

博士論文要約

アクチンファミリーによる
ヒト INO80 クロマチン構造変換複体の
機能制御研究

東北大学大学院農学研究科

応用生命科学専攻

高橋 裕一郎

第1章 序論

すべての真核生物は、ヌクレオソームを基本単位としたクロマチン構造という凝集した高次構造を形成することで、膨大な情報を有したゲノム DNA を微小な核内に収納している。しかし、高度に凝集したクロマチン構造は、基本転写因子や複製因子などの制御因子の結合を阻害するため、クロマチン構造によりゲノム機能は不活性化されている。そのため、ヌクレオソームをスライドさせたり除去したりするクロマチンの構造変換（クロマチンリモデリング）によってゲノム機能が円滑に制御されている。このようなクロマチンの構造変換を行っているのがクロマチンリモデリング複合体である。クロマチンリモデリング複合体は出芽酵母からヒトまで、進化的に広く保存されており、多くのクロマチンリモデリング複合体がその機能に必須な構成因子としてアクチンやアクチン関連タンパク質（actin-related protein ; Arp）を含んでいる^{1,2}。

Arp はアクチンと進化・構造的に関連性を有しており、アクチンと共にアクチンファミリーを形成している。出芽酵母ではアクチンと相同性が高い順に Arp1~Arp10 までの 10 種類が同定されており、これらは ATP 結合部位などの分子内部の構造は非常に類似している。一方、分子表面の構造には違いがみられる。例えば Arp4 はアクチンにはない挿入配列を 2 つ含んでおり（Fig. 1）、このような構造の違いによって性質の違いがもたらされると考えられている³。また、アクチンの大部分が細胞質に局在しているのに対し、Arp4~Arp9 までの Arp は核に局在し、核アクチンとともにクロマチンリモデリング複合体に含まれている。中でも Arp5 および Arp8 は INO80 複合体にのみに特異的に含まれていることが報告されている（Table 1）。

INO80 複合体は、出芽酵母では 15、ヒトでは 13 のサブユニットから構成される巨大分子複合体である。近年、出芽酵母 INO80 複合体の立体構造解析が行われ、Arp5 と Arp8 が複合体中でそれぞれ Arp5 module、Arp8 module という固有の module を形成していることがわかった⁴（Fig. 2）。Arp5 module は INO80 複合体の活性制御に関与しており^{4,5}、一方、Arp8 module は INO80 複合体のクロマチン中へのリクルートに関与する可能性が示されている^{4,6}。このように Arp5 および Arp8 は INO80 複合体に必須の構成因子であり、複合体の機能制御に関与していると考えられている。そこで、我々はこれらの Arp に注目して INO80 複合体の機能について解析をおこなってきた。これまでに、出芽酵母を用いた解析で INO80 複合体が停止した DNA 複製フォークの進行再開に関与すること⁷、INO80 複合体が DNA 二重鎖切断（DNA double strand break ; DSB）部位の核膜への結合に関わることで適切な修復に関与していること⁸など、INO80 複合体がゲノム安定性維持に寄与していることを報告してきた。ヒトにおいても、INO80 複合体が DSB 誘導時に修復因子の発現を促進すること⁹や、Arp8 依存的に DSB 部位にリクルートされること¹⁰など、ゲノム安定性維持に関与することが報告されており、Arp が複合体の機能を制御している可能性が考えられる。

本論文で私は、ヒト B 細胞由来 Nalm-6 細胞を用いて Arp5 および Arp8 の遺伝子破壊細

胞株を作製し、これを用いた解析により、INO80 複合体がヒトにおいても DSB 損傷修復や遺伝子発現制御に関与していることを見出した。また、このような INO80 複合体の機能を Arp が制御していることを明らかにした。さらに、Arp5 および Arp8 に特異的に結合し、その機能性を阻害する可能性が考えられる bicyclic peptides をスクリーニングし、その結合性・機能性評価を行った。

Table 1. The actin family proteins of *Saccharomyces cerevisiae*.

actin-family name	similarity to actin (%)	reported subcellular localization	high molecular mass complex(es)
<u>actin</u>			
Act1	(100)	cytoplasm (nucleus)	cytoskelton NuA4, INO80, SWR1 complexes
<u>ARP</u>			
Arp1	68.6	cytoplasm	dynactin complex
Arp2	69.3	cytoplasm	ARP2/3 complex
Arp3	60.3	cytoplasm	ARP2/3 complex
Arp4	52.5	nucleus	NuA4, INO80, SWRI complexes
Arp5	51.2	nucleus	INO80 complex
Arp6	45.8	nucleus	SWR1 complex
Arp7	43.6	nucleus	SWI/SNF and RSC complexes
Arp8	43.5	nucleus	INO80 complex
Arp9	40.2	nucleus	SWI/SNF and RSC complexes
Arp10	37.6	cytoplasm	(interaction with Arp1)

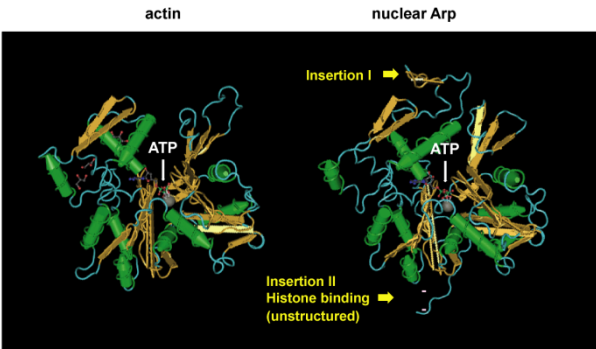


Fig. 1. Crystal structures of *Saccharomyces cerevisiae* actin (right) and Arp4 (left)³. ATP is represented in sticks and the metal ion is displayed as a sphere.

Fenn et al., EMBO J, 2011

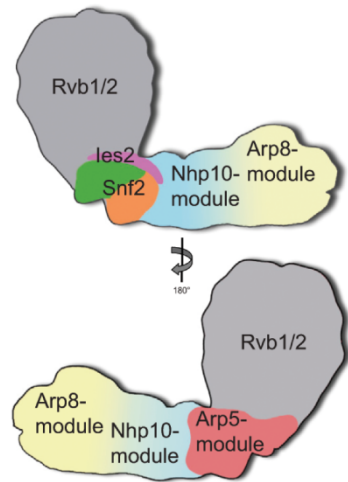


Fig. 2. Assignment of module position of yeast INO80 complex⁴. The Rvb1/2 complex (gray) is located in the head of INO80. The Snf2 ATPase (RecA1, orange; RecA2, green) in the neck is crowned by Ies2 (pink) and has the Arp5 module on the back (red). The Nhp10 module is assigned to the body (blue), and the Arp8 module is assigned to the foot (yellow).

Tosi et al., Cell, 2013

第2章 Arp5 および Arp8 遺伝子欠損 (KO) 細胞の作成とその基本的性質の解析

ヒトにおける INO80 複合体の機能制御への Arp の関与を解析するために、ヒト Nalm-6 細胞を用いて Arp5 および Arp8 の遺伝子破壊細胞株を樹立した (共同研究者である国立遺伝研 西嶋博士の協力を得て作製)。Arp5 KO 細胞は conventional な KO 細胞を、Arp8 KO 細胞はテトラサイクリン誘導によって conditional に発現を制御できる KO 細胞を作製した。これらの細胞からタンパク質を抽出し、抗 Arp5 抗体および抗 Arp8 抗体を用いたウェスタンブロットを行い、それぞれの KO 細胞の樹立を確認した (Fig. 3)。Arp8 KO 細胞は、ノックアウト操作により外来性 Arp8 の発現量が内在性 Arp8 の発現量の 10 倍程度に上がっているが、テトラサイクリン存在下の培養によって発現が抑制された結果、誘導開始後 7 日ではほぼ完全に Arp8 が細胞中からなくなることが確認された。そして、これらの細胞の基本的性質を解析するため、まず細胞増殖を調べた。その結果 Arp5 KO 細胞では細胞増殖に遅れが生じていた (Fig. 4 A)。フローサイトメトリー解析によって Arp5 KO 細胞では細胞周期 G2/M 期に停滞していることもこれまでに示されており (加茂、修論)、これらの結果から Arp5 を完全に欠損することで細胞周期の進行に遅延が引き起こされ、結果として細胞増殖が低下すると考えられる。一方、Arp8 KO 細胞では、Arp8 が完全に細胞からなくなるテトラサイクリン誘導開始後 8 日目以降、細胞増殖が停止していた (Fig. 4 B)。このことから Arp8 も Arp5 同様、正常な内某周期の進行に関与していると考えられる。しかし、Arp5 KO 細胞と Arp8 KO 細胞とでは異なる増殖速度の挙動を示しており、このことから、

- ・これらの Arp が異なる機能性を有している可能性
- ・細胞の正常な生育や INO80 複合体機能において、Arp8 がより重要な役割を担っている可能性

が示唆された。

第3章 DNA 損傷修復への INO80 複合体の関与の解析

DSB が正確に修復されない場合、染色体異常を引き起こし、ガンなどの疾病の発症につながる。これまでに、Arp8 がヌクレオソーム結合能を有していること、ヒトでは INO80 複合体の DSB 部位へのリクルートが Arp8 依存的であることが明らかにされていた。そこで、Arp8 KO 細胞で DSB を誘導した際、染色体や細胞がどのような表現型を示すかを解析した。まず、DNA 複製阻害剤である aphidicolin によって DNA 複製ストレスを与えることで DSB を誘導した際の染色体の様子を顕微鏡下で観察した。その結果、Arp8 KO 細胞では染色体切断頻度が増加していた (Fig. 5)。次に、aphidicolin で DSB を誘導した際の細胞増殖を測定し、増殖阻害率を算出した (Fig. 6)。Fig. 6 のグラフの縦軸はこの増殖阻害率を示しており、阻害率 0% は aphidicolin の有無によって細胞増殖に差がないことを示す。一方、阻害率 100% は aphidicolin 添加によって細胞数の増加が見られなくなったことを示し、100% を超える値は aphidicolin を添加した際、細胞数が減少したことを示して

いる。測定の結果、Arp8 KO 細胞では野生型の細胞と比較して増殖阻害率が顕著に増加していた (Fig. 6)。同様の解析を別の DSB 誘導剤である camptothecin 存在下で行ったところ、aphidicolin 添加時と同様、Arp8 KO 細胞では増殖阻害率が有意に増加していた (Fig. 7)。さらに、細胞を camptothecin で処理した際、処理後 2 時間および 8 時間の時点で Arp8 KO 細胞では野生型細胞と比較して DSB のマーカーである γ -H2AX の foci 数が有意に増加していることも確認された (村上、2014)。Aphidicolin および camptothecin によって引き起こされた DSB は相同組換え修復あるいは類似の修復機構によって修復されることから、これらの結果は Arp8 欠損により、正常な相同組換え修復機構が働かず、アポトーシスが誘導されていると考えられる。

第 4 章 INO80 複合体の酸化ストレス応答への関与の解析

酸化ストレスによって形成される活性酸素種は、ゲノム DNA や様々な細胞内器官に傷害を与える。細胞はこのような酸化ストレスに対し、酸化ストレス応答遺伝子の発現を誘導することで細胞の恒常性を維持する。近年、INO80 複合体がこれらの遺伝子発現制御に関与している可能性が共同研究者によって報告された¹² (Fig. 8)。そこで、Arp5 KO 細胞および Arp8 KO 細胞を用いてマイクロアレイ解析を行い、これらの遺伝子の欠損により発現が down-regulate された遺伝子を抽出した。その結果、酸化ストレス非存在下の結果と比較して、酸化ストレス存在下ではこれらの KO 細胞の両方で down-regulate された遺伝子数が有意に増加していた。Arp5 KO 細胞、Arp8 KO 細胞の両方で共通して down-regulate されたこれらの遺伝子は、INO80 複合体によってその発現が制御されていることを示している。そこで、酸化ストレス防御の律速酵素の 1 つであり、発現制御機構や転写制御因子の解析が進んでいる *Heme oxygenase-1* (*HO-1*) 遺伝子に着目して、その発現制御機構への INO80 複合体の関与と、その複合体機能制御において Arp の担う役割を解析した。まず、RT-PCR により、Arp5 KO 細胞および Arp8 KO 細胞における *HO-1* の発現量を測定し、野生型細胞の発現量と比較した。その結果、これらの KO 細胞では非酸化ストレス条件下においても *HO-1* の発現量が減少していた。さらに、酸化ストレスを与え、*HO-1* の発現を誘導した際、Arp5 KO 細胞、Arp8 KO 細胞の両方で *HO-1* の発現活性化がほとんど起きていなかった。この結果は INO80 複合体が *HO-1* の発現制御に関与していることを示唆している。そこで、INO80 複合体が *HO-1* の発現制御に直接関与しているのかを明らかにするために、*HO-1* 遺伝子上流に存在する 2 つの発現制御領域 (E2、E1) への INO80 複合体の結合をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により解析した。発現誘導時に INO80 複合体が結合しないことがすでに報告されている Rad54B の第 9 イントロン⁹と比較して、Ino80 (INO80 複合体の酵素サブユニット) は酸化ストレスがない状態でも E1 に有意に結合していた。さらに酸化ストレス条件下では、Ino80 の E1 への結合量が増加し、E2 における有意な結合も検出された。一方、Arp5 は酸化ストレスがない状態でも E2、E1 の両方に対して有意な結合が観察された。さらに、酸化ストレス時には、Ino80 同様、その結合量が増

加することが示された。これらの結果から、INO80 複合体が *HO-1* の発現制御に直接関与していることが示された。そこで、この INO80 複合体の機能制御において Arp5 が担う役割を解析することにした。まず、Arp5 が INO80 複合体のクロマチンへのリクルートに寄与しているのかを解析するために、Arp5 KO 細胞における E2、E1 への Ino80 の結合状態を検出した。その結果、E2、E1 への Ino80 の結合状態は酸化ストレスの有無によらず野生型細胞と Arp5 KO 細胞との間で有意な差は検出されなかった。次に、nuclease accessibility assay を行い、Arp5 の有無が INO80 複合体のクロマチンリモデリング活性に与える影響を調べた（村上、卒論）。GAPDH のプロモーター領域を基準として、E2、E1、HO-1 のプロモーター領域、HO-1 の第 5 エキソンのクロマチン構造を評価したところ、野生型の細胞では *HO-1* の上流のクロマチン構造がオープンになっていた。一方、Arp5 KO 細胞では E1 でのみ有意差が検出された。これらの結果は Arp5 が INO80 複合体のクロマチンへのリクルートではなく、そのクロマチンリモデリング活性の制御に関与していることを示している。そこで、INO80 複合体による *HO-1* 遺伝子上流領域のクロマチン構造変換が、*HO-1* の転写制御機構にどのような影響を与えるか解析した。E2、E1 には転写因子が結合することで *HO-1* の発現を制御していることが知られている。通常条件下では repressor がこれらの領域に結合することで、HO-1 の発現を抑制する。酸化ストレス条件下では、repressor が解離し、かわりに activator が結合することで HO-1 の発現が活性化される。そこで、INO80 複合体機能の有無がこれらの転写因子の結合状態に与える影響を解析した。その結果、酸化ストレスおよび INO80 複合体機能の有無によらず、repressor の結合量に有意な差は検出されなかった。しかし、酸化ストレス条件下での activator の結合量は Arp5 KO 細胞では野生型細胞のおよそ半分程度まで減少していた。この結果から、Arp5 KO 細胞では酸化ストレス時に activator が結合しにくいために *HO-1* の発現が活性化されないことが示された。これらをまとめると、INO80 複合体による *HO-1* の発現制御および複合体機能において Arp5 が担う役割について、Fig. 9 のモデルが考えられる。野生型の細胞では、酸化ストレス時にまず E2、E1 への INO80 複合体のリクルート量が増加し、Arp5 が INO80 複合体のクロマチンリモデリング機能を活性化することで、これらの領域やその周辺のクロマチン構造を緩める。このクロマチンの構造変換により、*HO-1* 発現制御領域に結合する転写因子が repressor から activator へと変換されることで、*HO-1* の発現が活性化される。一方、Arp5 KO 細胞では、酸化ストレス時に INO80 複合体は E2、E1 に結合しているものの、Arp5 を欠損しているために INO80 複合体が活性化されず、クロマチンが凝集したままになっている。そのため、*HO-1* の発現制御領域に activator が結合できず *HO-1* の発現が活性化されないと考えられる。このように、INO80 複合体は DNA 修復への直接的関与に加えて、酸化ストレス応答遺伝子の発現制御によっても、ゲノム DNA や細胞の恒常性維持に寄与していることが示された。また、Arp5 が INO80 複合体のクロマチンリモデリング活性の制御に重要であることを in vivo の実験系で初めて明らかにした。

第5章 Arp5 および Arp8 に結合する bicyclic peptide のスクリーニングとその結合性の解析

第4章までの解析で、ヒトにおいても Arp5 および Arp8 が INO80 複合体の機能制御に重要な役割を担っていることが明らかになった。そこで、これらの役割をさらに解析し、応用に結びつけるためのツールを得る目的で、Arp5 および Arp8 に結合する bicyclic peptide をスクリーニングした。

bicyclic peptide は一定間隔おきに 3 つのシステインを含んでおり、これに TBMB や TATA といった linker を作用させることで、2 つの環状構造を内部に形成させたペプチドである。linear 型のペプチドはその構造が不定形となるために、標的タンパク質のどの部位にどの程度の affinity で結合するかが定まらない。一方、bicyclic peptide は形成した 2 つの環構造により、その構造や flexibility がある程度制限されるために、標的タンパク質の特定の部位に、安定した affinity で結合することが可能である¹¹ (Fig. 10)。加えて、分子サイズが抗体のおよそ 1/100 程度、分子量も 2~3 kDa と非常に小さく、そのアミノ酸配列が同定されるため、化学合成が非常に容易である。このことから、次世代医薬品としての応用が期待されている。

Bicyclic peptide のスクリーニングは phage display を用いた biopanning 法によって行い、その進行はファージの titer を測定することで評価した。スクリーニングが適切に行われていた場合、標的タンパク質と affinity selection を行わなかったファージと比較して titer に著しい差が検出される。およそ $10^3 \sim 10^4$ ほど titer に差が検出されれば、標的タンパク質に対する bicyclic peptide がスクリーニングできていると判断できる。Arp8 および Arp5 に対するペプチドのスクリーニングでは、linker として TBMB、TATA のどちらを用いた場合も 3 回目のセレクションが終了した時点で titer に十分な差が検出されたことから、これらの Arp に結合するペプチドがスクリーニングされたと判断し、ペプチドのアミノ酸配列を解析した。その結果、Arp8 に対するペプチドが 28 種類 (TBMB : 14 種類、TATA : 14 種類)、Arp5 に対するペプチドが 33 種類 (TBMB : 18 種類、TATA : 15 種類) 取得された。標的タンパク質の同じ部位に結合するペプチド中では、そのアミノ酸配列の similarity が高くなることがわかっている。そのため、ペプチドを配列中のアミノ酸の性質ごとに特徴付けし比較解析を行うことで similarity の有無を確認できる。本研究で得られたペプチドのアミノ酸配列を比較したところ、Arp8 に対するペプチドの中に、アミノ酸配列が高い similarity を有しているペプチドが多数あることがわかった。Arp5 に対するペプチド中でも similarity の高さが確認できたことから、得られたペプチドは Arp8 および Arp5 に対する結合性を有していると考えられる。アミノ酸配列の比較解析の結果で得られた similarity をもとに、いくつかのペプチドを合成し、大腸菌で発現、精製したリコンビナントな Arp8 および Arp5 との結合を蛍光偏光法で測定した (共同研究者、Bertold によって実施)。蛍光偏光法の結果をもとに、解離定数 (K_d 値) を算出したところ、3 種類のペプチドが Arp8 に対して高い結合性を有していた。Arp5 に対しては 3 種類のペプチドと 1 種類

の改良型ペプチドが高い結合性を有していた (Fig. 11)。蛍光偏光法の結果を踏まえ、以降の実験ではこれらのペプチドの細胞由来 Arp への結合性を評価した。免疫沈降を用いた実験系により、細胞由来 Arp8 および Arp5 への各ペプチドの結合性を解析した。その結果、 K_d 値が 1 μ M 未満のペプチド 4 種類 (Arp8 に対するペプチド 2 種類、Arp5 に対するペプチド 1 種類) はそれぞれの Arp に対して同程度の結合性を示した。得られたペプチドが細胞由来の標的タンパク質に対しても高い結合性を示したことから、Arp8、Arp5 に対するペプチドが分子機能解析や INO80 複合体機能の人為的制御に利用できると考えられる。

第 6 章 総合考察

本博士論文研究を通じ、INO80 複合体がヒトにおいて、

- ・ DSB 損傷修復への関与
- ・ 酸化ストレス時の HO-1 の発現制御

という 2 つの機構を通じ、ゲノム安定性維持に寄与していることを見出した。さらに、この INO80 複合体の機能制御において、Arp5 は INO80 複合体のクロマチンへのリクルートではなく、そのクロマチンリモデリング活性を制御していることを明らかにした。

INO80 複合体によりクロマチンへの結合が制御されることが示された activator は、HO-1 遺伝子に加え、種々の抗酸化酵素や第二相解毒酵素などの遺伝子の master regulator であることが知られている。通常の細胞では、この activator は酸化ストレスや親電子物質に応答して標的遺伝子の発現を活性化する。これらの遺伝子産物が細胞防御機構を増強することで、ゲノム DNA や細胞の恒常性を維持し、がんをはじめとする疾病の発症を抑制している。このことから、INO80 複合体がこれらの遺伝子においてもこの activator の結合配列への結合に関与し、その発現を制御することで、細胞の恒常性やゲノムの安定性維持に広く寄与していると考えられる (Fig. 12(A))。

一方、肺がんを中心とした複数のがん細胞において、この activator が定常的に安定化し、そのターゲット遺伝子の発現が常に活性化されることで、抗がん剤などに対する抵抗性の獲得につながっていると考えられている。もし、がん細胞においても INO80 複合体がこの activator の結合配列へのリクルートに関与しているのだとすれば、INO80 複合体の機能の抑制によってこの activator の標的遺伝子の発現を低下させることが、がんにたいする有効な治療戦略となる可能性が考えられる。第 5 章で得られた Arp8 および Arp5 に結合するペプチドはこの戦略において非常に有用なツールとなる可能性を秘めていることから、今後はその可能性についても検討していくことを予定している (Fig. 12 (B))。

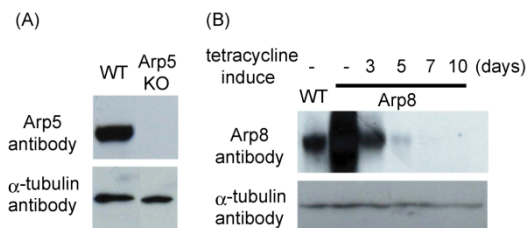


Fig. 3. Western blot analysis of Arp5 and Arp8 in human Nalm-6 cell lines. (A) Whole-cell extracts were prepared from wild-type (WT) and Arp5 deficient cells, and Arp5 was detected with an Arp5 antibody. α -tubulin was also detected as a control. (B) Whole-cell extracts were prepared from WT and Arp8 deficient cells at the indicated times after the addition of 2 μ g/ml of tetracycline. Arp8 was detected with an Arp8 antibody. α -tubulin was also detected as a control.

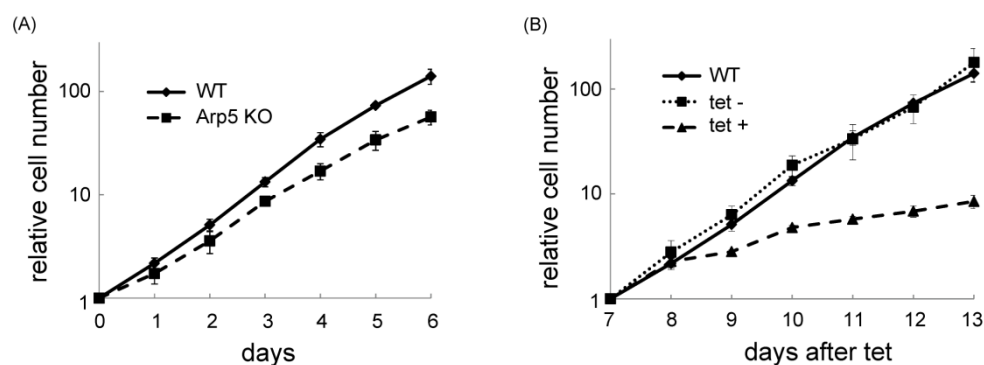


Fig. 4. Representative growth curves of WT and Arp5 deficient cells (A), and of WT and Arp8 deficient cells (B). Results represented as fold increase in cell number. The averages of three independent experiments with standard deviation are shown.

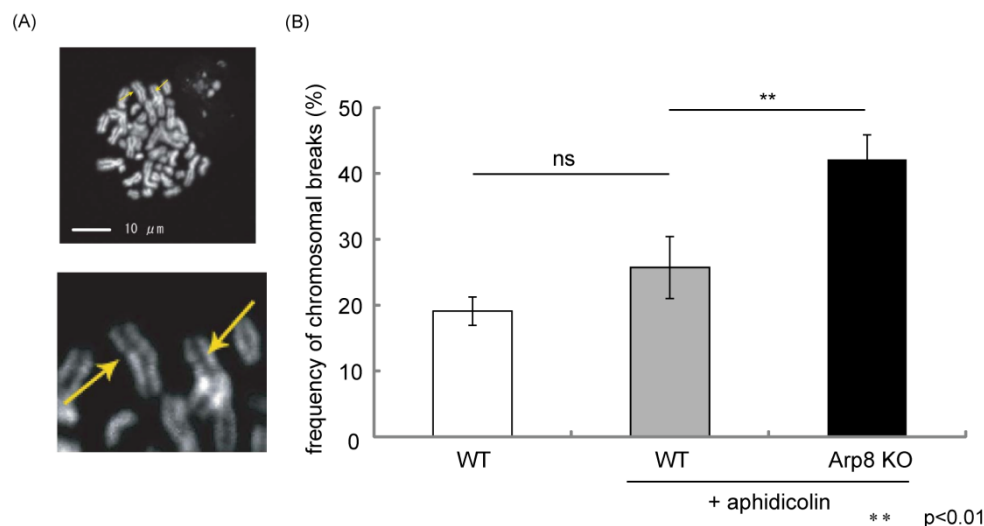


Fig. 5. Representative mitotic chromosome spreads image with chromosomal breaks in Arp8 deficient cells (A) and frequency of chromosomal breaks (B). Mitotic chromosome spreads were prepared from WT and Arp8 deficient cells cultured in the absence or presence of 25 μ M aphidicolin for 48 hrs. Frequency of breaks in mitotic chromosomes were compared. Error bars indicate average mean \pm standard deviation.

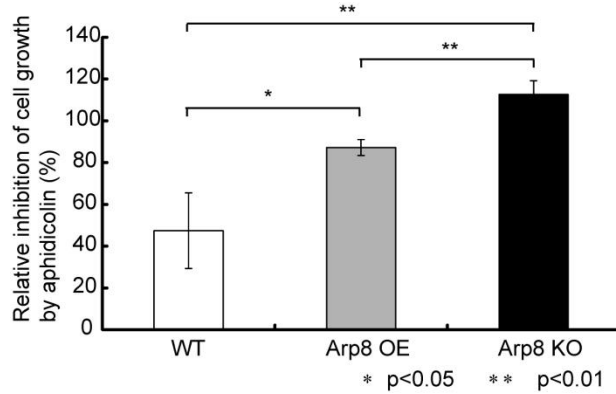


Fig. 6. Relative inhibition of cell growth by aphidicolin. Sensitivity of WT, Arp8 over expression (Arp8 OE) and Arp8 deficient (Arp8 KO) cells to aphidicolin was calculated as follows: $\frac{[(\text{cell number at 48 h} - \text{cell number at 0 h}) \text{ in the absence of aphidicolin} - (\text{cell number at 48 h} - \text{cell number at 0 h}) \text{ in the presence of aphidicolin}] \times 100}{[(\text{cell number at 48 h} - \text{cell number at 0 h}) \text{ in the absence of aphidicolin}]}$. The averages of three independent experiments with standard deviation are shown.

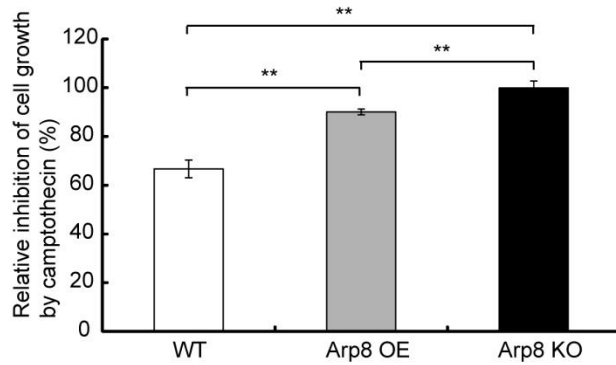


Fig. 7. Relative inhibition of cell growth by camptothecin. WT, Arp8 OE and Arp8 deficient cells were treated with 1 μ M camptothecin for 1 h. After washing out the reagent, the relative inhibition by camptothecin was shown as in Fig. 6. The averages of three independent experiments with standard deviation are shown.

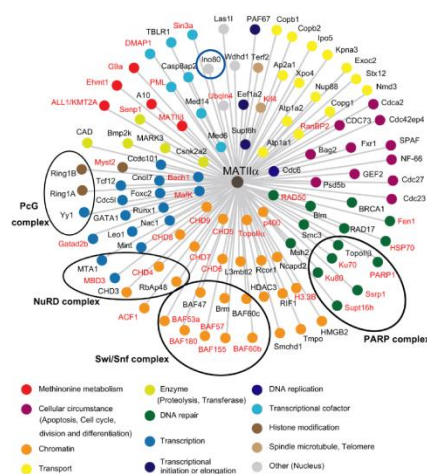


Fig. 8. MAT1 α -associated proteins were categorized by gene ontology (GO) annotations as listed in the Mus musculus Genome Database. Proteins found in the MafK complex which is a transcription factor of heme oxygenase-1 (HO-1) are shown in red. Ino80, an ATPase subunit of the INO80 complex, is denoted in blue circle. (Kato et al., Moll Cell, 2011)

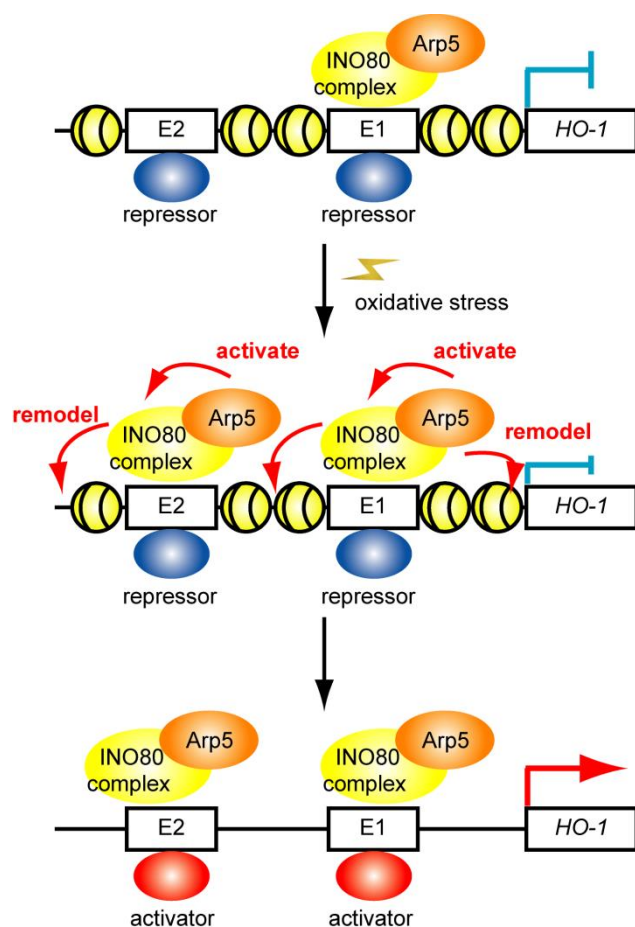


Fig. 9. A schematic model depicting the role of INO80 complex and Arp5 in the regulation of HO-1 expression. Although the INO80 complex binds to HO-1 enhancer region, HO-1 expression is repressed under non-stress conditions. When cells are exposed to oxidative stress, INO80 complex binding is increased. At this time, the INO80 complex is activated by Arp5 and remodels chromatin structure. Owing to this structural conversion, the activators could be recruited to enhancers and HO-1 expression is activated.

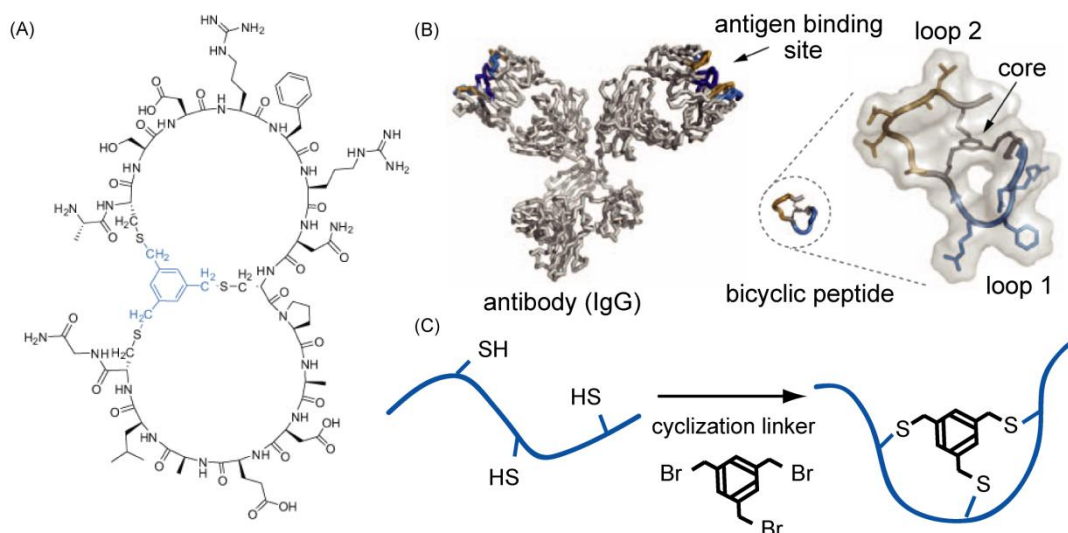


Fig. 10. Bicyclic peptide¹¹. (A) Chemical structure of a bicyclic peptide. (B) Comparison of a bicyclic peptide with an antibody. The molecular size of bicyclic peptide (1-3 kDa) is approximately 100-fold smaller than that of the antibody (150 kDa). Although the antigen binding sites are restricted to a small space in antibody (highlighted in color), the two binding loops of bicyclic peptide represent the major component of the structure. (C) The linear peptide having 3 Cys is reacted with cyclization linkers and is formed into bicyclic structure.

Heinis et al., Nature Chemical Biology, 2009

name	sequence																	linker	K_d (μ M)
Arp8-1	A	C	D	Q	G	R	W	L	C	R	E	L	G	W	T	C	G	TBMB	0.16
Arp8-4	A	C	R	Q	E	R	F	W	C	I	G	S	G	E	N	C	G	TBMB	0.71
Arp8-7	A	C	R	G	T	P	W	G	C	D	F	L	S	V	G	C	G	TATA	7

name	sequence																	linker	K_d (μ M)
Arp5-2	A	C	S	S	N	L	Y	P	C	L	G	H	Y	Q	A	C	G	TBMB	7.6
Arp5-9	A	C	A	Q	Y	V	S	F	A	G	W	S	E	Y	C	G		oxydized	3.3
Arp5-11	A	C	F	V	P	G	F	G	W	S	F	E	V	G	C	G		oxydized	0.19
Arp5-11 short	A	C	F	V	P	G	F	G	W	S	F	E	C	G				oxydized	0.13(n=1)

Fig. 11. The list of peptides which have high affinity to recombinant Arp8 or Arp5. Some peptides were synthesized and evaluated in the binding to recombinant target proteins by fluorescence polarization assay. Peptides showing high affinity to the targets were listed, and their dissociation constant (K_d) were shown.

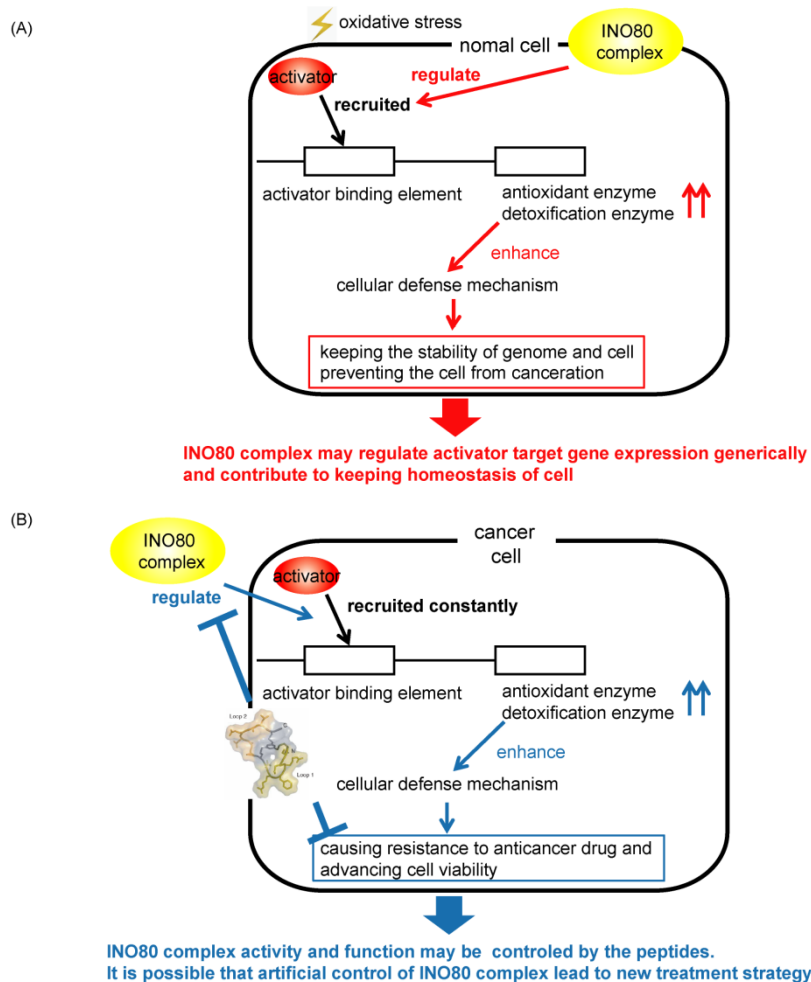


Fig. 12. Outlook for the future. (A) In normal cells, one of *HO-1* activators is known as a master regulator of many antioxidant and detoxification enzymes. It is possible that INO80 complex contributes to the regulation of these enzymes expression and keeping cell and genome stability. (B) In cancer cells, this activator is recruited and the target gene expression is activated constantly. The Arp8 or Arp5 binding peptides will be utilized as a new treatment strategy.

References

1. Oma Y, Harata M (2011) Actin-related proteins localized in the nucleus: from discovery to novel roles in nuclear organization. *Nucleus* 2: 38–46.
2. Dion V, Shimada K, Gasser SM (2010) Actin-related proteins in the nucleus: life beyond chromatin remodelers. *Curr Opin Cell Biol* 22: 383–391.
3. Fenn S, Breitsprecher D, Gerhold CB, Witte G, Faix J et al. (2011) Structural biochemistry of nuclear actin-related proteins 4 and 8 reveals their interaction with actin. *EMBO J* 30: 2153–2166.
4. Tosi A, Haas C, Herzog F, Gilmozzi A, Berninghausen O et al. (2013) Structure and subunit topology of the INO80 chromatin remodeler and its nucleosome complex. *Cell* 154: 1207–1219.
5. Jonsson, Z. O., S. Jha et al. (2004) Rvb1p/Rvb2p recruit Arp5p and assemble a functional Ino80 chromatin remodeling complex. *Molecular Cell*, 16: 465-477.
6. Gerhold CB, Winkler DD, Lakomek K, Seifert FU, Fenn S et al. (2012) Structure of Actin-related protein 8 and its contribution to nucleosome binding. *Nucleic Acids Res* 40: 11036–11046.
7. Shimada K, Oma Y, Schleker T, Kugou K, Ohta K et al. (2008) Ino80 chromatin remodeling complex promotes recovery of stalled replication forks. *Curr Biol* 18: 566–575.
8. Horigome C, Oma Y, Konishi T, Schmid R, Marcomini I et al. (2014) SWR1 and INO80 chromatin remodelers contribute to DNA double-strand break perinuclear anchorage site choice. *Molecular Cell*, 55: 626-639
9. Park, E. J., S. K. Hur et al. (2010). Human INO80 chromatin-remodelling complex contributes to DNA double-strand break repair via the expression of Rad54B and XRCC3 genes. *Biochem J* 431(2): 179-187

10. Kashiwaba S, Kitahashi K, Watanabe T, Onoda F, Ohtsu M et al. (2010) The mammalian INO80 complex is recruited to DNA damage sites in an ARP8 dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun* 402: 619–625.
11. Heinis C, Rutherford T, Freund S, Winter G (2009) Phage-encoded combinatorial chemical libraries based on bicyclic peptides. *Nature Chemical Biology* 5; 502 – 507
12. Katoh Y, Ikura T, Hoshikawa Y, Tashiro S, Ito T, Ohta M et al. (2011) Methionine adenosyltransferase 2 serves as a transcriptional corepressor of Maf oncoprotein. *Mol Cell*. 41 (5): 554-566