

たかはし ゆういちろう

氏名（本籍地） 高橋 裕一郎

学位の種類 博士（農学）

学位記番号 農博第 1112 号

学位授与年月日 平成 27 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項

研究科，専攻 東北大学大学院農学研究科（博士課程）応用生命科学専攻

論文題目 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合体の機能制御  
研究

博士論文審査委員 （主査）准教授 原田 昌彦

教授 五味 勝也

教授 内田 隆史

博士論文内容要旨

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合体の  
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

指導教員

原田 昌彦 准教授

## 第1章 序論

すべての真核生物は、クロマチン構造という高次構造を形成することで膨大なゲノム 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、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<sup>1,2</sup>。

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、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<sup>3</sup>。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、酵母からヒトまで進化的に保存されたクロマチンリモデリング複合体の 1 つである。出芽酵母 INO80 複合体の立体構造解析から、Arp5 と Arp8 が複合体中でそれぞれ固有の module を形成していることがわかった<sup>4</sup> (Fig. 2)。Arp5 module は INO80 複合体の活性制御に関与しており<sup>4,5</sup>、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<sup>4,6</sup>。このように Arp5、Arp8 は INO80 複合体の機能制御に必須の構成因子である。そこで、我々は 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<sup>7</sup>、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<sup>8</sup>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<sup>9</sup>や、Arp8 依存的に DSB 部位にリクルートされること<sup>10</sup>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)
<b>actin</b>			
Act1	(100)	cytoplasm (nucleus)	cytoskeleton NuA4, INO80, SWR1 complexes
<b>ARP</b>			
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, SWR1 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)

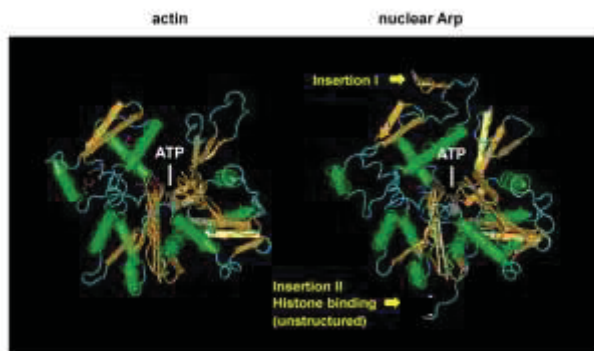


Fig. 1. Crystal structures of *Saccharomyces cerevisiae* actin (right) and Arp4 (left)<sup>3</sup>. ATP is represented in sticks and the metal ion is displayed as a sphere.

Fenn et al., EMBO J, 2011

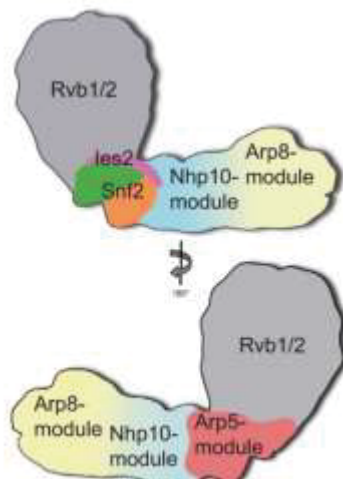


Fig. 2. Assignment of module position of yeast INO80 complex<sup>4</sup>. The Rvb1/2 complex (gray) is located in the head of INO80. The Snf2 ATPase (RecA1, orange; RecA2, green) in the neck is crowned by Ies2 (pink) and has the Arp5 module on the back (red). The Nhp10 module is assigned to the body (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) 細胞の作製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 (Fig. 3) (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 は conventional な KO 細胞を、Arp8 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。細胞増殖を調べたところ、Arp5 KO 細胞では細胞増殖に遅れが生じていた (Fig. 4 A)。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)。これらの結果から、ヒトにおいても Arp5、Arp8 が異なる機能性を有していることが示された。

## 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。ヒトにおける INO80 複合体のゲノム安定性維持への寄与について解析するために、DSB 誘導時の細胞の表現型を調べた。その結果、DNA 複製阻害剤である aphidicolin 存在下で、Arp8 KO 細胞では染色体切断頻度 (Fig. 5) および増殖阻害率が有意に増加していた (Fig. 6)。さらに、別の DSB 誘導剤である camptotecin 存在下でも Arp8 KO 細胞では増殖阻害率が有意に増加していた (Fig. 7)。これらの結果は Arp8 欠損により、正常な DSB 修復機構が働かなかったことを示唆している。

## 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。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 (Fig. 8)。そこで、酸化ストレス防御の律速酵素である Heme oxygenase-1 (HO-1) をモデルとして、その発現制御機構への INO80 複合体の関与と Arp の役割を解析した。RT-PCR により、WT と Arp5 KO 細胞および Arp8 KO 細胞の間では、酸化ストレスの有無によらず HO-1 発現量に著しい差があることがわかった (Fig. 9)。そこで、HO-1 遺伝子上流に存在する 2 つの発現制御領域 (E2、E1) (Fig. 10. A) への INO80 複合体の結合をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) (Fig. 10 B) により解析した。その結果、INO80 複合体がこれらの領域に結合していることが示された (Fig. 10. C)。また、野生型細胞と Arp5 KO 細胞との間で HO-1 発現制御領域への INO80 複合体の酵素サブユニット Ino80 の結合に有意な差はなかった (Fig. 11)。しかし、Arp5 KO 細胞では酸化ストレス時に HO-1 遺伝子上流のクロマチン構造が凝集していることが示された (Fig. 12)。これらのことから、Arp5 は INO80 複合体

のクロマチン中へのリクルートには関与しないが、複合体の活性化に関与していることが示唆された。さらに Arp5 KO 細胞では、酸化ストレス時に HO-1 の activator である Nrf2 の E2、E1 への結合量が減少していた (Fig. 13)。これらの結果から、野生型細胞では、酸化ストレス条件下で INO80 複合体の HO-1 発現制御領域への結合が増加し、INO80 複合体の活性化によって、その周辺のクロマチン構造が変換されること、またこの構造変換により HO-1 発現制御領域への activator の結合が可能となり、HO-1 の発現が活性化されることが示唆された。この過程において、Arp5 がこの INO80 複合体のクロマチンリモデリング活性を制御していることが示された (Fig. 14)。このように、DNA 修復への直接的関与に加えて、INO80 複合体による酸化ストレス応答遺伝子の発現制御によっても、これらの Arp がゲノム DNA や細胞の恒常性維持に寄与していることが示された。

## 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。この 2 つの環構造により標的タンパク質に強く結合するという特徴を有する<sup>11</sup> (Fig. 15)。

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。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 (Fig. 16)。そこで、ペプチドのアミノ酸配列を解析したところ、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。そこで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。その結果、Arp8 に対しては 3 種類のペプチドが高い結合性を示し、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示した (Fig. 17)。免疫沈降により回収した細胞由来の Arp へのこれらのペプチドの結合性を検証したところ、蛍光偏光法の結果とほぼ同様の結合性を示した (Fig. 18. B)。これらの結果はスクリーニングによって得られた 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ことを示している。

## 第6章 総合考察

本研究により、INO80 複合体がヒトにおいても、DSB 修復や転写に関与することで、ゲノム安定性維持に寄与していることが示された。さらに、ヒト Arp5 が複合体の活性化に重要な役割を担っており、クロマチン構造を変換することで転写因子の結合状態に影響を与えていることを *in vivo* で初めて明らかにした。

Arp5 KO 細胞では、INO80 複合体が活性化しないためにクロマチン構造変換が起こらず、Nrf2 による遺伝子発現の活性化が抑制されていることが示された。Nrf2 はストレス刺激に応答して、酸化ストレス応答遺伝子や第二相解毒酵素の発現を活性化していることが知られている。このことから、INO80 複合体がこれらの遺伝子においても Nrf2 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。一方、ある種のガン細胞は、Nrf2 が定常的に安定化し、Nrf2 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している。そのため、INO80 複合体の機能の抑制は、Nrf2 ターゲット遺伝子の発現低下を引き起こすことから、INO80 複合体制御化合物ががんに対する創薬につながる可能性が考えられる。本研究において取得されたペプチドは、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。今後はペプチドの細胞導入を試みると共に、その機能性などをよりさらに解析することで、この可能性についても検討していく。

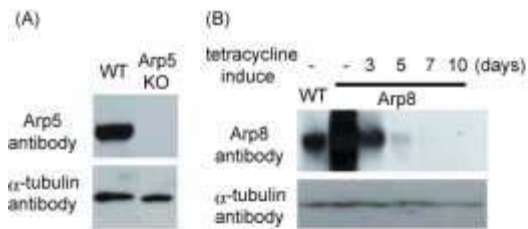


Fig. 3. Western blot analysis of Arp5 and Arp8 in human Nalm-6 cell lines. (A) Whole-cell extracts were prepared from wild-type (WT) and Arp5 deficient cells, and Arp5 was detected with an Arp5 antibody.  $\alpha$ -tubulin was also detected as a control. (B) Whole-cell extracts were prepared from WT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

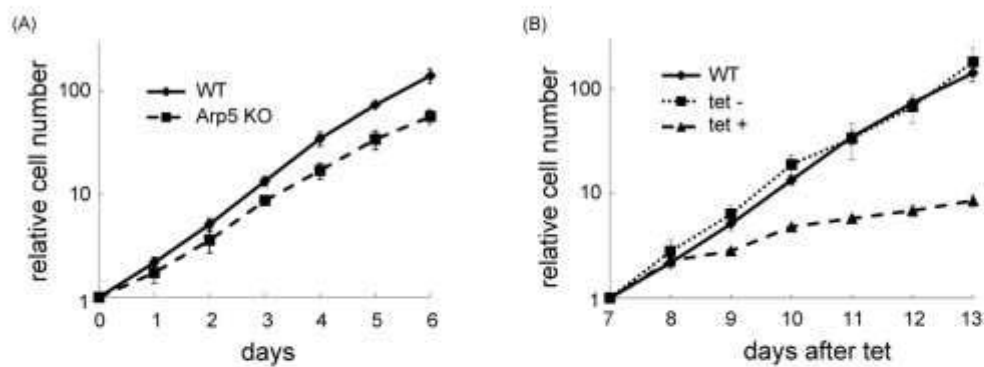


Fig. 4. Representative growth curves of WT and Arp5 deficient cells (A), and of WT and Arp8 deficient cells (B). Results represented as fold increase in cell number. The averages of three independent experiments with standard deviation are shown.

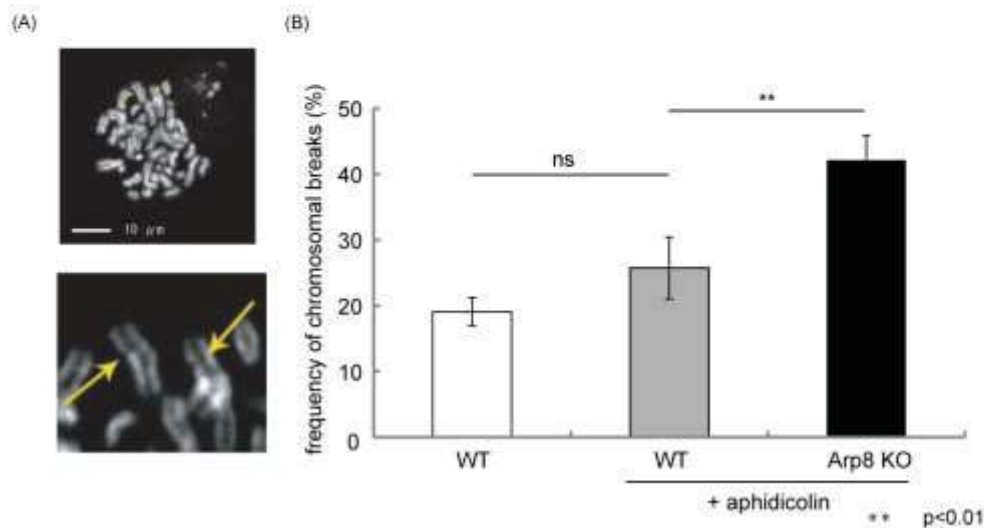


Fig. 5. Representative mitotic chromosome spreads image with chromosomal breaks in Arp8 deficient cells (A) and frequency of chromosomal breaks (B). Mitotic chromosome spreads were prepared from WT and Arp8 deficient cells cultured in the absence or presence of 25  $\mu$ M aphidicolin for 48 hrs. Frequency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



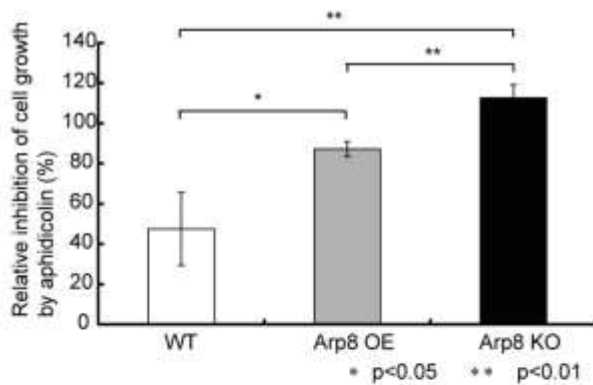


Fig. 6. Relative inhibition of cell growth by aphidicolin. Sensitivity of WT, Arp8 over expression (Arp8 OE) and Arp8 deficient (Arp8 KO) cells to aphidicolin was calculated as follows:  $\frac{[(\text{cell number at 48 h} - \text{cell number at 0 h}) \text{ in the absence of aphidicolin} - (\text{cell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

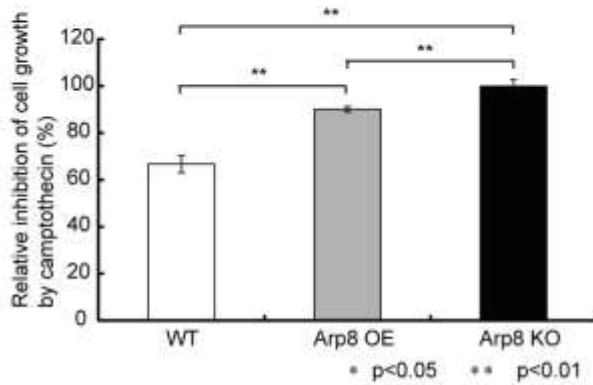


Fig. 7. Relative inhibition of cell growth by camptothecin. WT, Arp8 OE and Arp8 deficient cells were treated with 1  $\mu\text{M}$  camptothecin for 1 h. After washing out the reagent, the relative inhibition by camptothecin was shown as in Fig. 6. The averages of three independent experiments with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

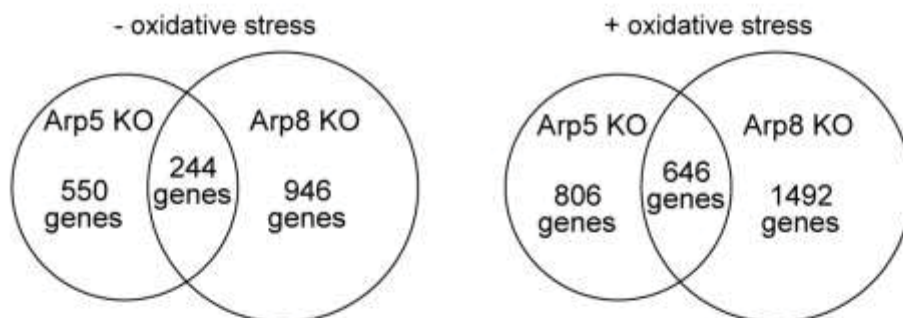


Fig. 8. Microarray analysis of cells without (left) or with (right) oxidative stress. The venn diagram shows the number of genes which were significantly down-regulated in Arp5 and Arp8 deficient cell under each condition.

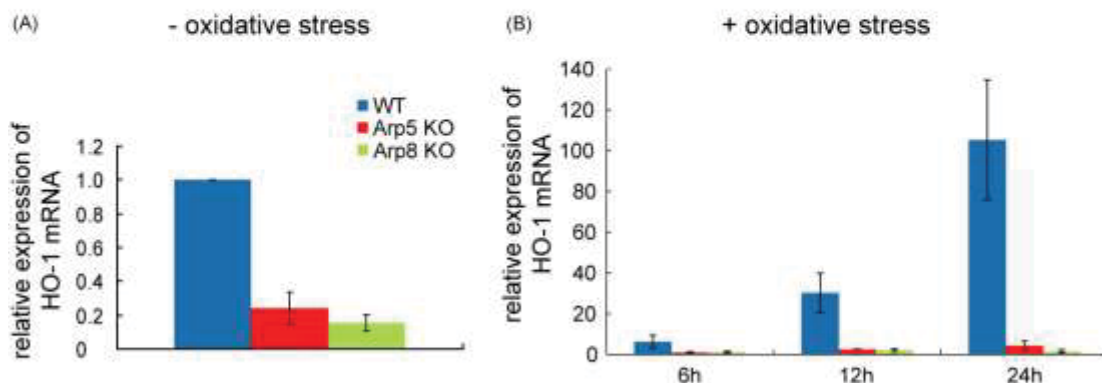


Fig. 9. The INO80 complex is involved in HO-1 gene transcription activation. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) analysis of HO-1 mRNA in WT, Arp5 deficient and Arp8 deficient cells. Cells were treated without (A) or with (B) 20  $\mu\text{M}$  Heme, an oxidative stress inducer for indicated time. The expression level of HO-1 gene in WT cells under normal condition was arbitrarily set at 1. The expression of 36B4 was used to normalize the results. The averages of three independent experiments with standard deviation are shown.

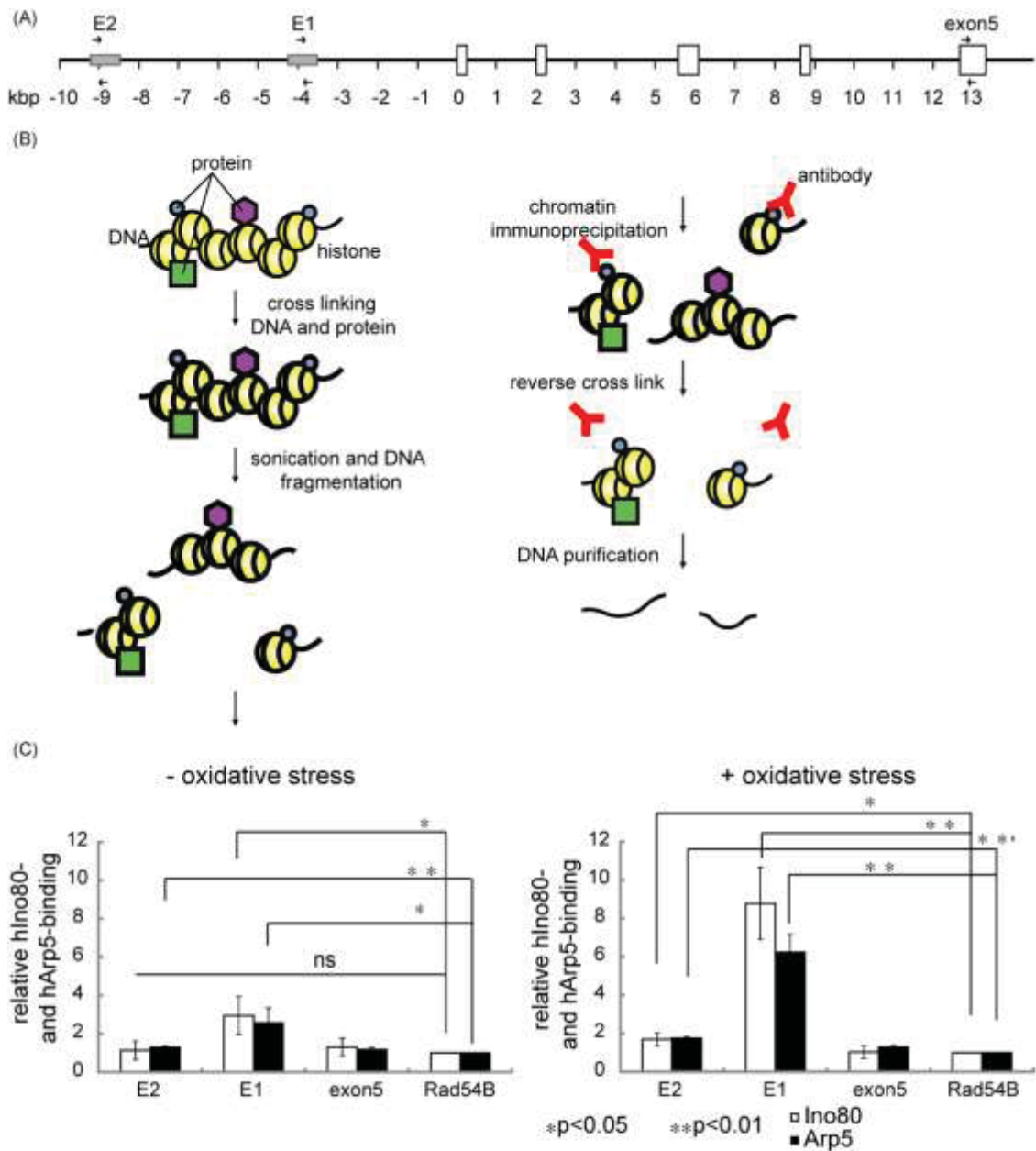


Fig. 10. Analyses of the binding of INO80 complex in HO-1 expression control regions. (A) Schematic representation of human HO-1 promoter loci. Arrows indicate PCR primer pairs for ChIP analysis. (B) Principle of quantitative chromatin immunoprecipitation (q-ChIP) assay. By adding formaldehyde to cell culture, histones and other proteins were covalently cross-linked with DNA. Soluble chromatin was prepared by sonicating the lysates from the cell pellet. The chromatin fraction was mixed with proteinA or G beads bound to an antibody. DNA was purified from the complexes, and the presence of specific sequences in the complexes were tested by quantitative PCR. (C) ChIP assays were performed by using antibodies for Ino80 or Arp5 with WT cells. Relative levels of enrichment of each genomic DNA region are shown. The graphs show three independent experiments with standard deviation. P values (Student' s t test) are indicated.

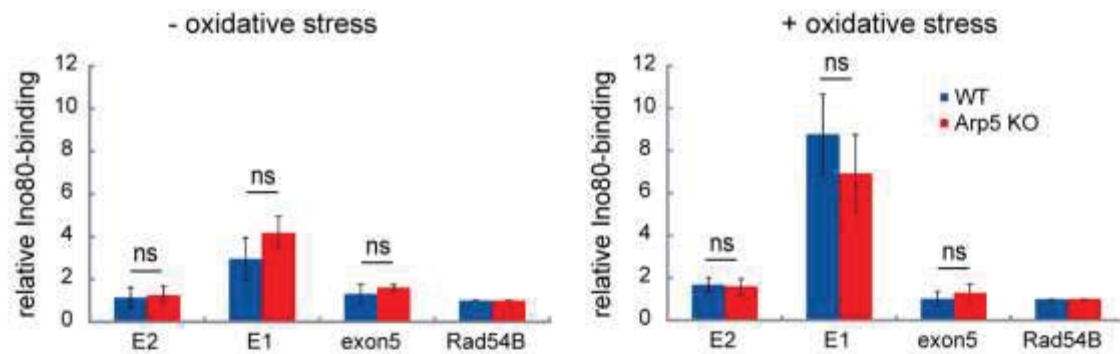


Fig. 11. Detection of the Ino80 binding to the HO-1 expression regulatory elements in WT and Arp5 deficient cells. ChIP assays were performed by using antibody for Ino80. Relative enrichment of each genomic DNA region are shown. The graphs show three independent experiments with standard deviation.

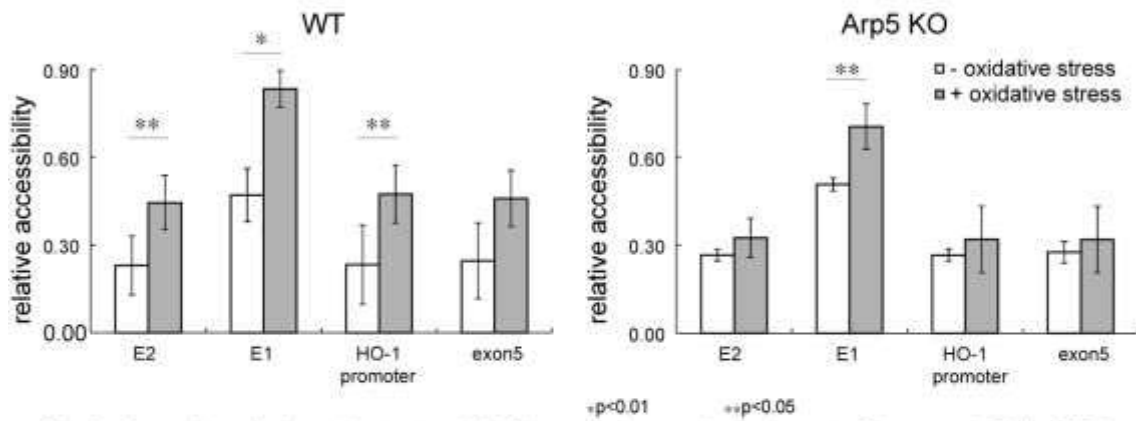


Fig. 12. Comparison of chromatin structure in HO-1 expression regulatory elements. The genomic DNA of WT and Arp5 deficient cells were treated with nuclease, and nuclease accessibility was measured by quantitative-PCR. If the chromatin forms loose structure, the PCR amplification efficiency is low because genomic DNA is digested by the nuclease. Relative accessibilities of each genomic DNA region compared to GAPDH promoter region are shown. The graphs show three independent experiments with standard deviation.

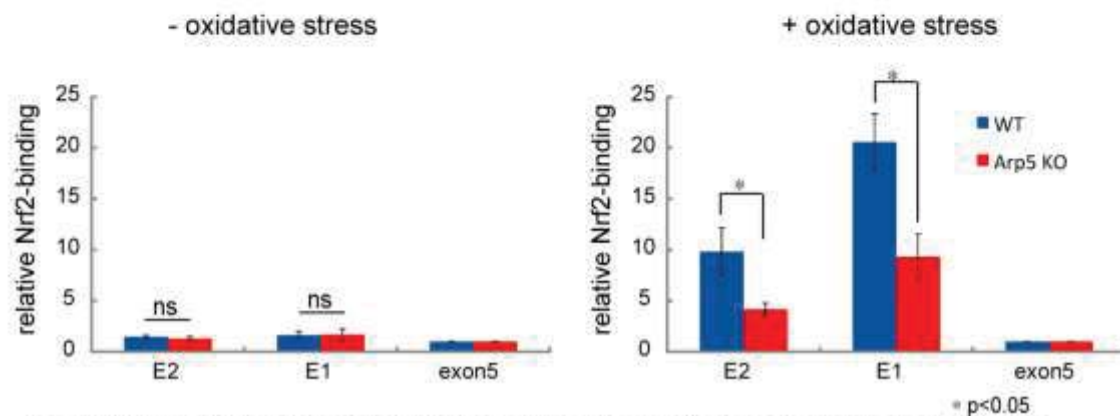


Fig. 13. Detection of the recruitment of HO-1 transcriptional factors. ChIP assays were performed by using antibody for Nrf2, an activator of HO-1, with WT and Arp5 deficient cells. Relative levels of enrichment of each genomic DNA region are shown. The graphs show three independent experiments with standard deviation.

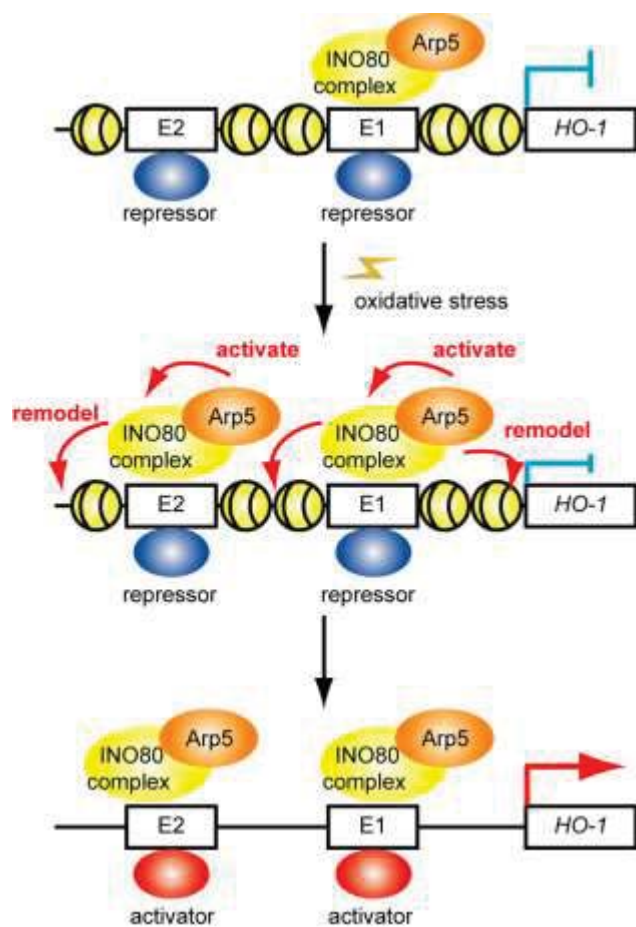


Fig. 14. A schematic model depicting the role of INO80 complex and Arp5 in the regulation of HO-1 expression. Although the INO80 complex binds to HO-1 enhancer region, HO-1 expression is repressed under non-stress conditions. When cells are exposed to oxidative stress, INO80 complex binding is increased. 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.

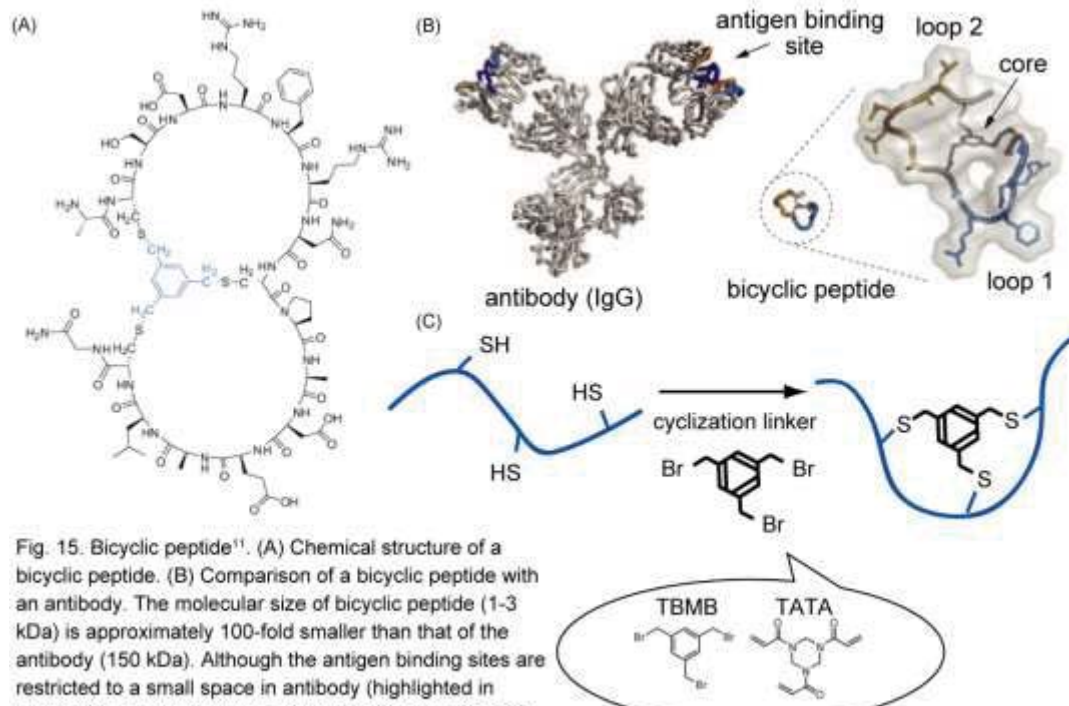


Fig. 15. Bicyclic peptide<sup>11</sup>. (A) Chemical structure of a bicyclic peptide. (B) Comparison of a bicyclic peptide with an antibody. The molecular size of bicyclic peptide (1-3 kDa) is approximately 100-fold smaller than that of the antibody (150 kDa). Although the antigen binding sites are restricted 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

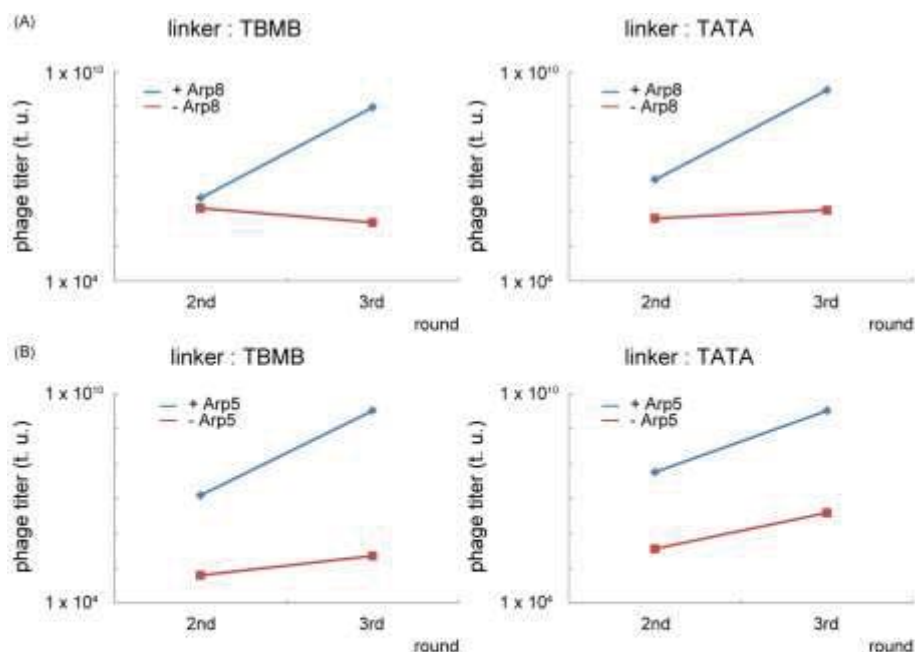


Fig. 16. The evaluation of bicyclic peptides screening against Arp8 (A) and Arp5 (B). Compared to the negative controls (- Arp8 or Arp5), an increase of the phage titers indicates the target-binding peptides were enriched.

name	sequence	linker	K <sub>d</sub> (μM)
Arp8-1	A C D O G R W L C R E L G W T C G	TBMB	0.16
Arp8-4	A C R O R F W C 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 <sub>d</sub> (μM)
Arp5-2	A C S S N 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. 17. The list of peptides which have high affinity to recombinant Arp8 or Arp5. Some peptides were synthesized and evaluated in the affinity to recombinant target proteins by fluorescence polarization assay. There were 6 peptides and some peptides were shown to they have high binding ability to the targets. Their dissociation constant (K<sub>d</sub>) were shown.

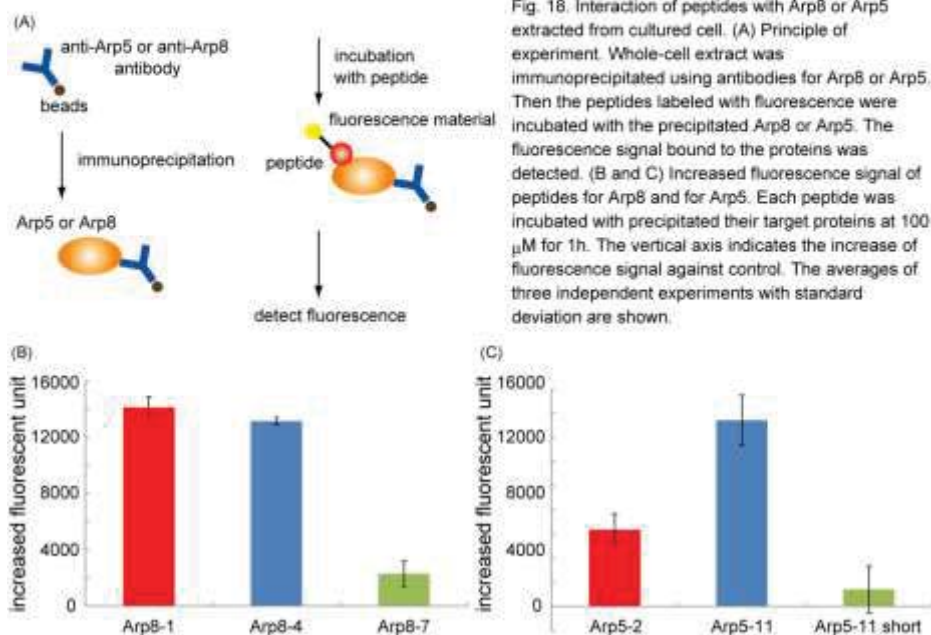


Fig. 18. Interaction of peptides with Arp8 or Arp5 extracted from cultured cell. (A) Principle of experiment. Whole-cell extract was immunoprecipitated using antibodies for Arp8 or Arp5. Then the peptides labeled with fluorescence were incubated with the precipitated Arp8 or Arp5. The fluorescence signal bound to the proteins was detected. (B and C) Increased fluorescence signal of peptides for Arp8 and for Arp5. Each peptide was incubated with precipitated their target proteins at 100 μM for 1h. The vertical axis indicates the increase of fluorescence signal against control. The averages of three independent experiments with standard deviation are shown.

## 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

## 論文審査の結果の要旨及び担当者

氏名	高橋 裕一郎
審査委員	主査：准教授 原田 昌彦 副査：教授 五味 勝也 教授 内田 隆史
学位論文題目	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合体の機能制御研究

### 論文審査の結果の要旨

真核生物において、ゲノム機能はクロマチンの構造を基盤とするエピジェネティック制御を受けている。すなわち、ゲノムは細胞核内で、様々な機能に対応したクロマチン構造を形成することでその機能が制御されている。このようなエピジェネティック制御機構は、発生・分化や、疾病・老化に関与するため、その分子機構に関する研究が世界中で精力的に行われている。しかし、その分子機構には不明な点が多いのが現状である。高橋は、クロマチン構造変換に重要や役割を有する INO80 クロマチンリモデリング複合体の機能を解明する目的で、INO80 複合体の必須構成因子であるアクチンファミリー Arp5, Arp8 に着目して、その機能について解析を行った。実験材料として、ヒト培養細胞である NALM-6 細胞を用いて、*ARP5*、あるいは *ARP8* 遺伝子をノックアウトした細胞株を作成し、この細胞を用いて Arp5, Arp8 の INO80 複合体中での機能を解析した。

これらのノックアウト細胞のマイクロアレイ解析により、INO80 複合体が、酸化ストレスに応答した遺伝子発現制御に重要であることが示された。そのため、代表的な酸化ストレス応答タンパク質である heme oxygenase 1 (HO-1) 遺伝子を対象として、詳細な解析を行った。その結果、Arp5-KO および Arp8-KO 細胞で HO-1 遺伝子発現の顕著な現象が認められた。また、Arp5 が INO80 複合体の活性化に必要であること、酸化ストレス条件下で INO80 複合体を活性化してクロマチン構造を変換すること、クロマチン構造変換による転写因子の結合変化が HO-1 遺伝子の活性化に寄与することなどを明らかにした。さらに、これらの Arp の解析ツールとして、また研究成果の応用展開を目的として、Arp5, Arp8 に対する bicyclic peptide のスクリーニングを行った。Bicyclic peptide は、十数アミノ酸のペプチド内部に架橋構造を形成させることによって、タンパク質に対して高親和性結合することを可能とした分子である。その結果、Arp5 あるいは Arp8 に高親和性結合する複数の bicyclic peptide を得ることに成功した。

本研究は、進化的にも保存されたアクチンファミリー Arp5, Arp8 の、INO80 複合体の機能制御への関与をはじめ明らかにしたものである。また、Arp5, Arp8 に結合する bicyclic peptide をスクリーニングによって得たこと、またその基本的な性質を明らかにしたことは、INO80 複合体中での Arp5, Arp8 の機能に関する本研究成果を、がん治療薬などへの応用展開する上での大きなアドバンテージとなり、関連分野への波及効果も高いものであると判断できる。これらの観点から、本論文は博士課程修了に十分に値するものと判断される。