

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14448

研究課題名(和文) ヒストンバリエントが細胞増殖と個体発生を制御する機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of histone variants controlling cell proliferation

研究代表者

米原 伸 (Yonehara, Shin)

京都大学・生命科学研究科・教授

研究者番号：00124503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：カノニカルヒストンのmRNAの切断と成熟にFLASH/casp8ap2が関わっている。FLASHの発現を抑制すると細胞周期の進行がS期で停止し細胞死が誘導されるが、この時にカノニカルヒストンH1.4の発現が阻害されノンカノニカルヒストンH1tの発現が誘導されることを示した。一方、FLASH発現細胞でH1.4の発現を抑制しても細胞周期の進行は影響を受けないが、H1tを一過性に強制発現すると細胞増殖が抑制され細胞死も誘導された。FLASHの発現抑制による増殖抑制と細胞死誘導がH1tの発現によると考え、現在H1tノックアウト細胞を作製しており、H1tの新しい機能を更に解析している。

研究成果の概要(英文)：FLASH/casp8ap2 is involved in cleavage and maturation of canonical histone mRNA. When the expression of FLASH is suppressed, progression of the cell cycle arrests in the S phase and cell death is induced. At this time, expression of canonical histone H1.4 was shown to be inhibited and expression of non-canonical histone H1t was induced. On the other hand, down-regulated expression of H1.4 in FLASH-expressing cells did not affect cell cycle progression, while cellular proliferation was suppressed by transient expression of exogenous H1t. We consider that the inhibition of cell cycle progression at the S phase by the downregulated expression of FLASH may be due to the expression of H1t, and the new function of H1t on cell cycle progression will be further analyzed by generation and analysis of H1t knockout cells.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：細胞死 細胞増殖 ヒストンH1 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

遺伝子発現制御ではエピジェネティックな制御が重要であるが、その中でヒストンの化学修飾が重要な役割を担うとされている。ヒストンはヌクレオソームを形成するコアヒストン (H2A, H2B, H3 と H4) およびリンカーヒストン H1 で構成される。染色体を構成するヒストンは、細胞周期の S 期に強発現し、3'末端に poly-A を持たない mRNA を介して発現するカノニカルヒストンが主成分である。一方、細胞周期非特異的に転写される poly-A 付加 mRNA から翻訳されるノンカノニカルヒストンには多数のサブタイプが存在する。近年、エピジェネティックな制御や DNA の複製制御が種々のバリエーションヒストンの染色体への取込みによってもなされる可能性が示唆され注目されているが、その詳細は不明である。

我々が同定した FLASH/casp8ap2 は、細胞周期 S 期進行に必須である。FLASH の発現抑制を誘導すると、細胞周期進行が S 期で停止し、細胞死も誘導される。また、このような性質は上皮系および間葉系がん細胞株に特異的であり、正常細胞である二倍体線維芽細胞株の増殖や ES 細胞の増殖と分化に、FLASH の発現抑制誘導は影響しない。一方、KO マウスは発生初期の胚盤胞期に死亡することを我々は示している。一方、FLASH は poly-A を持たないカノニカルヒストン mRNA の成熟に必要であり、FLASH の発現抑制はカノニカルヒストンの発現量を劇的に減少させると報告された。我々は FLASH の発現抑制細胞から poly-A 付加 RNA を抽出して網羅的 DNA マイクロアレイ解析を行ったが、各種ヒストンの発現が poly-A 付加 mRNA レベルで劇的に増加していた。FLASH の発現抑制はカノニカルヒストンの発現減少とノンカノニカルヒストンの発現増加を伴うことが分かった。これらの結果から、カノニカルヒストンの代わりにノンカノニカルヒストンが染色体に取り込まれるという興味深い現象が細胞レベルで誘導されている可能性が考えられた。

2. 研究の目的

近年、エピジェネティックな制御や DNA の複製制御が種々のヒストンバリエーションの染色体への取込みによって誘導される可能性が示唆され注目されているが、その詳細は不明である。FLASH/casp8ap2 は細胞周期 S 期進行と初期胚の発生に必要な分子であり、その発現抑制はカノニカルヒストンの発現減少と poly-A 付加 mRNA から翻訳されるノンカノニカルヒストンの発現増加を伴う。FLASH の発現抑制で、カノニカルヒストンの代わりにノンカノニカルヒストンが染色体に取り込まれるのではないかと考え、本研究を立案した。本研究では、バリエーションヒストンの機能として、FLASH 発現抑制が示すがん細胞特異的な細胞周期 S 期進行の停滞や

発生初期での初期胚の死滅誘導を細胞レベルや個体レベルの解析によって世界に先駆けて示すことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) FLASH 発現抑制誘導によって細胞周期 S 期進行が停滞する細胞で全てのカノニカルヒストンとノンカノニカルヒストンの発現を、RT-PCR 法によって定量的に解析する。そして、FLASH 発現抑制で S 期進行が停滞する時に、発現が特異的に強く誘導されるノンカノニカルヒストンと、特異的に発現が抑制されるカノニカルヒストンを明らかにする。

(2) FLASH 発現抑制誘導時に発現が低下するカノニカルヒストンについて、FLASH 発現細胞で発現を抑制し、ノンカノニカルヒストンの発現が誘導されるか、また細胞増殖が抑制されるかを解析する。

(3) FLASH 発現抑制誘導時に発現が誘導されるノンカノニカルヒストンについて、FLASH 発現抑制誘導が可能な細胞で遺伝子を CRISPER-Cas9 システムを用いてノックアウトし、ノックアウト細胞において FLASH 発現抑制を誘導したときに、細胞増殖抑制効果が阻害されるか否かを明らかにする。

4. 研究成果

(1) ヒストン H1 バリエーションの発現解析

FLASH の発現抑制によって、カノニカルヒストンの代わりにノンカノニカルヒストンが染色体に取り込まれるのではないかと考え、まずヒストン H1 に焦点を当てて解析を行った。ヒストン H1 は 9 種類のバリエーション分子から構成されるが、その中の 5 種類が細胞周期 S 期に発現し mRNA が poly-A を有さないカノニカルヒストンであり、4 種類が細胞周期に依存せずに発現し mRNA が poly-A を有するノンカノニカルヒストンである (図 1)。

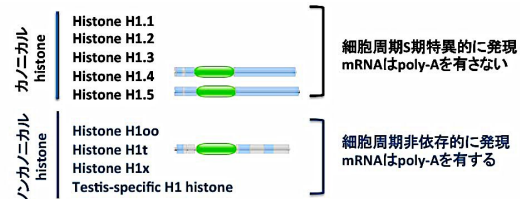


図1 ヒストンH1のバリエーション分子

ヒストン H1 の各バリエーションは、アミノ酸配列だけでなく、mRNA の塩基配列も類似しているため、Western Blotting 法や qRT-PCR 法で発現量を比較することが困難であった。そこで、mRNA における比較的長い領域を増幅させる RT-PCR 法を用いて解析を行った (図 2)。解析に用いた細胞は、FLASH 特異的な shRNA の発現誘導によって細胞増殖の阻害と細胞死の誘導が認められるヒトカルシノマ由来 KB 細胞と、FLASH の発現抑制に耐性を示す正常細胞であるヒト二倍体線維芽細胞

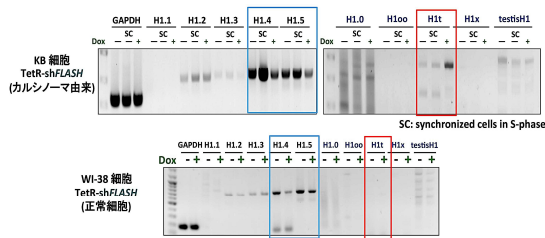


図2 ヒストンH1のバリエーション分子のFLASH発現細胞(-Dox)、FLASH発現誘導抑制細胞(+Dox)、およびハイドロキシウレア処理による細胞周期S期同調細胞(SC)における発現解析

- 各種ヒストンH1バリエーションの発現量解析はRT-PCR法によって行った。
- カルシノーマ由来KB細胞はFLASH発現抑制によって細胞周期S期進行が阻害され、細胞死が誘導される。
- ヒト正常二倍体線維芽細胞WI-38は、FLASH発現抑制に細胞増殖は阻害されず、細胞死も誘導されない。
- TetR-shFLASHは、FLASH特異的shRNAの発現をTetRIによって抑制されるが、Doxycyclin (Dox) 処理によってTetRIの機能が阻害され、shFLASHの発現とFLASHの発現抑制が誘導される。

株 WI-38 である。その結果、両細胞とも FLASH 発現時にはカノニカルヒストンである H1.4 と H1.5 が発現し、ノンカノニカルヒストンの有意な発現は認められなかった。また、ハイドロキシウレア処理によって S 期に同調させた KB 細胞では、カノニカルヒストン、特に H1.4 の発現が上昇したが、ノンカノニカルヒストンの発現は誘導できなかった。一方、FLASH の発現抑制を誘導して細胞周期 S 期に停滞したカルシノーマ由来 KB と細胞増殖には影響がみとめられなかった正常二倍体線維芽細胞 WI-38 の両方で、カノニカルヒストンである H1.4 と H1.5 の発現が抑制されていたが、主として H1.4 の発現抑制が認められた。興味深いことに、FLASH 発現抑制誘導時に、KB 細胞ではノンカノニカルヒストン H1t の発現が有意に誘導されたが、WI-38 細胞ではノンカノニカルヒストンの発現誘導は認められなかった。FLASH の発現抑制誘導時に引き起こされる細胞増殖抑制と細胞死の誘導は、カノニカルヒストンの発現抑制とは相関せず、ノンカノニカルヒストン H1t の発現誘導と相関していた。

(2) カノニカルヒストン H1.4 の発現阻害解析

FLASH 発現抑制による細胞増殖阻害と細胞死の誘導にはカノニカルヒストン H1 の発現抑制は関わらない可能性が考えられたが、これを確実にするため、H1.4 の発現抑制細胞の作製と解析を行った(図3)。shH1.4 を恒常的に発現する KB 細胞をまず作製したが、細

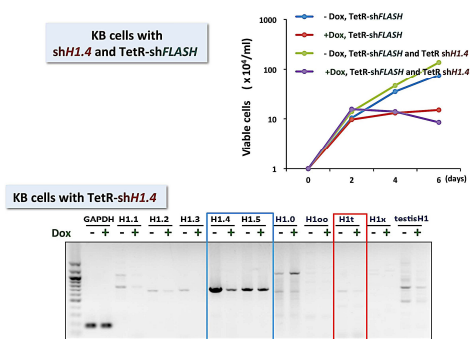


図3 カノニカルヒストンH1.4の発現抑制

- カノニカルヒストンH1.4の発現を抑制しても細胞増殖は影響を受けない。
- カノニカルヒストンH1.4の発現を抑制してもFLASH発現抑制誘導の効果は影響を受けない。
- カノニカルヒストンH1.4の発現抑制を誘導してもノンカノニカルヒストンの発現は誘導されない。

胞株樹立時から細胞増殖に対する影響は全く認められなかった。また、FLASH の発現抑制を誘導しても、その効果は H1.4 の発現には全く影響を与えなかった。これらの結果から、FLASH の発現抑制による細胞増殖の阻害と細胞死の誘導には、カノニカルヒストン H1 の発現抑制は関わらないと結論づけた。

また、H1.4 の発現抑制を FLASH の発現抑制誘導時と同程度に誘導しても、ノンカノニカルヒストン H1t の発現は引き起こされなかった。FLASH 発現抑制誘導時に、カノニカルヒストンの発現抑制がノンカノニカルヒストンの発現を誘導することが考えられたが、ヒストン H1 においてはカノニカルヒストンの発現抑制がノンカノニカルヒストンの発現を誘導することはないと考えられた。

(3) ノンカノニカルヒストン H1t の発現解析

ノンカノニカルヒストン H1t を恒常的に強発現する KB 細胞の作製を試みた。しかし、H1t を恒常的に発現する KB 細胞は樹立が困難であり、増殖能が極めて低い細胞が非常に低い確率で増えてくるだけであった。この増殖能の低い KB 細胞で FLASH の発現抑制を行ったところ、通常の細胞と比較して、非常に強い細胞増殖の抑制と細胞死の誘導がより早いタイムコースで観察された。また、FLASH の発現を抑制すると、KB 細胞のサイズが大きくなる共に形が丸くなり、基質との接着が弱くなるように認められる。興味深いことに、H1t を強発現させた増殖能の低い細胞は、FLASH ノックダウン細胞とよく似た形態を示した(図4)。FLASH の発現抑制による効果に H1t の発現誘導が関わっていることが示唆されていると考えられた。

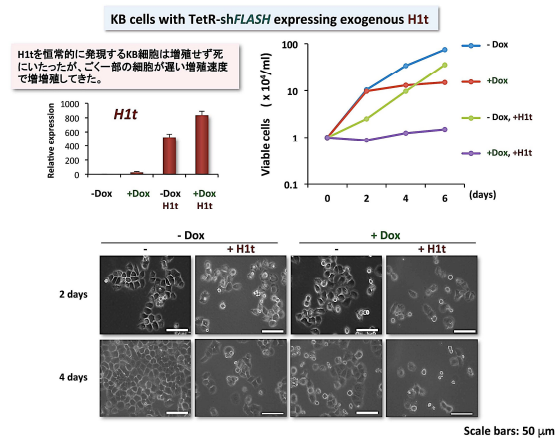


図4 ノンカノニカルヒストンH1tを強制発現するKB細胞の解析
FLASHの発現抑制を誘導できるKB TetR-shFLASH細胞にH1tを強制発現させ、解析を行った

(4) ノンカノニカルヒストン H1t のノックアウト細胞

LASH 発現抑制による細胞増殖阻害と細胞死の誘導にノンカノニカルヒストン H1t の発現誘導が関わる可能性が考えられたが、これを確かなものとするためには、H1t のノックアウト KB TetR-shFLASH 細胞株を樹立し、その効果を解析する必要がある。そこで、CRISPER-Cas9の系を用いて H1t のノックアウト

ト株の作製を試みている。現在、ノックアウトされていると考えられる細胞株が数株樹立できたので、解析を勧めようとしている。

(2)研究分担者

(3)連携研究者

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(4)研究協力者

()

〔雑誌論文〕(計 0件)

〔学会発表〕(計 2件)

米原 伸. 2015. Caspase-8 と RIP キナーゼが制御する細胞死と細胞分化. 第24回日本 Cell Death 学会 学術集会 シンポジウム「細胞死とミトコンドリア、Hippo pathway」(招待講演)2015年07月11日. 豊中市.

米原 伸. 2016. 特異的遺伝子の発現抑制によるがん細胞特異的な細胞死の誘導. 第13回東レ先端融合研究シンポジウム「最先端のがん診断とがん治療」(招待講演)2016年5月18日. 鎌倉市

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

米原研究室ホームページ): 研究内容や研究業績を記載

http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/Fas/Home_j.htm

6. 研究組織

(1)研究代表者

米原 伸 (YONEHARA Shin)

京都大学・生命科学研究所・教授

研究者番号: 00124503