

論 文 内 容 要 旨

題目 Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates DNA damage response through interacting with heterochromatin protein 1 $\gamma$

(Homeodomain interacting protein kinase 2 は heterochromatin protein 1 $\gamma$ との相互作用を介して DNA 損傷応答を制御する)

著者 Yoko Akaike, Kiyoshi Masuda, Ken Kurokawa, Keisuke Kajita, Shizuka Kano, Kensei Nishida, Yuki Kuwano, Kazuhito Rokutan  
平成 25 年 12 月 25 日 Nucleic Acids Research 受理

内容要旨

Homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2)は DNA 障害応答キナーゼであり、致死的な DNA 障害が生じると p53 を介して細胞死を誘導する。一方、非致死的な DNA 障害時には細胞周期を停止させる。さらに、エピジェネティクス関連因子との相互作用も報告されており、クロマチンリモデリングを介した遺伝子発現や DNA 修復に関わる可能性が示唆されているが、その分子機構は明らかにされていない。また、heterochromatin protein 1 (HP1)は、DNA 障害時のクロマチン構造を制御し、DNA 修復に重要であると報告されている。本研究は、DNA 損傷応答における HIPK2-HP1 $\gamma$ を介した新たな分子機構の解明を目指した。

ヒト大腸癌細胞 (HCT116)の HIPK2 をノックダウンすると、非致死量の紫外線 (UV-C)を照射してもアポトーシスが誘導されることを見出した。UV-C による DNA 障害により生じる (6-4) photoproducts は、コントロール細胞では照射後 3 時間で 80%除去されたが、HIPK2 ノックダウン細胞では 10%しか除去されず、double-strand break のマーカーである Ser139 がリン酸化されたヒストン H2A.X ( $\gamma$  H2A.X)も除去されなかった。*hipk1*と *hipk2*を欠損したマウス胎児線維芽細胞 (*hipk1*<sup>-/-</sup>*hipk2*<sup>-/-</sup>MEF)に UV-C を照射すると、照射後 1 時間で増加した  $\gamma$  H2A.X 陽性細胞は、野生株では時間依存的に減少したが、*hipk1*<sup>-/-</sup>*hipk2*<sup>-/-</sup>MEF 細胞では逆に増加した。このように、HIPK2 は DNA 損傷の修復に重要であると考えられた。次に、液体クロマトグラフィー質量分析法により、HIPK2 の新規標的因子として HP1 $\gamma$ を同定した。免疫沈降法により HIPK2 は HP1 $\gamma$  のクロモシャドウドメインに特異的に結合すること、免疫蛍光組織染色法により HIPK2 の一部は HP1 $\gamma$  と核内で共局在することをそれぞれ確認した。*in vitro* kinase

## 様式(8)

assay と phos-tag を用いたウェスタンブロット法を行い、HIPK2 は HP1 $\gamma$  をリン酸化する活性を有しており、UV-C 照射による HP1 $\gamma$  のリン酸化を介在することを見出した。この HP1 $\gamma$  のリン酸化は、HIPK2 のキナーゼ活性ドメインに変異を導入すると消失した。HIPK2 を過剰発現すると UV-C 照射による  $\gamma$ H2A.X の集積を抑制することも確認した。さらに、HP1 $\gamma$  ノックダウン細胞に UV-C を照射すると、HIPK2 ノックダウン細胞と同様に、アポトーシスと  $\gamma$ H2A.X の集積が誘導された。このように、HIPK2 による HP1 $\gamma$  のリン酸化は DNA 損傷の修復に重要である可能性が示唆された。最後に、免疫沈降法により、HIPK2 は HP1 $\gamma$  とヒストン H3 のトリメチル化 Lys9 との結合を低下させ、HP1 $\gamma$  をクロマチンから解離させることも確認した。

以上の結果により、HIPK2 は HP1 $\gamma$  を介してクロマチン構造を制御し、DNA 損傷の修復に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第 <b>1196</b> 号	氏名	赤池 瑠子
審査委員	主査 副査 副査	安友 康二 佐々木 卓也 井本 逸勢	

題目 Homeodomain interacting protein kinase 2 regulates DNA damage response through interacting with heterochromatin protein 1 $\gamma$

(Homeodomain interacting protein kinase 2 は heterochromatin protein 1 $\gamma$  との相互作用を介して DNA 損傷応答を制御する)

著者 Yoko Akaike, Kiyoshi Masuda, Ken Kurokawa, Keisuke Kajita, Shizuka Kano, Kensei Nishida, Yuki Kuwano, Kazuhito Rokutan

平成 25 年 12 月 25 日 Nucleic Acids Research 受理  
(主任教授 六反 一仁)

要旨 Homeodomain interacting protein kinase 2 (HIPK2) は、DNA 損傷時に、細胞周期の停止とアポトーシスを制御する DNA 損傷応答キナーゼの一つである。HIPK2 はエピジェネティック制御因子と相互作用することも報告されており、クロマチンの再構成を調節して DNA 修復に関わる可能性が示唆されているが、その分子機構は明らかではない。

申請者は、HIPK2 の新たな標的分子として heterochromatin protein 1 $\gamma$  (HP1 $\gamma$ ) を同定し、HIPK2-HP1 $\gamma$  を介した DNA 修復の分子機構の解明を目指した。得られた結果は以下の通りである。

- 1) ヒト大腸癌細胞 (HCT116) の HIPK2 をノックダウンすると、非致死量の紫外線 (UV-C) 照射による (6-4) photoproducts とリン酸化 (Ser139) ヒストン H2A.X ( $\gamma$ H2A.X) を除去できず、

アポトーシスが誘導された。

- 2) 液体クロマトグラフィー質量分析法により、HIPK2 の新規標的因子として HP1 $\gamma$  を同定した。免疫沈降法により、HIPK2 は HP1 $\gamma$  のクロモシャドウドメインに特異的に結合すること、免疫蛍光染色法により、HIPK2 の一部は HP1 $\gamma$  と核内で共局在することをそれぞれ確認した。
- 3) HIPK2 による HP1 $\gamma$  のリン酸化活性は *in vitro* kinase assay で確認した。UV-C 照射による HP1 $\gamma$  のリン酸化は、HIPK2 のキナーゼ活性ドメインに変異を導入すると消失することも確認した。さらに、HIPK2 を過剰発現すると、UV-C 照射による  $\gamma$ H2A. X の集積を抑制した。
- 4) HCT116 細胞の HP1 $\gamma$  をノックダウンすると、HIPK2 のノックダウンと同様に、UV-C 照射によるアポトーシスと  $\gamma$ H2A. X の集積が誘導された。
- 5) 免疫沈降法とクロマチン分画法により、HIPK2 は HP1 $\gamma$  とトリメチル化 (Lys9) ヒストン H3 の結合を阻害し、HP1 $\gamma$  をクロマチンから解離させた。

本研究では、HIPK2 は HP1 $\gamma$  を介して損傷した DNA の修復を調節し、クロマチン再構成を制御する可能性を初めて明らかにした。本研究の成果は、HIPK2 による DNA 損傷応答を理解する上で新しい知見を提供するものであり、学位授与に値すると判定した。