

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月27日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570183

研究課題名（和文）DNA複製に共役したクロマチン形成機構と組換え・修復機構の関連

研究課題名（英文）Role of replication related nucleosome assembly factors in DNA damage repair

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（和文）：

DNA複製および、その修復反応は、複製、修復蛋白質そのものに加え、染色体内の多数のクロマチン制御因子が関与した複雑な反応である。これら因子によるクロマチン構造の調節機構が複製、修復機構と如何に連携しているかについての詳細は不明である。本研究ではDNA複製に共役したクロマチン構造変換機構に関与するヒストンシャペロン因子（CAF-1, ASF1）に焦点を絞り、ニワトリ DT40 細胞で遺伝子破壊、ノックイン法を実施することにより、これら因子がDNA複製および様々なDNA損傷修復経路に関与すること明らかにした。

研究成果の概要（英文）： In eukaryotic cells, DNA replication and repair is intimately connected to chromatin structure. To understand the role of chromatin related factors in DNA replication and repair, we generated systematically a number of chicken DT40 mutant cell lines, respectively, lacking each of appropriate genes, CAF-1, which is consisted of p150, p60 and p48 subunit, and ASF1. By analyses of these mutant cells, we have revealed the function of CAF-1 and ASF1-dependent nucleosome assembly in DNA replication, and the relation to DNA damage repair

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ヒストン、クロマチン、ヌクレオソーム、ジーンノックアウト法、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

染色体DNAの複製傷害やその修復機構の障害は、染色体維持機構に重篤な支障をきたし

、染色体異常や発癌などの遺伝的障害をもたらす。近年、DNA複製と修復反応は、複製、修復蛋白質そのものに加え、染色体内の多数

のクロマチン制御因子が関与した複雑な反応であることがわかってきた。例えばDNAが損傷を受けると、それを取り巻く染色体の構造変化が起こり、その構造変化が引き金となって、多数のDNA修復・チェックポイント蛋白質群が時間的、空間的に規則正しくリクルートされる。構造変化のなかでも、とりわけ、DNA損傷部位のヒストンの修飾（アセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など）とそれに引き続くDNAとヒストンの解離、および修復完了後のヒストンの再構成は、修復効率やチェックポイント機構に影響を与えていると考えられている。しかしながら、クロマチン制御因子によるクロマチン構造の調節機構が複製、修復機構と如何に連携しているかについての詳細は不明である。

## 2. 研究の目的

新規に合成されたヒストンは幾つかのヒストンシャペロンを介して核内に移行しクロマチンに取り込まれる。本研究では特にDNA複製に共役したクロマチン形成機構に関与するとされるヒストンシャペロン群がDNA複製時に生じる損傷を修復する経路(相同組換え、損傷乗り越え経路等)に果たす役割を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

高等真核細胞で唯一、高頻度でターゲット・インテグレーションを起すニワトリ B リンパ細胞株 DT40 を用い、ジーン・ノックアウト/ノックイン法を駆使して、ヒストンシャペロンの欠損変異株を系統的に作製した。得られた一連の変異株を分子生物学的、細胞生物学的、生化学的手法で詳細に解析することによって、これら因子群の構造機能を明らかにした。

## 4. 研究成果

1) DNA 複製にカップルしたヒストン H3/H4 シャペロンである CAF-1 を欠損させると DNA 合成の低下、新生鎖上のヌクレオソーム形成不全(遅延)、S 期の遅延、分裂異常を伴い死滅するは既に報告している。本因子の DNA 複製機構への関与を DNA fiber assay で検討したところ、CAF-1 欠損により DNA 鎖の伸長速

度の低下が認められたがそれほど顕著ではなく、これだけで DNA 合成低下を説明できないため、origin firing の頻度低下の可能性を考え、現在詳細に検討中である。また、CAF-1 欠損により特異的に変化するヒストンアセチル化部位を 2 カ所明らかにした。これらのアセチル化ヒストン領域は核内で共局在して foci を形成した後、広がる。このことは CAF-1 を介したヌクレオソーム形成に強く依存した特異的なゲノム領域が存在すること、複製に共役した正確なヌクレオソーム形成がエピジェネティック修飾の維持に極めて重要であることを示している。

2) 他のヒストン H3/H4 のシャペロンである ASF1 に関しては DNA 損傷応答機構との関連を検討した。ASF1 は生存に必須であるため、内在性 ASF1 遺伝子の両アレルに種々の点変異をノックインで導入することで ASF1 機能低下変異株の作成を試みた。ヒストン結合能の低下したある種の点変異株は DNA 合成能の低下、S 期の遅延が起こり生育速度は低下するが、生存可能であった。本変異株を用いて DNA 損傷応答、組み換え能等を検討したところ、X 線による G2, S 期チェックポイント活性化や相同組換え能への影響はほとんど認められないものの、ある種の DNA 損傷剤(エトポシド)に対する感受性は顕著に増加した。現在この原因について検討している。

3) ヌクレオソーム形成因子による組換え制御の寄与を検討するために、組換え反応に関与する BLM 遺伝子との二重変異株の解析を行った。複製フォーク停止時に生じる異常な複製産物の蓄積解消や組換え中間体の解離には RecQ(特にブルーム症候群原因遺伝子 BLM)/Tbp3 が関与し、ニワトリの DT40 細胞株を用いて作成された BLM 欠損変異株は高姉妹頻度で染色体交換(SCE)起こること、CAF-1 欠損は複製フォーク上のクロマチン形成異常を伴い致死性であることは既に明らかになっている。今回両者の関連を明らかにするため BLM/CAF-1 二重欠損 DT40 変異株を作成を試みた。CAF-1 のテトラサイクリン誘導性条件変異株を用い、BLM ターゲティングベクターを 2 度導入することですみやかに条件致死性 BLM/CAF-1 二重欠損 DT40 変異株を得ることができた。同変異株を用いて SCE 頻度、

影響を調べてところ、期待していたよりも BLM 欠損下での組換えに及ぼす ASF1 や CAF-1 の影響は低く、組換え反応に直接的に働く因子ではないと考えられた。今後、他の組換え制御因子との関連をこれら因子との二重変異株の作成を行い解析していく予定である。

#### 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 5 件)

① Nishijima, H., Takami, Y., Nakayama, T., Adachi, N. and Shibahara, K.: Improved applications of the tetracycline-regulated gene depletion system. *BioScience Trends*, 3, 161-167, 2010. (査読無)

② Hashimoto, H., Takami, Y., Sonoda, E., Iwasaki, T., Iwano, H., Tachibana, M., Takeda, S., Nakayama, T., Kimura, H. and Shinkai, Y.: Histone H1 null vertebrate cells exhibit altered nucleosome architecture. *Nucleic Acids Res.* 38, 3533-3545. 2010. (査読有)

③ Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Takami, Y., Imajoh-Ohmi, S. and Nakayama, T.: GCN5 regulates the activation of PI3K/Akt survival pathway in B cells exposed to oxidative stress via controlling gene expressions of Syk and Btk. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405, 657-661, 2011. (査読有)

④ Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Kiwaki, N., Takami, Y. and Nakayama, T.: GCN5 regulates the superoxide-generating system in Leukocytes via controlling gp91-phox gene expression. *J. Immunology*, 186, 3015-3022, 2011. (査読有)

⑤ Abe, T., Sugimura, K., Hosono, Y., Takami, Y., Akita, M., Yoshimura, A., Tada,

S., Nakayama, T., Murofushi, H., Okumura, K., Takeda, S., Horikoshi, M., Seki, M., Enomoto, T.: The histone chaperone facilitates chromatin transcription (FACT) protein maintains normal replication fork rates. *J. Biol. Chem.* 286: 30504-30512, 2011. (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

① 高見恭成、中山建男：ノックイン変異 ASF1/CIA 細胞を用いた ASF1 の機能解析. 第 82 回日本生化学会大会. 2009 年 10 月 23 日、神戸.

② 高見恭成、中山建男:ノックイン変異細胞を用いた ASF1/CIA の機能解析. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009 年 12 月 11 日、横浜.

③阿部拓也、大沢洗司、高見恭成、多田周右、中山建男、室伏廣、堀越正美、関政幸、榎本武美：Histone chaperone FACT is involved in efficient elongation of nascent DNA chain. 第 32 回日本分子生物学会年会. 2009 年 12 月 12 日、横浜.

④鈴木寛之、中山建男、高見恭成:ニワトリ DT40 細胞を用いたミトコンドリア Sirtuins の機能解析. 第 10 回日本蛋白質科学会年会. 2010 年 6 月 17 日、札幌.

⑤菊池秀彦、栗林太、高見恭成、大海忍、中山建男:GCN5 による B 細胞酸化ストレス耐性機構の解析. 第 85 回日本生化学会大会. 9/24, 2011, 京都.

[図書] (計 1 件)

①Kikuchi, H., Barman, H. K., Nakayama, M., Takami, Y. and Nakayama, T.: Studies on epigenetic control of B cell functions using the DT40 cell line. *Advances in Genetics Research Vol. 2*, Nova Science Publishers, Inc. NY, 153-166, 2010.

[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

<http://www.med.miyazaki-u.ac.jp/2bio/index.html>

## 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

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：