

平成 21 年 5 月 24 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007-2008

課題番号：19570166

研究課題名 (和文) 染色体機能における ASF1 の遺伝生化学的解析

研究課題名 (英文) Genetic and biochemical analysis of ASF1 in chromatin function

研究代表者

高見恭成 (TAKAMI YASUNARI)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：80236356

研究成果の概要：

ゲノム DNA は、細胞内ではヒストンなどの蛋白質と共に様々な高次クロマチン構造を形成することによって、染色体機能が維持される。ヒストンのシャペロン分子と知られる Asf1 は新しく作られたヒストン H3-H4 を複製された DNA 上に運ぶ重要な分子である。新規合成ヒストン H4 は Hat1 というアセチル化酵素で高度にアセチル化されている。これら分子と相互作用する因子を共免疫沈降法で探索し、複合体成分の解析を行なった。その結果 Hat1 もしくは H4 の Lys-5, 12 のアセチル化が安定した細胞質ヒストン H3-H4 複合体形成に寄与し、H3-H4 複合体の形成は Hat1 と Asf1 によって制御されていること明らかになった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体構築・機能・分配

1. 研究開始当初の背景

染色体DNAは、ヒストンなどの蛋白質と共にクロマチン構造を形成することによって、DNAの情報が必要でない時に読まれるのを抑制しており、染色体DNAの情報が発現するには、クロマチン構造を変換する必要がある。一方で、増殖細胞は細胞周期のS期にDNA複製に伴い、クロマチンから解かれたゲノムDNAは再びクロマチンに素早くパッケージされる。クロマ

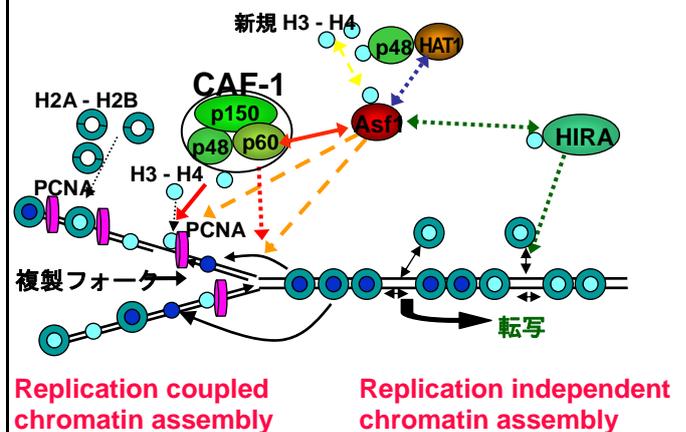
チンへのDNAパッケージは上述のように転写、複製、修復等の遺伝情報のアクセスを許容するのに多大な影響をもたらす。S期で活性なヌクレオソームアセンブリーは増殖細胞にとって必要不可欠な段階であり、癌細胞はS期に集積するため、ヌクレオソームアセンブリーに関与する酵素群は癌の診断や治療の魅力的なターゲットとして考えられ始めている。DNA複製に伴い生じた娘DNA鎖中の半分は親鎖の

コアヒストンが再分配され（親鎖ヌクレオソーム分配）、残りの半分は新規合成ヒストンが取り込まれる（de novoヌクレオソームアセンブリー）2つの反応により娘ヌクレオソーム鎖が再構築される。前者の機構に関しては未だ不明であるが、後者に関してはCAF-1 ASF1等、幾つかのアセンブリー因子（ヒストンシャペロンタンパク質）が触媒することが明らかとなった。すなわち、CAF-1 (p150, p60, p48)の3つのサブユニットからなるは、*in vitro*でDNA複製に依存したヌクレオソーム形成活性を有し、ASF1はCAF-1存在下でヌクレオソーム形成活性を促進する。我々は遺伝子ノックアウトが容易なニワトリのDT40細胞を用いて、クロマチン構造構築・変換に関与する遺伝子群の系統的な変異株の作成を行っており、これらの研究から一連のCAF-1サブユニットのconditional変異株はDNA合成能の低下、新規DNA合成鎖上のヌクレオソーム形成能の低下を伴い、致死であることを明らかにした。また、ASF1欠損株も同様の表現型を示した。したがって、本システムはヌクレオソーム形成粗過程の分子の基盤の解明に非常に有用であると思われる。

一方、新規合成ヒストンはクロマチンに取り込まれる前に B-type-HATs（ヒストンアセチルトランスフェラーゼ）によってH3、H4が複数の部位でアセチル化され、ヌクレオソームアセンブリー因子に結合し複製鎖にdepositされる。複製鎖に取り込まれたアセチル化ヒストンはHDAC（ヒストンデアセチラーゼ）によって脱アセチル化されるため複製もしくはS期依存的なヒストンアセチル化は一過性であるが、ゲノムの全体にわたりおこる事象である。こうした新規合成ヒストンH3とH4の翻訳後修飾は真核生物を通じて保存された現象であるが、その生理的役割については未だ不明であり、新規合成ヒストンH3、H4のどの部位にどのような翻訳後修飾が起こるかは明確にはわかっておらず、これらを触媒する酵素群も一部を除いて不明である。ヒストンのアセチル化は様々なメカニズムを介して、遺伝情報のアクセスを促進すると考えられているので、細胞はゲノム全体にdepositされる新規合成ヒストンのアセチル化を様々な目的のためスキャンし、利用している可能性がある。現在、唯一、新規合成ヒストンアセチル化に関与していると考えられているHATはHAT1であり、*in vitro*でH4の5番と

12番目のLysをアセチル化(ac-Lys-5, 12)する酵素として知られる。我々はDT40を用いてHAT1欠損変異株を作成し、確かに新規合成ヒストンをを反映していると考えられる細胞質ヒストンH4のLys-5, 12のアセチル化の消失を確認し、HAT1が新規合成ヒストンH4 ac-Lys-5, 12の触媒酵素であることを明らかにしている。本変異株の細胞質抽出液を用いた*in vitro*複製依存的ヌクレオソーム形成活性に減少は認められず、*in vivo*新規DNA合成鎖上のヌクレオソーム形成にも変化がないことから、少なくともH4のac5, 12は複製依存的ヌクレオソーム形成には必要ではないことを示しているが、細胞増殖能は若干減少していた。さらに本変異株はcamptothecin, MMSなどのDNA複製阻害剤に対する感受性が亢進していた。これらの阻害剤は複製停止に伴う二重鎖切断(DSB)を引き起こすことが知られるため、HAT1もしくはH4 ac-Lys5, 12がDSB修復経路にクロマチン構造を介して関与している可能性がある。

以上のように複製に伴うクロマチンアセンブリー経路は多段階からなり恒常的ゲノムの安定性に影響をあたえる種々の要因を含むことは明らかである。



2. 研究の目的

本研究の目的は、(1) ASF-1によるヌクレオソーム形成を介したDNA複製制御機構 (2) 新規合成ヒストンの翻訳後修飾の生理的役割、の解明の2点に焦点を絞り、ニワトリDT40細胞で作成したASF1及びHAT1変異株を用いて、ASF1とHAT1の連携、およびこれらの染色体機能における働きを明らかにする

ことを目的とした。

3. 研究の方法

ASF1 及び HAT1 と相互作用する因子を免疫沈降法で網羅的に解析した。また、遺伝学的解析が容易なニワトリ DT40 細胞株を用いて ASF1 との機能的連携が予想される各種クロマチン関連因子の欠損変異株を作成し、これら変異株におけるヒストンの動態と ASF1 と HAT1 の挙動を細胞抽出系の分画、ショ糖密度勾配遠心法を用い吹く剛体成分の解析等の遺伝生化学的手法を用いた。

4. 研究成果

ニワトリ DT40 細胞を用いたテトラサイクリン (tet) 誘導性 ASF1 conditional 変異株を作成、解析し、ASF1 は複製と共役したヌクレオソーム形成に寄与し、DNA 合成、S 期進行に関わる、生存に必須な因子であることを既に報告している。また、動物細胞で唯一、新規合成ヒストンの翻訳後修飾に関与することが知られている HAT1 に関しては、欠損変異株を作成済である。本変異株は、致死ではないが、増殖速度の遅延、細胞質ヒストン H4 Lys-5, 12 のアセチル化の消失が確認されている。DT40 細胞の細胞質画分をショ糖密度勾配遠心にかけ、細胞質ヒストン H3 と H4 の分布を検討したところ、分子量 60 から 150 kD にわたり分布していることからヒストン H3 と H4 分子は H3-H4dimer (25 kD) もしくは tetramer (50 kD) 以外に他の分子と結合して様々な複合体を形成していることが明らかになった。興味深いことに、HAT1 欠損変異株では細胞質ヒストン H3 と H4 の分布が低分子側 (~70 kD) にシフト変動することから H3-H4 を含む複合体の構成成分が変化したと考えられた。一方、HAT1 欠損変異株ではヒストン H4 の mRNA 量の顕著な増大が認められた。従って HAT1 欠損変異株では H3-H4 を細胞質に一定量適切に保つ制御機構が破綻している可能性が示された。一方、今回作成した HAT1 欠損変異株は生育速度に若干の減少が認められるが、DNA 複製能及び複製鎖上のヌクレオソーム形成反応には顕著な影響はなかった。しかしながら CPT, MMS などの複製阻害剤に対する感受性が増加することから、Hat1 を介するヒストン代謝機構の複製停止における損傷修復・応答への関与を示唆している。HAT1 によるヒストン代謝制御の分子基

盤を調べるため、タグ付き Hat1 発現細胞の細胞質画分から Hat1 と共免疫沈降する因子を調べるところ、Hat1 の subunit である RbAp48 以外に、ヒストン H3/H4、さらに H3/H4 シャペロンとして知られる Asf1 が共沈することがわかった。タグ付きの Asf1 複合体を DT40 と HAT1 欠損細胞から部分精製し、ショ糖密度勾配遠心分画したところ HAT1-Rbp48-histoneH3/H4-ASF1 を含む複合体が 150kD 付近で認められた。さらに ASF1 欠損変異株においても H3-H4 を含む画分の挙動は低分子側にシフト変化した。以上の結果から、HAT1 が細胞質 H3-H4-ASF1 複合体と結合してクロマチン取り込み前の安定な H3-H4 を含む複合体形成に関与していることは明らかである。すなわち、ASF1 を介する細胞内ヒストン代謝やヌクレオソーム形成経路と HAT1 を介した H4K5/K12 のジアセチル化の機能的連携を示唆している。

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)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Escaffit F., Vaute O., Chevillard-Briet M., Segui B., Takami Y., Nakayama T., and Trouche D. Cleavage and cytoplasmic relocalization of histone deacetylase 3 are important for apoptosis progression. *Mol. Cell. Biol.*, 27, 554-567, (2007), (有)
- ② Hashimoto H., Sonoda E., Takami Y., Kimura H., Nakayama T., Tachibana M., Takeda S., and Shinkai Y. Histone H1 variant, H1R is involved in DNA damage response. *DNA Repair (Amst)*, 6, 1584-1595, (2007), (有)
- ③ Nakayama M., Suzuki H., Yamamoto-Nagamatsu N., Barman H K., Kikuchi H., Takami Y., Toyonaga K., Yamashita K., and Nakayama T. HDAC2 controls IgM H- and L-chain gene expressions via EBF1, Pax5, Ikaros, Aiolos and E2A gene expressions. *Genes Cells*, 12, 359-373, (2007), (有)
- ④ Sonoda E., Zhao G Y., Kohzaki M., Dhar P K., Kikuchi K., Redon C., Pilch D R., Bonner W M., Nakano A., Watanabe M., Nakayama T., Takeda S., and Takami

Y. Collaborative roles of gamma H2AX and the Rad51 paralog Xrcc3 in homologous recombinational repair. DNA Repair (Amst), 6, 280-292, (2007), (有)

⑤ Takami Y., Ono T., Fukagawa T., Shibahara K., and Nakayama T. Essential role of chromatin assembly factor-1-mediated rapid nucleosome assembly for DNA replication and cell division in vertebrate cells. Mol. Biol. Cell, 18, 129-141, (2007), (有)

⑥ Barman H K., Takami Y., Nishijima H., Shibahara K., Sanematsu F., and Nakayama T. Histone acetyltransferase-1 regulates integrity of cytosolic histone H3-H4 containing complex. Biochem. Biophys. Res. Commun., 373, 624-630, (2008), (有)

[学会発表] (計 3 件)

① 高見恭成、中山建男、第 30 回日本分子生物学会年会、DT40 細胞を用いた ASF1 の機能解析 (2007.12) 神戸

② 高見恭成、Barman H K., 中山建男、DT40 細胞を用い HAT1 の機能解析、第 31 回日本分子生物学会年会、(2008.12) 神戸

③ 高見恭成、Barman H K., 中山建男、DT40 細胞を用い HAT1 の機能解析、日本生化学会九州支部例会、(2008.4) 福岡

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者
高見恭成 (TAKAMI YASUNARI)
宮崎大学・医学部・准教授
研究者番号：80236356

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者