCSの濃度依存的に増加していた。
- (D) H2AXの安定化は初期にはDSBs部位に限局する。損傷の5分後におけるH2AXとγH2AX fociの状態を蛍光免疫染色し、その1時間後の状態と比較した。白色の矢尻はH2AXとγH2AXが重なる部分を指している。5分後にγH2AX fociと重なって染色されたH2AXは、1時間後には核全体に広がっていた。スケールバーは10 μmを示している。
- (E) UV照射 (40 J/m²)とハイドロキウレア (0.2 mM) による損傷に対するH2AXの安定化。静止状態のMEFsへのUV照射及び、初代培養MEFsへのハイドロキウレア処理によるH2AXとγH2AXの経時変化をウエスタンブロットで解析した。NCS処理によるDSBsの形成とは異なり、H2AXの迅速な安定化は認められなかった。

Figure 2

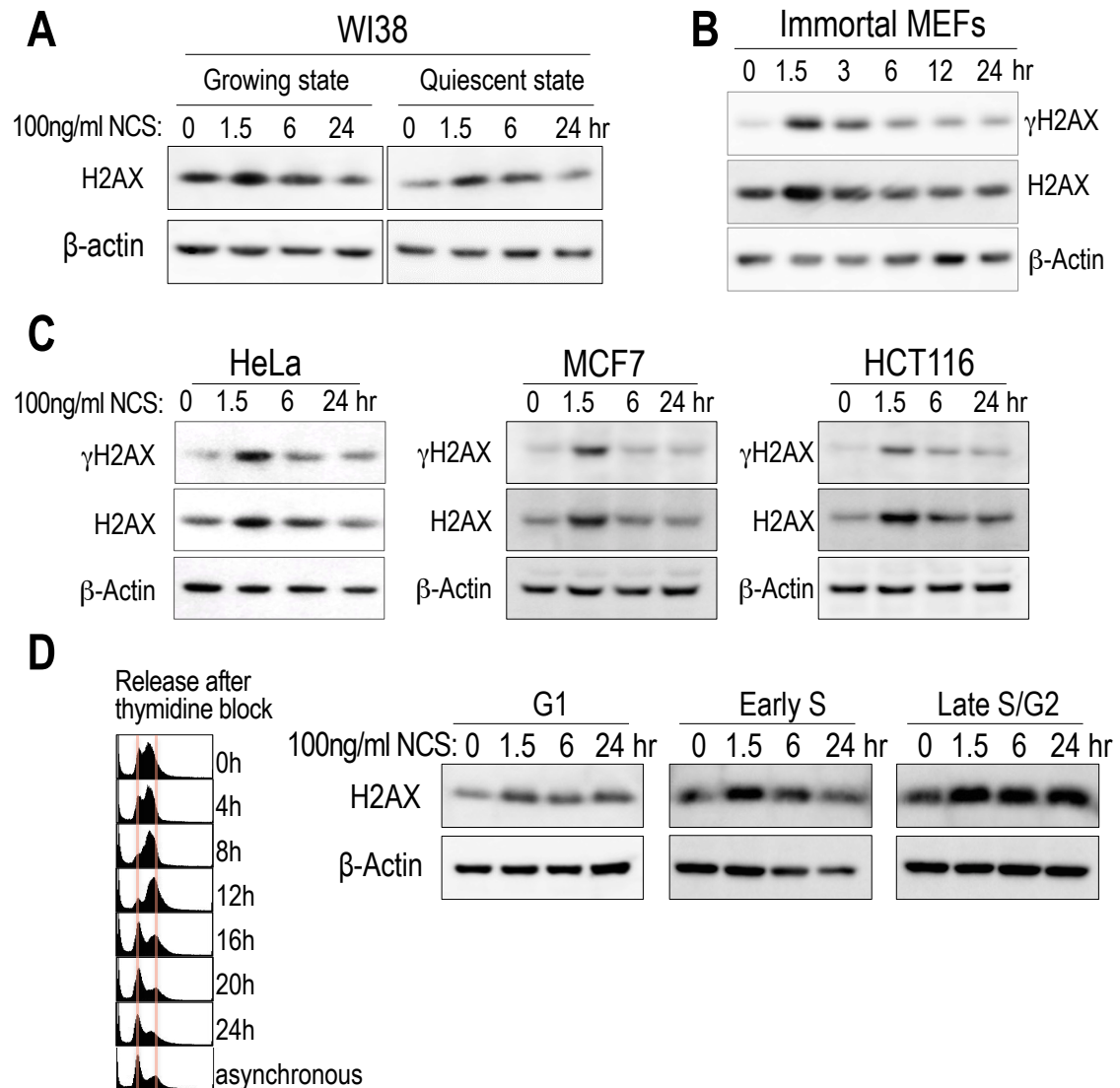


Figure 2. DSBsに反応したH2AXの一過的な安定化は、様々な細胞で共通した現象である。

- (A) WI38におけるH2AXの安定化。増殖期にあるWI38と増殖停止したWI38に対して、100 ng/ml NCS処理を行い、H2AXの経時変化をウエスタンブロットにより解析した。MEFsと同様に、ヒト正常細胞も、DSBsに反応した一過的なH2AXの安定化を示した。
- (B, C) 形質転換した細胞におけるH2AXの安定化。不死化MEFs、HeLa、MCF7、HCT116に対して、100 ng/ml NCS処理を行い、H2AXとγH2AXの経時変化をウエスタンブロットで解析した。これらの細胞では背景のH2AXレベルが高いものの、DSBsに反応したH2AXの安定化が認められた。
- (D) 異なる細胞周期にある細胞におけるH2AXの安定化。HeLaをチミジンブロックによって同調し、G1期、S期初期、S/G2期後期の段階で、それぞれ100 ng/ml NCS処理を行い、H2AXの経時変化をウエスタンブロットにより解析した。細胞周期のどの段階にあっても、DSBsに反応したH2AXの安定化が認められた。

Figure 3

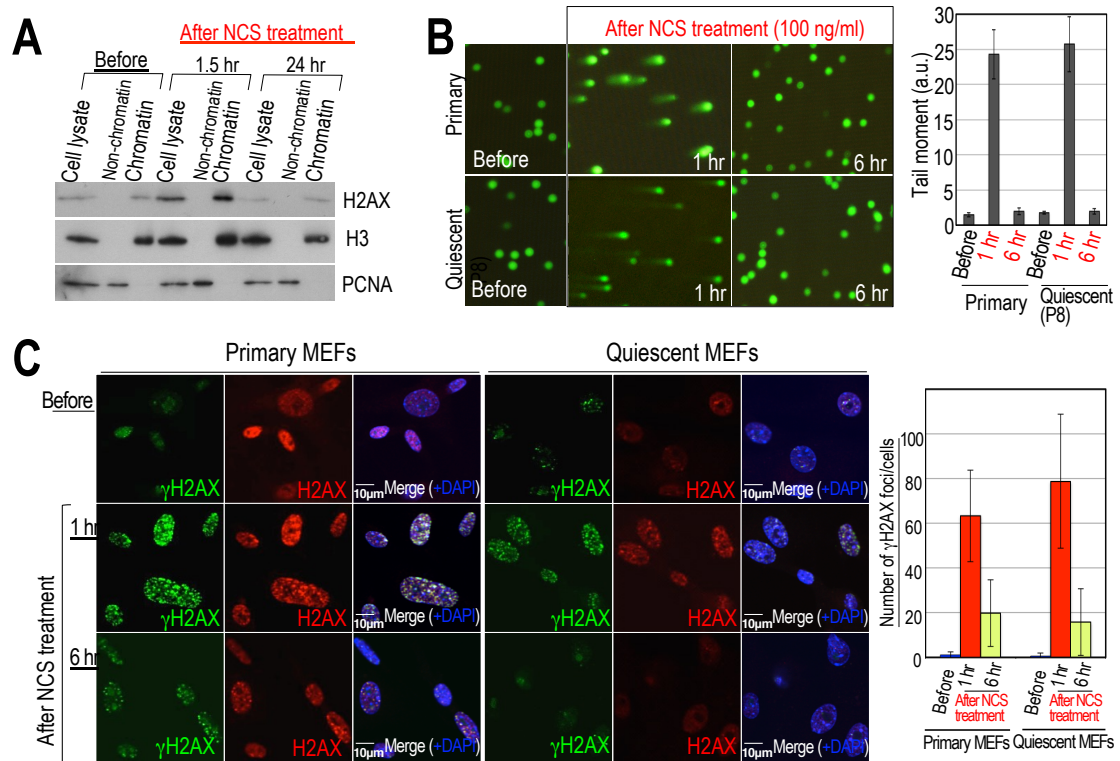


Figure 3. 静止状態のMEFsにおけるDSBsは一過的なH2AX安定化によって修復される。

- (A) H2AXの安定化とクロマチン導入。100 ng/ml NCS処理後1.5時間、24時間の静止状態のMEFsをクロマチン分画とそれ以外の分画に分け、H2AXの局在を解析した。クロマチン分画のマーカーとしてコアヒストンH3、そしてそれ以外の分画のマーカーとしてPCNAを共に検出した。損傷後に安定化したH2AXはH3と同じクロマチン分画で検出された。
- (B) 静止状態のMEFsにおける一過的なH2AXの安定化に伴うDSBsの修復。初代培養MEFsと静止状態のMEFsにおける、DNA損傷の修復状態をコメット解析により解析した。損傷の1時間後にはコメットの尾が認められるが、これらは6時間後には消失していた。右のグラフは、コメットの尾の数を定量化したものであり、エラーバーは± SD値を示している。
- (C) 一過的なH2AXの安定化を伴うγH2AX fociの消失。(B)と同様の実験を実施し、蛍光免疫染色によりγH2AX fociの消失を解析した。コメット解析の結果と同様に、NCS処理の6時間後にはH2AXの減少に伴って、大部分のγH2AX fociは消失していた。スケールバーは10 μmを示す。右のグラフは、100個の細胞でγH2AXのfociを計測し、定量化したものであり、エラーバーは± SD値を示している。

Figure 4

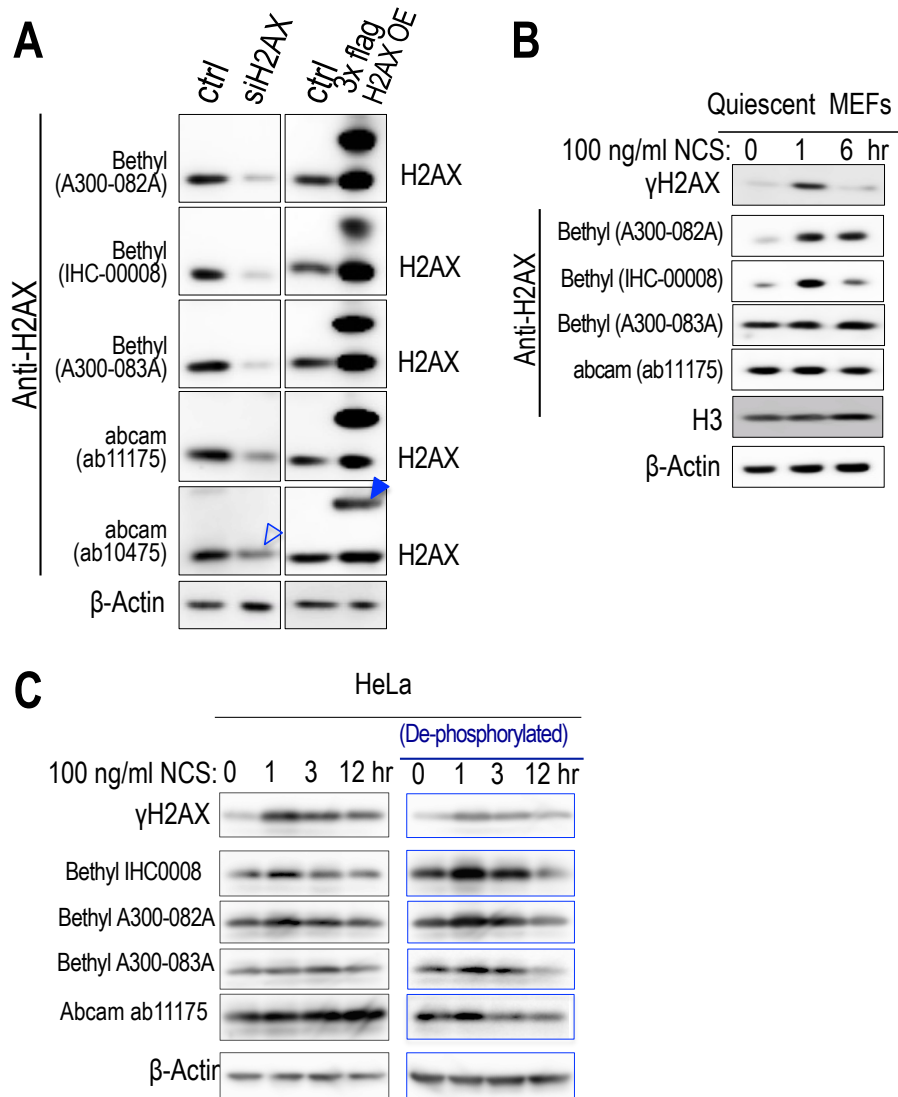


Figure 4. いくつかの市販H2AX抗体では、DSBs依存的なH2AXの安定化を検出することができない。

(A) ノックダウン及び、強制発現されたH2AXの検出。siH2AXあるいは、3x flag H2AXを強制発現したHeLa細胞におけるH2AX量をウエスタンブロットし、表記の抗体でそれぞれ検出した。コントロールには、それぞれコントロールsiRNAあるいは空のベクターをトランスフェクションしている。ab10475を除いて、H2AX量は正しく反映されていた。

(B) DSBsに依存して一過的に安定化するH2AXの検出。静止状態のMEFsへ100 ng/ml NCS処理を行い、表記のH2AX抗体を用いて、一過的なH2AXの安定化を検出した。H3はヒストンのコントロールとして、γH2AXはDSBsレベルを示すマーカーとして共に検出した。A300-083A、ab11175ではDSBsに依存したH2AXの安定化が認められなかった。

(C) メンブレンの脱リン酸化処理による高原認識能への効果の解析。100 ng/ml NCS処理後のHeLa細胞で通常通りにウエスタンブロットし、転写後のメンブレン上で脱リン酸化反応を行ったのちに、各種一次抗体で抗体反応を行った。同一サンプルに対して脱リン酸化処理なし(左側黒枠)、脱リン酸化処理あり(右側青枠)で比較している。すべてのH2AX抗体で、DSBsに伴うH2AXの安定化が認められた。

第二章 H2AX の恒常的な分解と損傷後の一過的な安定化

第一節 序

第一章の結果より、静止状態の MEFs でも、DNA 損傷に応答して一過的に H2AX を発現誘導し、これに伴った修復能の活性化機構を有していることが示された。H2AX の発現レベルの上昇は非常に早く、少なくとも 5 分以内には誘導が認められた (Figure 1D)。このため、どのような機構によって、この迅速な発現誘導が可能になっているのか、という点に次の疑問が生じた。そこでまず、mRNA レベルでの発現誘導を解析した。しかしながら、H2AX の mRNA 発現量の変化は、損傷の前後で殆ど認められなかった (右図)。これは、損傷に応答して p53 依存的に発現上昇する miR34a (Chang, Wentzel et al. 2007, Raver-Shapira, Marciano et al. 2007) とは対比的であった。

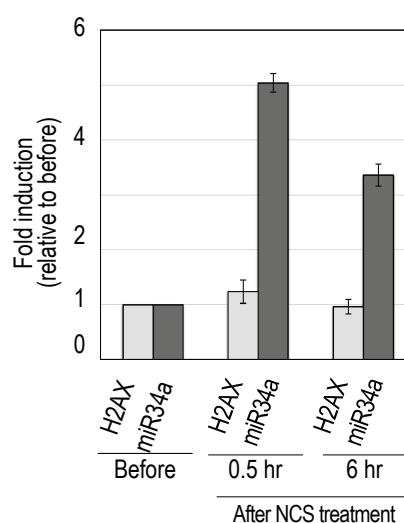


図. 静止状態のMEFsへの損傷の前後におけるH2AXのmRNAの定量。H2AXのmRNAを、miR34aの転写量と比較した。損傷前を基準とした時のH2AXの転写量を解析した結果、損傷の前後でmRNAレベルでの発現量の変化は認められなかった。miR34a(DSBsに反応してp53の下流で発現上昇)は、損傷応答のポジティブコントロールとして用いた。

そこで本章では、「プロテアソーム系を介した恒常的な H2AX の分解と、損傷依存的な一時停止」が関与しているのではないかと仮説を考え、この点を検証することとした。これは、「酸化ストレスに反応して迅速にタンパク質レベルで増加することの知られる Nrf2 の誘導機構(Kobayashi, Kang et al. 2004)」に基づいて着想された仮説である。

第二節 非損傷下における H2AX のプロテアソーム系を介した分解

プロテアソーム系を介したタンパク質の分解では、標的タンパク質は特異的な E3 ユビキチンリガーゼによってポリユビキチン化修飾を付加された後に分解される。本章ではまず、非損傷下における H2AX 分解の有無を検証するため、プロテアソーム阻害剤である MG132 を静止状態の MEFs に添加し、その影響を検証した。MG132 処理後、1.5 時間後からポリユビキチン化と思われるバンドが検出され（赤色矢印）、また、15 kDa 付近には未修飾の H2AX の蓄積が認められた（Figure 5A 左）。MG132 を添加して 12 時間後には、H2AX 量は未処理時の 60 倍以上蓄積していた。MG132 処理によって認められる高分子量のバンドは、H2AX 抗体だけでなくユビキチン抗体で免疫沈降した場合にも検出されたことから、ポリユビキチン化 H2AX であることが示唆された（Figure 5B）。また、E1 ユビキチン活性化酵素阻害剤 PYR-41 の添加によって、モノユビキチン化 H2AX の蓄積が認められた（Figure 5A 右）。

以上の結果から、H2AX は常に合成されているが、通常時（損傷を受けていない状態）には、直ちにポリユビキチン化修飾を受け、分解されていることが分かった。また、静止状態の MEFs 程顕著ではないものの、不死化 MEFs と HeLa 細胞でも、MG132 や PYR-41 処理によるポリユビキチン化 H2AX、モノユビキチン化 H2AX 及び、未修飾の H2AX の蓄積が認められた（Figure 5C, 5D）。これらのことから、非損傷下における H2AX の分解は、静止状態の細胞だけでなく、癌細胞などの H2AX を豊富に発現する細胞においても起こっている事象であることが明らかになった。

また、DNA 損傷によるポリユビキチン化付加機構への影響を、静止状態の MEFs を用いて解析したところ、非損傷下では MG132 の添加に伴ってポリユビキチン化 H2AX が増加するのに対し、NCS を同時に処理した場合には、MG132 の影響を全く受けなくなることが分かった (Figure 5E)。このことから、非損傷下における恒常的な H2AX のポリユビキチン化とプロテアソーム系を介した分解は、DNA 損傷依存的に阻害され、これによって、一過的に H2AX の安定化が誘導されることが示唆された。

第三節 H2AX のポリユビキチン化に関与するユビキチンリガーゼの同定

第二節から、H2AX は通常状態においてポリユビキチン化修飾を受けていることが明らかになった。そこで次に、H2AX のポリユビキチン化に対する責任因子を同定することを目的とし、プロテオーム解析を実施した。

まず、HeLa 細胞を 0.5 % NP-40 を含む細胞溶解液でクロマチン分画とそれ以外の分画とに分け、上清分画で H2AX 抗体を用いた免疫沈降を行い、ポリユビキチン化 H2AX を回収した (Figure 6A)。調製した免疫沈降サンプルは、国立がん研究センター研究所内の尾野先生のもとで 2DICAL 法 (2 Dimensional Image Concerted Analysis of LCMS) (Ono, Shitashige et al. 2006, Fukawa, Ono et al. 2012) を用いて解析し、ポリユビキチン化 H2AX と結合しているタンパク質を網羅的に検出した。ネガティブコントロールとして、Non immune-IgG (NC-IgG) による沈降も行い、NC-IgG と比較して 2 倍以上強いシグナルを示すタンパク質を選出したところ、1,717 個の候補物質が得られた。そのうちタンパク質にポリユビ

キチン鎖を付加する E3 ユビキチンリガーゼは9個見つかり、その中でも HUWE1 (別名 Arf-BP1, Mule, Lasu1) は特に強いシグナルを示し、HUWE1 抗体による共免疫沈降でもポリユビキチン化 H2AX が検出されたため、本研究では HUWE1 によるポリユビキチン化に着目してさらなる解析を進めることとした (Figure 6B, 6C)。

第四節 損傷依存的な H2AX 安定化への HUWE1 の関与

HUWE1 の H2AX 安定化への関与を調べるため、ノックダウン実験を実施した。3種類の siRNA を 72 時間トランスフェクションし、HUWE1 のノックダウンを確認したところ、非損傷時の細胞でも H2AX レベルの上昇が認められた。この中で、#1 の siRNA 配列によるノックダウン効率が最も良好であったことから、以降の実験は#1 の siRNA を用いて実施した (Figure 7A)。また、H2AX レベルの上昇は、HUWE1 のノックダウン効率を反映していた (Figure 7B)。

ここまでの解析から、非損傷下において H2AX が HUWE1 を介して分解されていることが明らかになってきた。そこで次に、H2AX-HUWE1 間の相互作用について、DNA 損傷の前後での変化の有無を調べるため、免疫沈降を実施した。その結果、非損傷時には HUWE1 はポリユビキチン化 H2AX と相互作用しているが、DNA 損傷後には解離していることが分かった (Figure 7C)。

続いて、HUWE1 の DSBs 修復への関与を調べるために、HUWE1 をノックダウンした HeLa 細胞へ放射線を照射し、DSBs 修復の責任因子の一つである 53BP1 とともに、蛍光免疫染色で γ H2AX foci を観察した。その結果、放射線照

射の 1.5 時間後に形成される γ H2AX foci の数にはコントロールと殆ど差が認められないが、その後の γ H2AX foci の消失速度は、HUWE1 をノックダウンすることによって大きく遅延することが分かった (Figure 7D)。同様の結果は、ウェスタンブロットの結果からも確認された (Figure 7E)。また、損傷依存的な H2AX の安定化は、HUWE1 をノックダウンした背景では認められなかった。これらの結果より、DNA 損傷時の H2AX の安定化は HUWE1 に依存的であり、これは効率的な DSBs の修復に必須であることが示唆された。

第五節 考察

本章の解析から、H2AX は非損傷時にも恒常的にタンパク合成されており、これは通常状態では HUWE1 によってポリユビキチン化され、プロテアソーム系によって分解を受けていること、そして DNA に損傷が生じた場合には、その分解経路が停止することによって H2AX が一過的に誘導されること、が明らかになった。

HUWE1 をノックダウンした場合には、損傷依存的な H2AX の安定化は認められないが、その一方で γ H2AX foci の形成は認められた。この理由としていくつかの可能性が挙げられる。一つには、 γ H2AX foci の形成自体には、新規にクロマチンへ取り込まれる H2AX は必須ではなく、HUWE1 のノックダウンにより H2AX レベルが上昇した背景では、既に多くの H2AX がクロマチン内に存在するため、これらがリン酸化を受けて γ H2AX foci を形成することができた、との可能性が挙げられる。ただしこの場合でも、その後の γ H2AX foci の消失が遅延

していたことから、DSB 修復を効率良く誘導するためには新規にクロマチンへ取り込まれる H2AX が必要であると考えられる。二つ目の可能性として、プロテオーム解析から、HUWE1 以外にも、8 種類の E3 ユビキチンリガーゼがポリユビキチン化 H2AX と共沈されてきたことから、この状態の H2AX のポリユビキチン化にはリダンダンシーがあり、損傷依存的な H2AX の安定化がある程度補完されていた可能性が挙げられる。この可能性については、現在も検証実験を遂行中である。

Figure 5

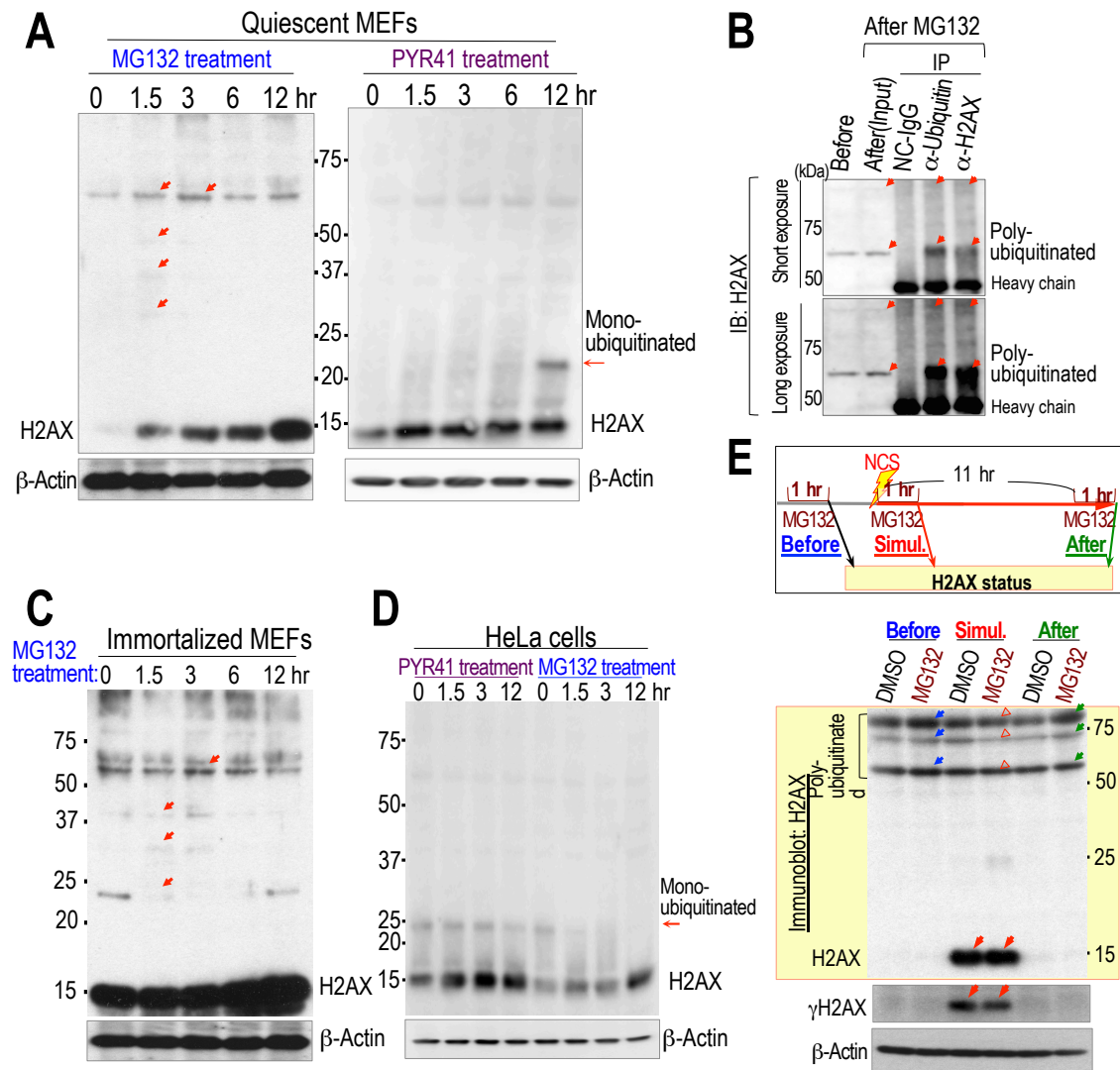


Figure 5. 非損傷下におけるH2AXのプロテアソーム系を介した分解は損傷依存的に一過的に停止する。

- (A) MG132とPYR41処理に伴うH2AXの蓄積。静止状態のMEFsに対し、プロテアソーム阻害剤MG132 (2 μ M) 又は、E1ユビキチンリガーゼ阻害剤PYR41 (10 μ M) を処理し、H2AXの経時変化をウェスタンブロットにより解析した。赤色の矢印で示すように、阻害剤の添加後には高分子量にバンドが検出され、それに伴って未修飾H2AXの蓄積が認められた。
- (B) ポリユビキチン化H2AXの検証。静止状態のMEFsで高分子量に検出されたバンドは、ユビキチン抗体とH2AX抗体を用いた免疫沈降により、ポリユビキチン化H2AXであることが示された。上図と下図は同一メンブレンの異なる露光時間で検出したイメージを示している。
- (C, D) 形質転換後の細胞への阻害剤処理によるポリユビキチン化H2AXの蓄積。(A)と同様の実験を不死化MEFs(C)とHeLa(D)で実施した。赤の矢印は、ユビキチン化修飾を受けたH2AXを指している。
- (E) DSBsに応答したH2AX分解経路の一過的な停止。静止状態のMEFsに対し、損傷前(Before)、損傷直後(Simul.)、損傷の1時間後(After)のH2AXを、各段階ごとに1時間の2 μ M MG132あるいはDMSOの前処理を行い、ポリユビキチン化H2AXの蓄積を解析した。100 ng/ml NCS処理による損傷前と損傷の1時間後ではMG132によるポリユビキチン化H2AXの蓄積が認められたが、損傷直後では、ポリユビキチン化バンドの蓄積が認められなかった(赤色の矢尻)。

Figure 6

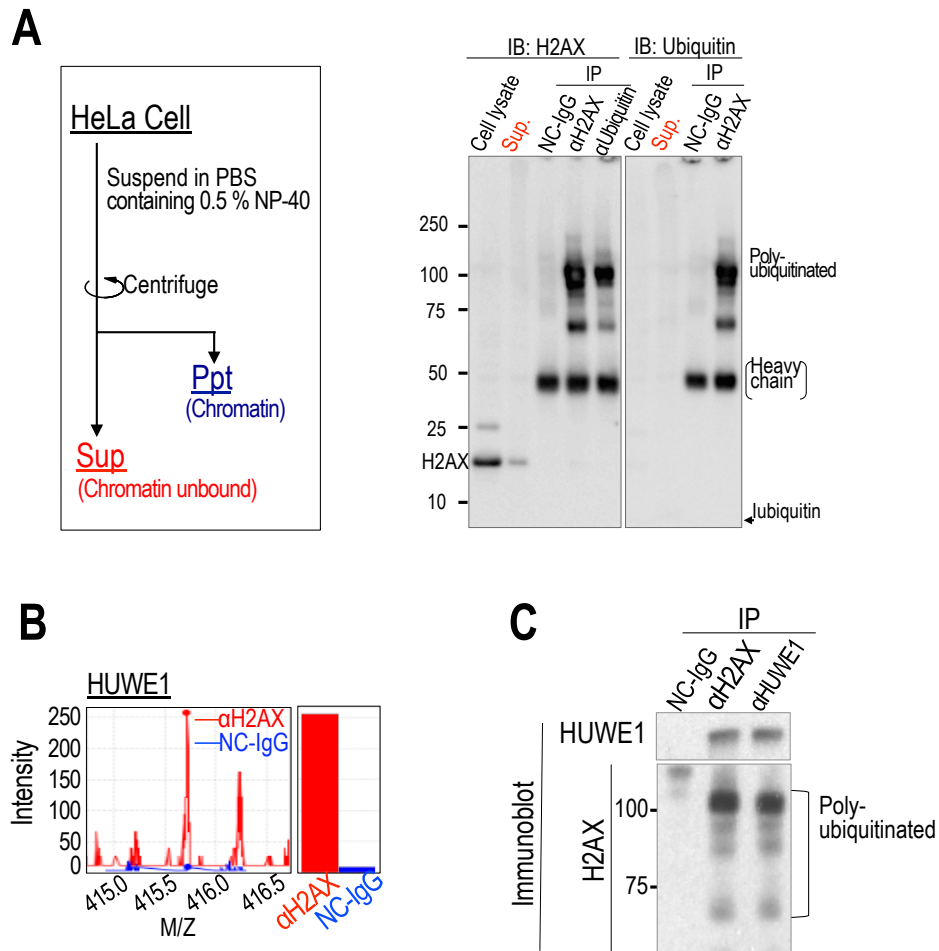


Figure 6. 非損傷下では、H2AXはE3リガーゼ HUWE1を介してポリユビキチン化される。

- (A) ポリユビキチン化H2AXの単離。HeLaは左に示したスキームの条件でクロマチン(Ppt)と上清(Sup)とに分画した。上清分画はさらにH2AX抗体とユビキチン抗体で免疫沈降し、ポリユビキチン化H2AXの存在を確認した。
- (B) HUWE1の同定。(A)で調整した上清分画は、ネガティブコントロールのIgG(NC-IgG)及び、H2AX抗体で免疫沈降し、2DICAL法でH2AXと結合するタンパク質を網羅的に解析した。HUWE1はH2AXとの結合が顕著であった。
- (C) HUWE1-H2AX間相互作用。NC-IgG、H2AX抗体及び、HUWE1抗体を用いて共免疫沈降を行い、HUWE1-H2AX間相互作用を確認した。

Figure 7

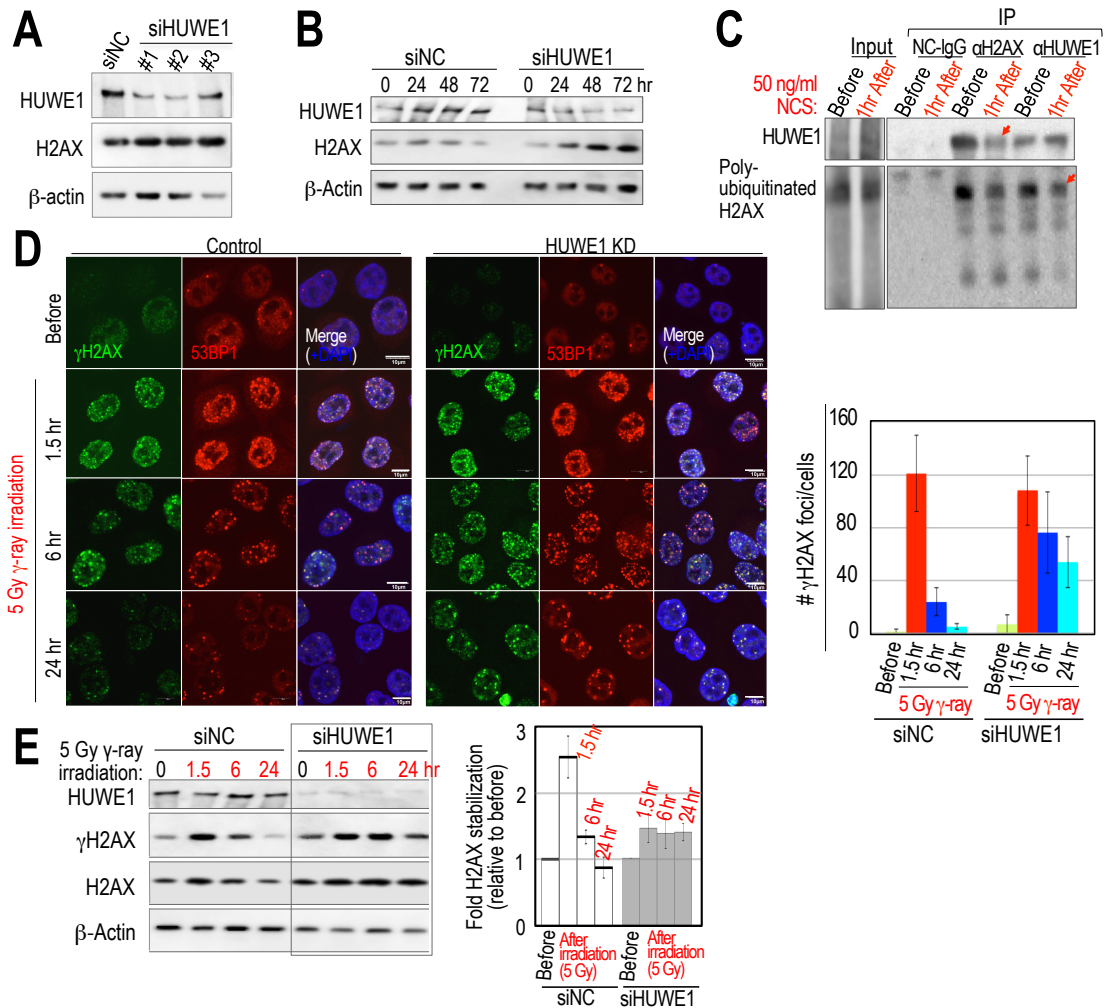


Figure 7. DSBsに反応したH2AXの安定化はHUWE1依存적である。

- (A) 3種のsiHUWE1によるノックダウン効率の検討。3種類のsiRNAをそれぞれHeLaに72時間トランスフェクションし、HUWE1のノックダウン効率を検討した。以降の実験では最もノックダウン効率が良好であった#1のsiRNAを用いて実施している。
- (B) HUWE1のノックダウン効果に伴うH2AXの安定化。siHUWE1をトランスフェクションし、H2AXの安定化を経時的に解析した。H2AXの安定化はHUWE1のノックダウンレベルに対応していた。
- (C) 損傷依存的なHUWE1-H2AX間相互作用の解消。HeLa細胞に対してNCS処理(50 ng/ml)によってDNA損傷を誘導し、損傷の前後でH2AX抗体及びHUWE1抗体を用いた共免疫沈降を実施した。赤色の矢印は、損傷後にHUWE1-H2AXの複合体が減少していたバンドを指している。
- (D) HUWE1のノックダウンによる修復の遅延。HUWE1をノックダウンした場合のDSBsの修復効率を解析するため、5Gyの放射線照射の影響を調べた。DSBsの状態は γ -H2AX fociのレベルを蛍光免疫染色によって解析した。 γ -H2AX抗体と同時に、修復因子53BP1抗体で染色し、経時変化を解析した。右のグラフでは100個の細胞について計測した1細胞あたりの γ -H2AX fociの数を示しており、HUWE1のノックダウンにより、 γ -H2AX fociの消失が遅延していることを見出した。スケールバーは10 μ m、エラーバーは \pm SD値を示す。
- (E) HUWE1のノックダウンによるH2AXの安定化の喪失。コントロールsiRNA及びsiHUWE1をトランスフェクションしたHeLa細胞に対して放射線照射(5Gy)を行い、H2AX及び、 γ -H2AXレベルの経時変化をウエスタンブロットにより解析した。右のグラフは、H2AX量を定量化したものであり、HUWE1のノックダウンにより、H2AXの安定化は殆ど認められなかった。エラーバーは \pm SD値を示す。

第三章 ATM 依存的な H2AX 安定化機構

第一節 序

損傷時における HUWE1 の H2AX からの解離は非常に早いため、このタンパク質間相互作用の解消の制御には損傷センサータンパク質である ATM が関与している可能性が考えられた。そこで本章では、損傷依存的な H2AX の安定化への ATM の関与について解析した。

第二節 DNA の損傷に依存的な H2AX 安定化への ATM の関与

DNA の損傷依存的な H2AX の安定化への ATM の関与を調べるために、ATM 阻害剤 (KU55933) による影響をウエスタンブロットで解析した。その結果、HeLa 細胞に ATM 阻害剤を添加した場合は、DSBs に伴う H2AX 安定化が認められなかった (Figure 8A)。また、同様の結果は ATM 欠損 MEFs (東京医科歯科大学の高木先生からの供与) を用いた実験でも認められ、これらの MEFs では γ H2AX foci の拡大も全く認められなかった (Figure 8B, 8C)。これらのことから、DNA 損傷に依存的な H2AX の安定化と、これに伴う γ H2AX foci の拡大には ATM による損傷応答が関与していることが分かった。

さらに、DNA 損傷に依存的な「HUWE1 の H2AX からの解離」に対しての、ATM の関与を検証するために、ATM 阻害剤を前処理した背景で DSBs を誘導し、H2AX 抗体と HUWE1 抗体を用いた共免疫沈降を実施した。その結果、ATM 阻害剤の存在下では、DNA 損傷後でも、HUWE1-H2AX 間相互作用が維持される

ことが分かった (Figure 8D)。

第三節 DNA 損傷に依存した H2AX 安定化への H2AX C 末領域の重要性

DNA 損傷に応答した H2AX (H2AX-H2B) の安定化は、クロマチン内に存在する H2A (H2A-H2B) と置き換わるクロマチン再構成を伴って誘導されていると考えられる。このことは、これまでの解析で見出した H2AX 安定化機構が、H2AX に特異的なものであることを示唆している。そこで、H2AX に特有の、C 末領域の影響を解析することとした。特に、前節の解析で ATM 依存性を見出したことから、ATM によるリン酸化部位 S139 の影響についても解析することとした。本研究では、*H2AX* 遺伝子が野生型 (WT)、Ala 135 以降の C 末欠損型 (dC135) (*H2AX*^{ΔdC135})、S139A 変異型 (S139A) (*H2AX*^{S139A}) のニワトリ DT40 細胞 (京都大学の武田教授より供与) を用いて、損傷依存的な H2AX 安定化を解析した。多くの H2AX 抗体は、H2AX の C 末領域を抗原に作製されているため、dC135-H2AX は通常の SDS-PAGE では、検出することができなかったが、S139A-H2AX は非常に弱いシグナルではあるが、損傷依存的な H2AX 安定化が誘導されていない様子が確認できた (Figure 9A)。このことをさらに解析するために、二次元電気泳動を実施することとした。

まず始めに、acid-urea-triton (AUT) ゲルで一次元目の泳動を行い、ヒストンタンパク質のマーカーを元に H2A の泳動位置を Flamingo 染色によって、H2AX の泳動位置をウェスタンブロットによってそれぞれ確認した (Figure 9B)。続いて、二次元目を SDS-PAGE で展開した (Figure 9C)。これにより、WT-H2AX を

発現している DT40 細胞では放射線照射後（10 Gy）に H2AX レベルが増加していることを、Flamingo 染色と H2AX 抗体で検出したウェスタンブロットの両方の手法で確認した。これに対し、S139A-H2AX 発現 DT40 細胞及び dC135-H2AX 発現 DT40 細胞では、損傷依存的な H2AX の増加が全く認められなかった (Figure 9C)。また、同様の結果は、HeLa 細胞に S139A-H2AX を強制発現した実験でも認められた。3xFLAG-tagged H2AX (WT) vector を発現した細胞では放射線照射後（10 Gy）に FLAG 抗体で検出されるバンドが増加し、それに伴って γ H2AX シグナルも増加しているのに対し、3xFLAG-H2AX (S139A) vector を発現させた細胞では損傷依存的な増加は認められなかった (Figure 9D)。

第四節 考察

本章の解析から、DNA 損傷に依存的な H2AX の安定化が、DSBs に応答して活性化した ATM の介在によって誘導されており、この過程には、H2AX の C 末端領域にある S139 が必須であることが明らかになった。しかし、本研究で明らかになった、H2AX の安定化機構に対する S139 部位のリン酸化自体の必要性についての知見は得られていない。この点については今後、リン酸化を擬似する変異体 (S139D) を用いた実験等を行い、検証する必要がある。また、HUWE1 にも、ATM のリン酸化標的となる SQ/TQ モチーフを有していることが報告されているが (Matsuoka, Ballif et al. 2007)、本研究では、ATM と HUWE1 の間の直接的な相互作用に関する証拠は得られなかった。

Figure 8

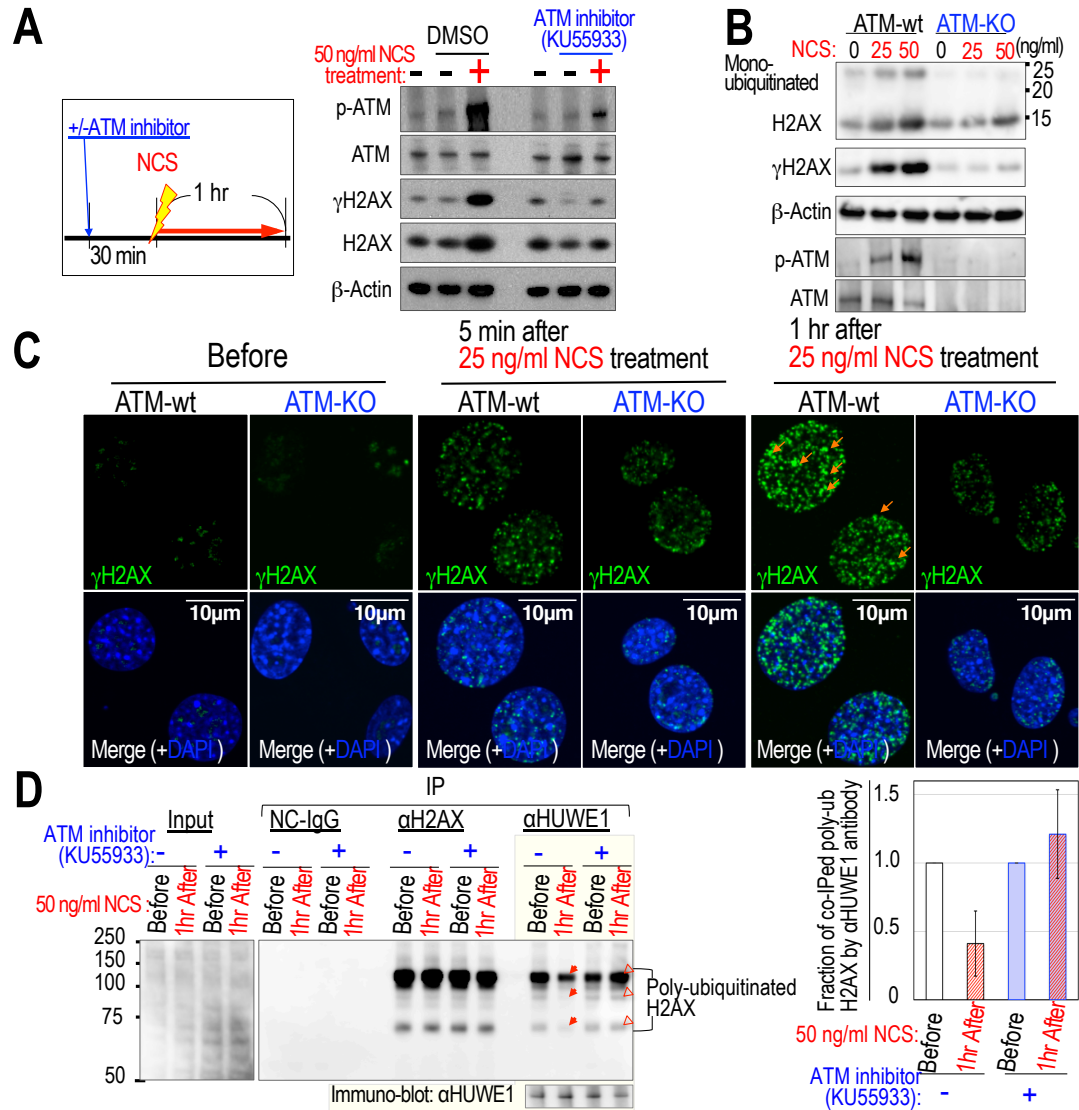


Figure 8. H2AXの安定化はATMの活性化に依存する。

(A, B) H2AXの安定化に対するATMの関与。HeLa細胞をATM阻害剤(10 μ M KU55933)で30分間前処理し、50 ng/ml NCS処理によるDSBsに応答したH2AXの安定化への関与をウエスタンブロットにより解析した(A)。DMSOはATM阻害剤のコントロールとして用い、ATMの阻害効果は、リン酸化ATMの検出により確認した。ATM阻害剤の存在下ではH2AXのDSBs依存的な安定化は阻害されていた。同様の結果はATM野生型MEFsとATM欠損MEFsへのNCS処理によっても確認された(B)。

(C) DSBsに応答したATM依存的な γ H2AX fociの拡大。 γ H2AX fociの拡大をATM野生型MEFsとATM欠損MEFsとで比較した。25 ng/ml NCS処理の5分後と1時間後の γ H2AXを蛍光免疫染色により解析した。ATM欠損MEFsでは γ H2AX fociの拡大は認められなかった。スケールバーは10 μ mを示している。

(D) 損傷依存的なHUWE1-H2AX間相互作用の阻害に対するATM依存性。HeLa細胞をATM阻害剤で前処理し、損傷の前後で免疫沈降を行った。赤色の矢尻はポリユビキチン化H2AXのバンドを指しており、ATM阻害剤の存在下では、損傷後でもHUWE1-H2AX間相互作用が継続的に認められた。右のグラフは、HUWE1で免疫沈降されたポリユビキチン化H2AXバンドを定量し、Beforeを基準に比較したグラフである。エラーバーは \pm SD値を示す。

Figure 9

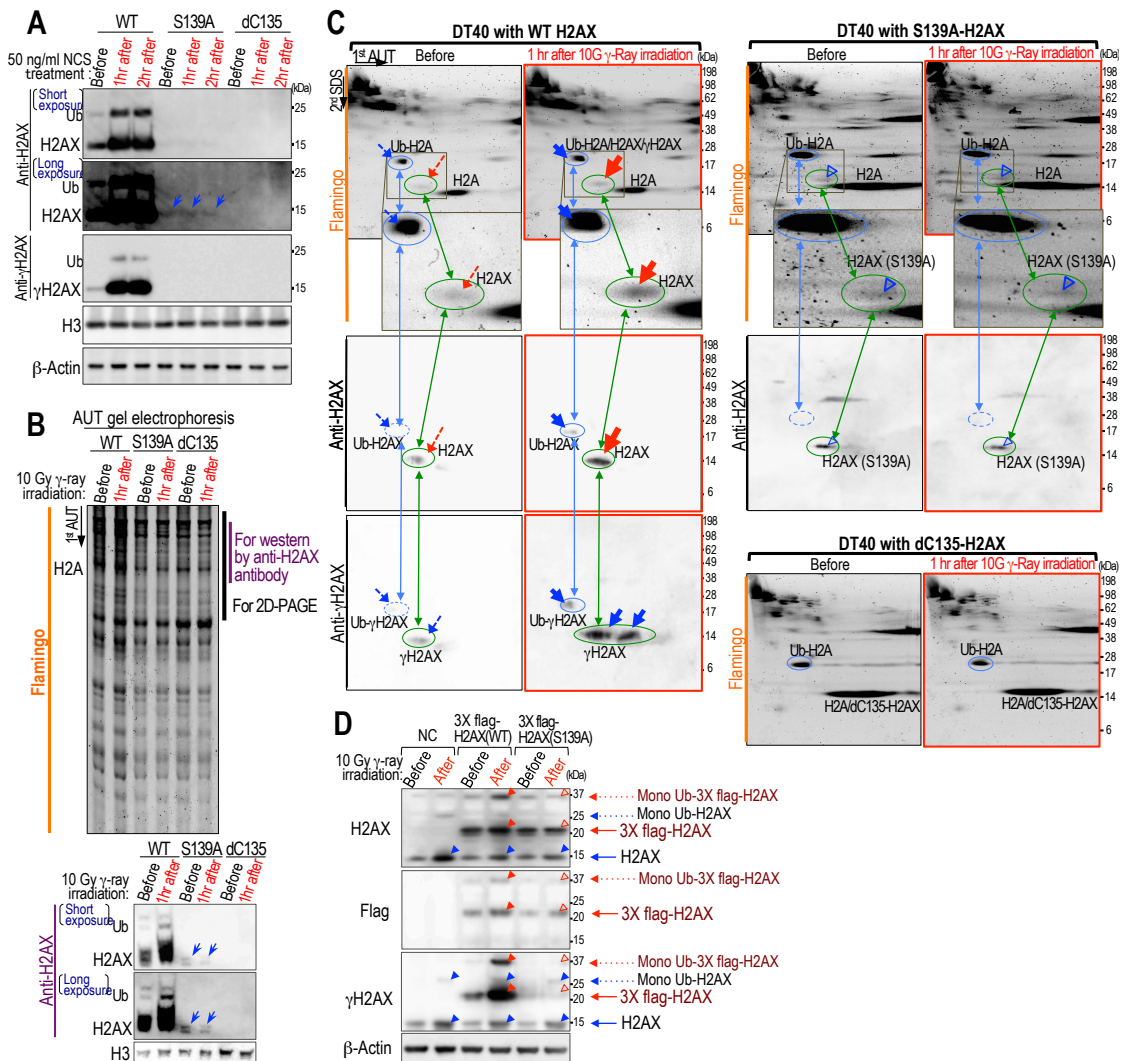


Figure 9. H2AXの安定化はH2AX C末領域を要する。

- (A) H2AX変異型DT40細胞を用いたH2AX安定化の検出。H2AX遺伝子について野生型(WT)、S139A変異型(S139A)、Ala135以降のC末欠損型(dC135)のDT40細胞に対して、NCS処理(50 ng/ml)を行い、ウェスタンブロットによってH2AXの安定化状態を検出した。長時間の露光により弱く検出されたS139A-H2AXでは、WTで認められたDSBs依存的なH2AXの安定化は検出されなかった。
- (B) Acid-urea-triton(AUT)ゲルによる一次元目の展開。放射線照射(10 Gy)前後の各DT40細胞をAUTゲルでヒストンタンパク質のマーカーと共に泳動し、総タンパク質をFlamingoで染色した。イメージ右側で紫線で示された領域でウェスタンブロットを行い、H2AXが含まれることを確認した(下図)。続く二次元目の泳動には、右側で黒線で示された領域を使用する。
- (C, D) 二次元電気泳動による、H2AXの安定化状態の検出。(B)で展開されたH2Aを含む領域(黒線で表示)をSDS-PAGEで展開した。WT-DT40細胞で放射線照射(10 Gy)後増加するH2AX(緑色で囲まれた領域)は、Flamingo染色、ウェスタンブロット(H2AX抗体と γ -H2AX抗体で検出)によって確認できた。一方、WT-DT40細胞でH2AXが検出された領域(緑色)におけるタンパク質の増加は、S139A-H2AX及び、dC135-H2AXを発現するDT40細胞では全く認められなかった(C)。同様の結果は、3x FLAG-H2AX(WT)又は3x FLAG-H2AX(S139A)を強制発現させたHeLa細胞に対する放射線照射(10 Gy)によっても認められた(D)。

第四章 損傷時における SIRT6/SNF2H 依存的な H2AX のクロマチンへの取込み

第一節 序

第三章までの解析で、DNA 損傷時には、ATM を介して H2AX の分解が一過的に阻害されることに伴って H2AX が安定化していることが明らかになった。

しかし、安定化した H2AX が γ H2AX foci を形成し、DSBs 修復に貢献するためには、クロマチン再構成の機構を介してクロマチン

ンに取り込まれる必要がある。事実、損傷後の細胞を H2AX 抗体で免疫沈降すると、H3 や H2AZ などの他のヒストンタンパク質が検出される。このことは、安定化した H2AX が、他のヒストンと共にヌクレオソームを形成していることを示している（右図）。そこで本章では、損傷依存的な H2AX のクロマチン導入機構について解析した。

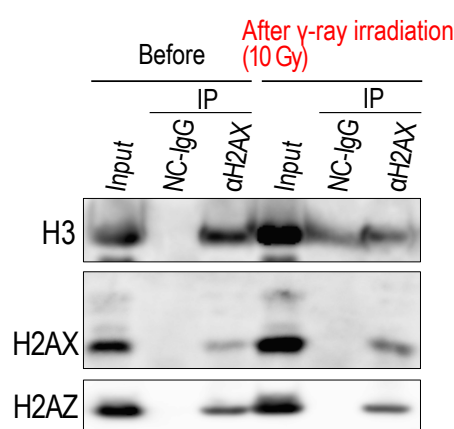


図. DSBsに応答して安定化したH2AXのクロマチン導入。放射線(10 Gy)の照射前後で、HeLa細胞のクロマチン分画を調整し、H2AX抗体で免疫沈降した。DSBsに反応して安定化したH2AXはH3とH2AZと共に沈降された。このことから、クロマチン内でヌクレオソームを形成していることが示唆される。

最近、GFP-fusion タンパク質を用いたタイムラプス解析によって、ISWI クロマチン再構成因子の触媒サブユニットである SNF2H が、DNA 損傷に応答して、H2AX よりも速く DSBs 領域に誘導されていることが示された(Min, Jo et al. 2014)。そこで、安定化した H2AX をクロマチンに取り込む過程では、SNF2H が責任因子として関与する可能性が考えられた。

さらに、SNF2H の DSBs 領域へのリクルートにはサーチインタンパク質の

一つである SIRT6 の介在が重要であることが報告されていることから(Toiber, Erdel et al. 2013)、本研究では SIRT6 依存的な SNF2H の関与について調べることにした。

第二節 γ H2AX foci 形成への SIRT6、SNF2H ノックダウンの影響の解析

SIRT6 あるいは SNF2H をノックダウンした HeLa 細胞への放射線 (2 Gy) の照射の影響を解析するため、蛍光免疫染色で γ H2AX foci 形成効率を観察した。その結果、SIRT6、SNF2H どちらをノックダウンした場合でも 30 分以内の γ H2AX foci 形成は殆ど認められず、これらの細胞では γ H2AX foci の形成が遅延することが分かった (γ H2AX foci の形成は 1 時間以降に認められた) (Figure 10A, 10B)。また、これらの細胞では損傷後の H2AX レベルの増加も殆ど認められなかった (Figure 10C)。このとき、SIRT6 ノックダウン細胞で分画化を行ったところ、発現上昇した H2AX がクロマチン非結合の分画で蓄積していることが分かった (Figure 10D)。このことから、H2AX の安定化は、SIRT6 と SNF2H を介したクロマチンへの導入を伴う過程であり、これによって、DNA 損傷応答が機能的に活性化されることが分かった。

第三節 考察

本章の解析から、DNA 損傷に応答して安定化した H2AX は、SIRT6 と SNF2H に依存的にクロマチン導入され、これに伴って γ H2AX foci が効率よく形成されることが明らかになった。この機構では、SIRT6 が SNF2H を DSBs 部位ヘリク

ルートしていると考えられるが、SIRT6 が“どのようにして損傷を感知しているのか”という点については不明である。先行研究では、SIRT6 はクロマチンに緩く結合しながら存在していることが示されていることから(McCord, Michishita et al. 2009)、この状態で、SIRT6 は DNA 損傷を非常に早い段階で感知し、損傷に応答している可能性が考えられる。

Figure 10

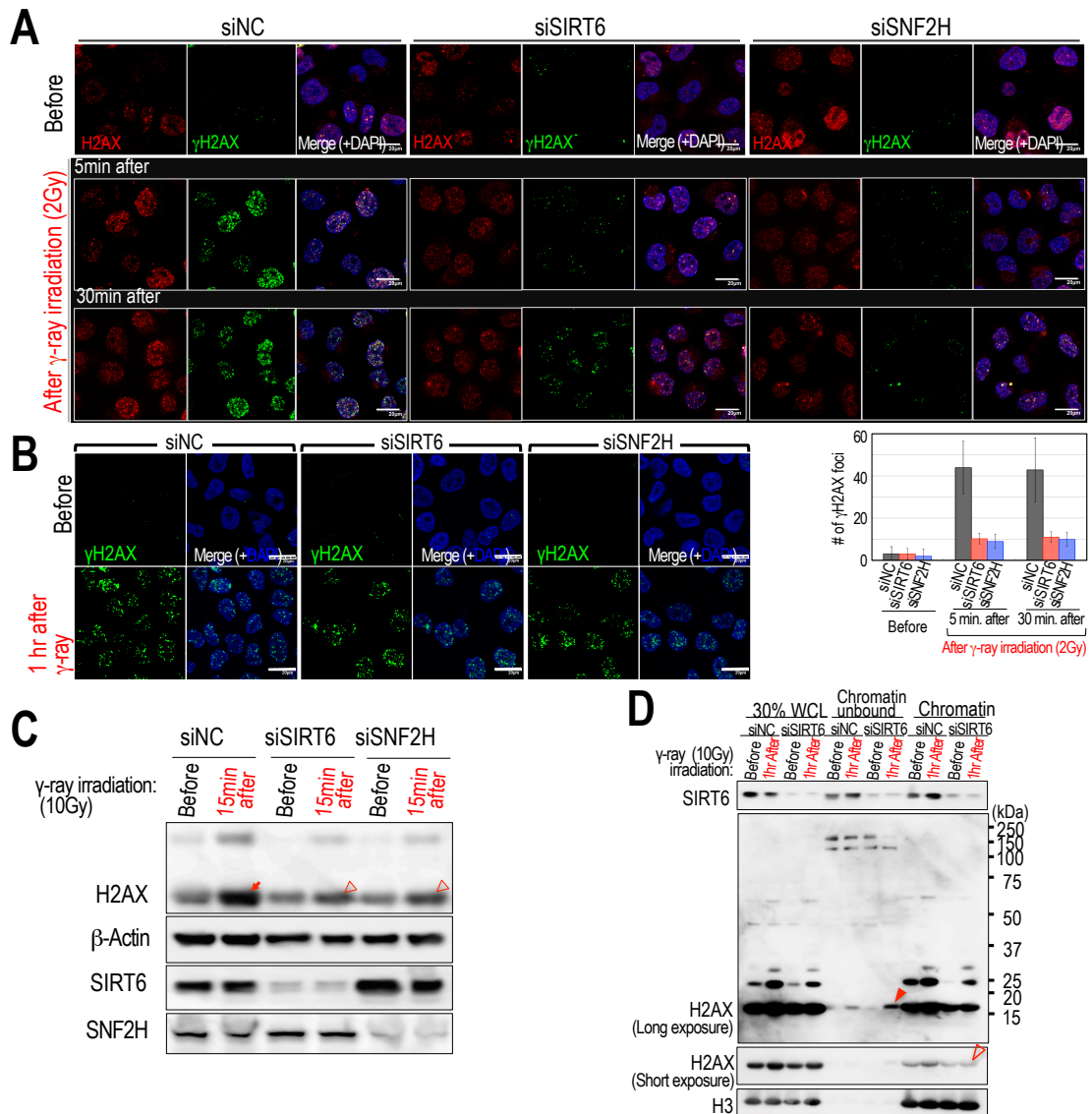


Figure 10. 損傷依存的なH2AXの安定化にはSIRT6及びSNF2H依存的なクロマチン導入を伴う。

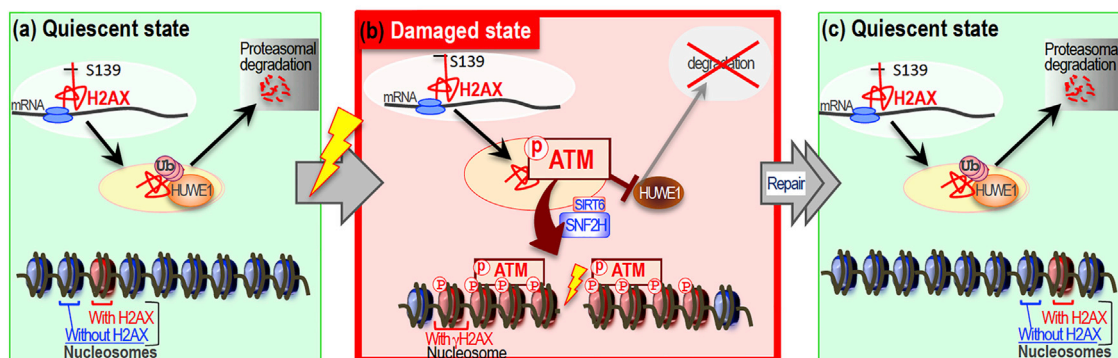
(A, B) SIRT6またはSNF2HのノックダウンによるγH2AX fociの形成の遅延。SIRT6とSNF2HをノックダウンしたHeLa細胞に対して、放射線照射(2 Gy)直後(5分後)と30分後のγH2AX fociを蛍光免疫染色により観察した(A)。SIRT6とSNF2Hをノックダウンした細胞では、30分以内のγH2AX foci形成は殆ど認められず、損傷の1時間後になって検出された(B)。スケールバーは20 μmを示している。また、右のグラフは、損傷の5分後、及び30分後におけるγH2AXのfociを計測した結果で、コントロールと比較してSIRT6及びSNF2Hのノックダウン細胞ではγH2AX fociが減少することを見出した。エラーバーは± SD値を示す。

(C) SIRT6とSNF2Hのノックダウンによる、損傷依存的なH2AX安定化の抑制。A, Bと同様にHeLa細胞に対して、SIRT6とSNF2Hをノックダウンし、損傷依存的なH2AXの安定化をウェスタンブロットにより解析した。コントロール(siNC)で認められたH2AXの安定化は、SIRT6及びSNF2Hノックダウン細胞では抑制されていた(赤色矢尻)。

(D) SIRT6依存的なH2AXのクロマチン導入。SIRT6をノックダウンしたHeLa細胞を用いて、損傷後(10 Gy)の放射線照射から15分後の安定化H2AXの局在を解析した。SIRT6をノックダウンした場合、クロマチン分画ではH2AXの増加は認められず(赤色枠の矢尻)、代わりに上清分画で認められた(赤色塗りつぶしの矢尻)。

第五章 総合考察

静止状態の正常細胞では、H2AX の発現レベルが著しく低下している。H2AX 欠損細胞は DSBs の修復が不全であるが、静止状態の細胞は、DNA 損傷に応答して、「一過的に H2AX を安定化し、これに伴って γ H2AX foci を形成し、修復を誘導している」ことが、本研究の解析で明らかになった（下図）。そして、DSBs が修復された後は、細胞の H2AX レベルは再び減少することが示された。この結論は、「静止状態の細胞のように H2AX を殆ど発現していない場合にも、細胞は DSBs に応答して一過的な H2AX の安定化を介して γ H2AX foci を形成すること（第一章）」、「非損傷下では、H2AX が E3 ユビキチンリガーゼ HUWE1 によってポリユビキチン化を受け、恒常的に分解されていること（第二章）」、「ATM の活性化を介して H2AX の分解が一過的に阻害されること（第三章）」、「H2AX の安定化には、H2AX の Ser139 が必須であること（第四章）」、そして「H2AX は SIRT6 と SNF2H に依存的なクロマチン再構成によって安定化すること（第五章）」、との知見から支持される。



細胞における H2AX の制御

H2AX は“細胞増殖”と“効果的な DNA 損傷応答”の両方に必要である。このため、細胞の増殖速度と DSBs の修復効率は、細胞内の H2AX レベルによって大きく変動する。H2AX 発現量の制御はマイクロ RNA による転写レベルでの制御(Lal, Pan et al. 2009, Wang, Huang et al. 2011)など、様々な機構によって行われている。本研究で我々が見出した DSBs に応答した迅速な H2AX の安定化機構は、これまで示されてきた機構とは異なる、新規の機構である。

細胞の H2AX レベルは ARF/p53 経路によっても制御されているが、その機構は未だ不明である。これまでに我々は、正常細胞が一定回数の分裂の後、ARF/p53 経路に依存的な H2AX 量の減少に伴って増殖を停止し、この状態で不死化から防御されることを見出してきた(Atsumi, Fujimori et al. 2011, Osawa, Atsumi et al. 2013)。そして、新たに本研究の解析から、DNA 損傷の無い通常の状態において、H2AX はプロテアソーム系を介して分解されていることを見出した。これらのことから、増殖停止した細胞における H2AX の発現制御は、ARF/p53 経路による制御、プロテアソーム系を介した分解制御など、複数の機構を介して制御されていると考えられる。本研究から、HUWE1 は H2AX の分解に関与する E3 リガーゼの責任因子の一つであることが明らかになったが、HUWE1 は唯一の責任因子ではなく、複数の E3 リガーゼが H2AX の分解に関わっている可能性も示唆された。

H2AX の安定化への ATM、SIRT6、SNF2H の関与

本研究から、DNA 損傷に応答した H2AX の安定化には、迅速なクロマチンへの導入が関与していることが明らかになった。この H2AX のクロマチン導入には、少なくとも、ISWI ファミリーのクロマチン再構成因子の触媒サブユニットである SNF2H と、サーチュインタンパク質である SIRT6 が介在している。SNF2H と SIRT6 は損傷応答の様々な段階に関与するため、H2AX のクロマチン導入以外にも、 γ H2AX foci の形成や修復に対しての作用点が存在すると考えられる。SNF2H と相互作用するクロマチン再構成因子 Rsf-1 は、ATM 依存的に DSBs 部位にリクルートされることが知られている(Min, Jo et al. 2014)。このことを合わせて考えると、DSBs によって活性化した ATM が、SNF2H/Rsf-1 に対して直接に損傷シグナルを伝達し、SIRT6 の制御下で H2AX のクロマチン導入を促しているものと考えられる。また、HUWE1 は ATM のリン酸化標的の候補物質の一つであることが知られている(Matsuoka, Ballif et al. 2007)。本研究で、ATM の活性化に依存的に HUWE1 がポリユビキチン化 H2AX から解離することが見出されたことを合わせて鑑み、HUWE1 自体も ATM から直接にシグナルを受けている可能性も考えられる。

H2AX の減少と一過的な安定化の生物学的な効果

DNA 損傷に応答した一過的な“分解の停止”に伴う H2AX の安定化機構は、「酸化ストレスに応答して迅速に安定化する Nrf2 の応答機構(Kobayashi, Kang et al. 2004)」と似ている。しかし、Nrf2 が通常状態（酸化ストレスの無い状態）で安定化した場合には、むしろ毒性を示すことが知られている。このことから、

本研究で明らかになった H2AX の安定化機構の場合でも、増殖停止した細胞に、通常の細胞状態で H2AX が安定化した場合には毒性が生じる可能性が考えられる。そこで本項では、以下にこの点を考察する。

これまでに蓄積した知見からは、H2AX は少なくとも、「DNA 修復を介在する」と同時に、「活発な細胞増殖に関わる」ことが知られている。このことから、増殖停止した細胞での、過剰な H2AX の発現は“細胞周期の促進”を伴い、その結果、ゲノム不安定性誘導のリスクを上昇させると考えられる。実際、正常な MEFs に H2AX を強制発現させた場合、ゲノム不安定化を促進し、その結果、不死化形質の獲得を促進させてしまうことが分かっている (Atsumi, Fujimori et al. 2011)。逆に、H2AX をノックダウンした場合には、H2AX の減少に伴って直接に細胞の増殖が停止される (Atsumi, Fujimori et al. 2011, Atsumi, Inase et al. 2013)。このことは、形質転換した細胞（不死化細胞や癌細胞など）では H2AX の発現量が高いのに対し、「増殖停止した正常細胞では H2AX レベルが低下しており、細胞はこの状態で形質転換から防御されている」との知見によっても支持されている (Atsumi, Fujimori et al. 2011)。

多くの場合、正常細胞は H2AX レベルの低下に伴って増殖を停止しているが、一方で H2AX は DNA 損傷の修復にも必要である。このため、H2AX を殆ど発現していない増殖停止した細胞では、本研究で見出されたような「DSBs に応答して一過的に H2AX を安定化し、修復能を活性化する機構を有している」と考えられる。この経路は、H2AX の恒常的な合成と分解、そして DNA 損傷に応答した H2AX の迅速なクロマチン導入によって成り立っている。

第六章 実験材料および方法

細胞培養

すべての細胞培養は、37 °C、5 % CO₂ の環境下で行った。

野生型のマウス胎仔線維芽細胞 (Mouse embryonic fibroblast cells) は 13.5 日胚から調製し、3T3 プロトコールで培養した。静止状態の MEFs は tSD-3T3 プロトコール (10 % FCS を含む DMEM で 3 日に一度継代又は培地交換を行った 48 時間後に無血清培地に変えて 24 時間培養し、その後継代又は培地交換を行う) で準備した。

ATM 欠損 MEFs は ARF 欠損の背景で作製し、ARF 欠損 MEFs と比較して実験した。

H2AX 遺伝子について、野生型、C 末欠損型 (*H2AX*^{dc135})、S139A 変異型 (S139A) (*H2AX*^{S139A}) のニワトリ DT40 細胞は、10 % FCS 及び、1 %ニワトリ血清を含む RPMI1640 で培養した。

ヒト正常繊維芽細胞 WI38、HeLa 細胞、HCT116、MCF7 は 10% FCS (牛胎仔血清) を含む DMEM で培養した。

HeLa 細胞の同調は、2mM Thymidine 処理で行った。その後、G1 期の細胞を得るために、Nocodazole 処理により M 期の細胞を回収し、再び接着した状態で実験を行った。

トランスフェクション

(1) ノックダウン

各種ノックダウンは下記の配列を合成、あるいは購入して、RNAi MAX (#13778030, Life Technologies) を用いてトランスフェクションした。

HUWE1 ノックダウン

#1, Mission esiRNA human HUWE1 (EHU67731, sigma)

#2, 5'-CUGUGAGAGUGAUCGGGAAtt-3' (s19596, Life Technologies)

#3, 5'-AAGUAUCCCUACCACCUCAUGtt-3' (Chen, Kon et al. 2005)

H2AX ノックダウン : 5'-CAACAAGAAGACGCGAAUCtt-3'

SNF2H ノックダウン : 5'-GGAUUAAACUGGCUCAUUUuu-3'

SIRT6 ノックダウン : SIRT6 siRNA (h) (sc-63028, santa cruz)

コントロールの siRNA : negative control siRNA (sc-37007, santa cruz)

(2) 強制発現

H2AX の cDNA は H2AX-F 5'-CGgaattcaATGTCGGGCCGCGGCAAGACT-3', H2AX-R 5'- GAagatctttaTTAGTACTCCTGGGAGGCCT3'のプライマーセットで増幅し、p3XFLAG-CMV10 発現ベクターに組み込んだ。また、S139A-H2AX は KOD-plus-Mutagenesis Kit (SMK-101, TOYOBO) を用いて変異を導入し、H2AX_S139A-F 5'-Gcccaggagtactaataaagatctgat-3', H2AX_S139A-R 5' ggcctgggtggccttcttgcgcgcga-3'で PCR を行い、野生型と同様に発現ベクターに組み込んだ。作製した H2AX 及び S139A-H2AX 発現ベクターは Lipofectamine 3000 (L3000001, Life Technologies) を用いて HeLa 細胞に強制発現させた。

DNA損傷

Neocarzinostatin (N9162, Sigma) 、Hydroxyurea (H8627, Sigma) 、UV illuminator (Strayagene) 、Gammacell 40Exactor (Best Theratronics) を用いてDNA損傷を誘導した。

蛍光免疫染色

細胞を接着させたカバーガラスを、4 %パラホルムアルデヒドで15分間固定し、0.1 % TritonX-100で氷上にて15分間透過処理を行い、2 % ヤギ血清で20分間ブロッキングを行った後に各種抗体で染色を行った。検出は、共焦点レーザー顕微鏡 (Olympus FV10i) で行った。

免疫沈降

Figure 10Dの免疫沈降には、細胞溶解液 {150 mM KCl, 20 mM HEPES pH7.6, 2 mM EGTA, 1.5 mM MgCl₂, 50 mM NaF, 0.1 % NP40, 10 % glycerol, 1 mM Na₃VO₄, 20 mM β -glycerophosphate, 1 mM DTT, 25 units/ml Benzonase nuclease, プロテアーゼ阻害剤 (#4693124001, Roche) } に懸濁し、氷上で10分間溶解後、最大速度で20分間遠心して得られた上清を細胞溶解液として調製した。ネガティブコントロールのIgG (sc-2025, santa cruz) を含む、各種抗体で免疫沈降し、磁気ビーズ (FGビーズ, 多摩川精機) で回収し、LDSサンプルバッファー (NP0007, Life technologies) に溶出した。その他の免疫沈降は、Figure 6Aの方法で得られた上清について実施している。

ウエスタンブロット

細胞は、LDS サンプルバッファー, 10 mM DTT, PhosSTOP (#4906845001, Roche) でサンプル調製し、12 % ポリアクリルアミドゲル、4-12 % Bis-Trisゲル (NW04127BOX, Life Technologies) 、3-8 % Tris-Acetateゲル (EA03755BOX, Life Technologies) で泳動し、PVDFメンブレン (#1620177, Bio Rad) へ転写し、5 % スキムミルクで30分間ブロッキング処理を行った後に、各種抗体で検出を行った。

脱リン酸化処理は、転写後のメンブレンに対し、プロテアーゼ阻害剤 (#4693124001, Roche) の存在下でCIP (M0290S, New England Biolabs) 処理を37°C で1時間行い、ブロッキング以降は通常の手順で実施した。

一次抗体

β -actin (A2228, sigma) , H2AX (A300-082A, Bethyl) , H2AX (A300-083A, Bethyl, IP 用) , H2AX (IHC00008, Bethyl, IF 用) , H2AX (ab11175, abcam) , H2AX (ab10475, abcam) , γ H2AX (05-636, upstate) , H3 (MABI301, MBL) , ubiquitin (ab19247, abcam) , HUWE1 (ab70161, abcam) , PCNA (ab29, abcam) , 53BP1 (PC712, Merck) , SIRT6 (#12486, Cell signaling) , SNF2H (ab72499, abcam) , H2AZ (GTX108273, GeneTex) , macroH2A.1 (ab37264, abcam)

フローサイトメトリー

細胞は FACS 液 {0.1% Triton X-100, 200 ug/ml RNase, 20 ug/ml PI (プロピジウムイオジド) in PBS} で懸濁し、FACS FLOW (BD) で解析を行った。

AUT、2D ゲル電気泳動

先行研究と同様の手法で実施した(Bonner, West et al. 1980)。

DT40 細胞 (5×10^7 cells) は 5 ml の 0.1 % NP40 に懸濁した後、最大速度で 5 分間遠心し、クロマチン分画を調製した。クロマチン分画(沈殿)を 1 mM DTT, 10 % glycerol を含む 20 μ l の PBS に懸濁し、0.8 μ l 濃塩酸 (終濃度 0.5 N) を加えて 1 時間氷上に置き、最大速度で 5 分間遠心することでヒストン抽出液を調製した。

ヒストン抽出液は 15 mg Urea (終濃度 8M) で中和し、AUT ゲル (*) で一次元目の泳動を行った (泳動装置を氷で冷やしながら 11 mA, 13 時間/ゲル 1 枚)。その後、AUT ゲルは LDS バッファーで平衡化し、12 % Bis-Tris ゲル (NP0346BOX, Life Technologies) で二次元目の泳動を行った。H2AX の状態は Flamingo 染色 (#1610490, Bio-Rad) 及びウエスタンブロットにより検出した。

(*) AUT ゲル組成 : 分離ゲル (15 % acrylamide, 1M acetic acid, 45 mM NH_4OH , 8 M Urea, 8 mM TritonX-100, 0.5 % N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)、濃縮ゲル (3.3 % acrylamide, 1M acetic acid, 45 mM NH_4OH , 8 M Urea, 0.5 % N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine)、泳動バッファー (0.1 M Glycin, 1 M acetic acid)

阻害剤

プロテアソーム阻害は 2 μ M MG132 (#4747909, Calbiochem) , E1 ユビキチンリガーゼ阻害は 10 μ M PYR41 (#662105, Calbiochem)、ATM 阻害は 10 μ M KU55933 (ab120637, abcam) を用いて実施した。

コメット解析

先行研究と同様の手法で実施した(Ichijima, Sakasai et al. 2005)。細胞浮遊液 (10^5 cells/5 μ l) を調整し、低融点アガロースと混合した後に、comet slide に乗せ 4 °C で 30 分静置して固化させた。その後、Lysis 溶液 (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, 1 % Triton X-100, 10 % dimethyl sulfoxide, pH 10) 中で 4 °C、1.5 時間反応させた後、アルカリ溶液 (1 mM EDTA, 300 mM NaOH) 中で 4 °C、20 分間反応を行い、DNA を変性させた。電気泳動はアルカリ溶液中で 30 分間 20V で実施した。スライド上のゲルは 400 mM Tris-HCl (pH 7.4) で中和し、SYBR Green I (#50513, Lonza) で染色した。解析は CometScore で実施した。

謝辞

本研究にあたり、御指導御鞭撻を賜りました国立がん研究センター研究所発がん・予防研究分野 吉岡 研一先生に深く御礼申し上げます。

また、実験材料の供与や多くの有益な御助言を頂きました、同研究所創薬臨床研究分野 尾野 雅哉先生、大阪大学蛋白質研究所 篠原 彰先生、京都大学大学院医学研究科放射線遺伝学教室 武田 俊一先生、東京医科歯科大学小児・周産期地域医療学講座 高木 正稔先生、東京医科歯科大学 難治疾患研究所 寺岡 弘文先生、同研究所 四戸 啓太郎さんに心より感謝致します。

本研究をまとめるにあたり、有益なる御助言を頂きました京都大学放射線生物研究センター 井倉 毅先生、国立がん研究センター研究所 創薬臨床研究分野 益谷 美都子先生、多層オミックス・バイオインフォマティクス分野 太田 力先生に深く感謝致します。

また、研究のみならず、様々なことで多大なる御助言・御協力を頂きました、国立がん研究センター研究所発がん・予防研究分野 吉岡グループの土橋 祥子博士、東京理科大学 皆川 祐輔さん、武笠 哲也さん、大澤 智之さん、北里大学 清水 敦広さんに心より感謝致します。

最後になりましたが、このような研究の機会を頂きました国立がん研究センター研究所所長 中釜 斉先生、北里大学大学院理学研究科生物科学専攻分子生物学講座 高松 信彦教授、伊藤 道彦准教授に深く御礼申し上げます。

引用文献

- Atsumi, Y., et al. (2011). "Onset of quiescence following p53 mediated down-regulation of H2AX in normal cells." PLoS One **6**(8): e23432.
- Atsumi, Y., et al. (2013). "The Arf/p53 protein module, which induces apoptosis, down-regulates histone H2AX to allow normal cells to survive in the presence of anti-cancer drugs." J Biol Chem **288**(19): 13269-13277.
- Bentley, M. L., et al. (2011). "Recognition of UbcH5c and the nucleosome by the Bmi1/Ring1b ubiquitin ligase complex." EMBO J **30**(16): 3285-3297.
- Bonner, W. M., et al. (2008). "GammaH2AX and cancer." Nat Rev Cancer **8**(12): 957-967.
- Bonner, W. M., et al. (1980). "Two-dimensional gel analysis of histones in acid extracts of nuclei, cells, and tissues." Eur J Biochem **109**(1): 17-23.
- Chang, T. C., et al. (2007). "Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis." Mol Cell **26**(5): 745-752.
- Chen, D., et al. (2005). "ARF-BP1/Mule is a critical mediator of the ARF tumor suppressor." Cell **121**(7): 1071-1083.
- Doil, C., et al. (2009). "RNF168 binds and amplifies ubiquitin conjugates on damaged chromosomes to allow accumulation of repair proteins." Cell **136**(3): 435-446.
- Facchino, S., et al. (2010). "BMI1 confers radioresistance to normal and cancerous neural stem cells through recruitment of the DNA damage response machinery." J Neurosci **30**(30): 10096-10111.
- Fradet-Turcotte, A., et al. (2013). "53BP1 is a reader of the DNA-damage-induced H2A Lys 15 ubiquitin mark." Nature **499**(7456): 50-54.
- Fukawa, T., et al. (2012). "DDX31 regulates the p53-HDM2 pathway and rRNA gene transcription through its interaction with NPM1 in renal cell carcinomas." Cancer Res **72**(22): 5867-5877.
- Gatti, M., et al. (2012). "A novel ubiquitin mark at the N-terminal tail of histone H2As targeted by RNF168 ubiquitin ligase." Cell Cycle **11**(13): 2538-2544.
- Gertler, A. A. and H. Y. Cohen (2013). "SIRT6, a protein with many faces." Biogerontology **14**(6): 629-639.
- Ginjala, V., et al. (2011). "BMI1 is recruited to DNA breaks and contributes to DNA damage-induced H2A ubiquitination and repair." Mol Cell Biol **31**(10): 1972-1982.
- Ichijima, Y., et al. (2005). "Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response." Biochem Biophys Res Commun **336**(3): 807-812.
- Ismail, I. H., et al. (2010). "BMI1-mediated histone ubiquitylation promotes DNA double-strand break repair." J Cell Biol **191**(1): 45-60.
- Jia, G., et al. (2012). "Emerging roles of SIRT6 on telomere maintenance, DNA repair, metabolism and mammalian aging." Mol Cell Biochem **364**(1-2): 345-350.

- Kaidi, A., et al. (2010). "Human SIRT6 promotes DNA end resection through CtIP deacetylation." Science **329**(5997): 1348-1353.
- Kobayashi, A., et al. (2004). "Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2." Mol Cell Biol **24**(16): 7130-7139.
- Lal, A., et al. (2009). "miR-24-mediated downregulation of H2AX suppresses DNA repair in terminally differentiated blood cells." Nat Struct Mol Biol **16**(5): 492-498.
- Mao, Z., et al. (2011). "SIRT6 promotes DNA repair under stress by activating PARP1." Science **332**(6036): 1443-1446.
- Martinez-Pastor, B. and R. Mostoslavsky (2012). "Sirtuins, metabolism, and cancer." Front Pharmacol **3**: 22.
- Matsuoka, S., et al. (2007). "ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage." Science **316**(5828): 1160-1166.
- Mattiroli, F., et al. (2012). "RNF168 ubiquitinates K13-15 on H2A/H2AX to drive DNA damage signaling." Cell **150**(6): 1182-1195.
- McCord, R. A., et al. (2009). "SIRT6 stabilizes DNA-dependent protein kinase at chromatin for DNA double-strand break repair." Aging (Albany NY) **1**(1): 109-121.
- Min, S., et al. (2014). "ATM-dependent chromatin remodeler Rsf-1 facilitates DNA damage checkpoints and homologous recombination repair." Cell Cycle **13**(4): 666-677.
- Ono, M., et al. (2006). "Label-free quantitative proteomics using large peptide data sets generated by nanoflow liquid chromatography and mass spectrometry." Mol Cell Proteomics **5**(7): 1338-1347.
- Osawa, T., et al. (2013). "Arf and p53 act as guardians of a quiescent cellular state by protecting against immortalization of cells with stable genomes." Biochem Biophys Res Commun **432**(1): 34-39.
- Pinder, J. B., et al. (2013). "Reading, writing, and repair: the role of ubiquitin and the ubiquitin-like proteins in DNA damage signaling and repair." Front Genet **4**: 45.
- Raver-Shapira, N., et al. (2007). "Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis." Mol Cell **26**(5): 731-743.
- Rogakou, E. P., et al. (1999). "Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo." J Cell Biol **146**(5): 905-916.
- Stucki, M. and S. P. Jackson (2006). "gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes." DNA Repair (Amst) **5**(5): 534-543.
- Toiber, D., et al. (2013). "SIRT6 recruits SNF2H to DNA break sites, preventing genomic instability through chromatin remodeling." Mol Cell **51**(4): 454-468.
- van Attikum, H. and S. M. Gasser (2009). "Crosstalk between histone modifications during the DNA damage response." Trends Cell Biol **19**(5): 207-217.

Wang, Y., et al. (2011). "MicroRNA-138 modulates DNA damage response by repressing histone H2AX expression." Mol Cancer Res **9**(8): 1100-1111.

Wu, C. Y., et al. (2011). "Critical role of monoubiquitination of histone H2AX protein in histone H2AX phosphorylation and DNA damage response." J Biol Chem **286**(35): 30806-30815.