

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：1 4 3 0 1

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：2 3 7 7 0 2 0 5

研究課題名（和文）DNA 損傷修復におけるユークロマチン領域のクロマチン制御機構の解析

研究課題名（英文）The epigenetic roles of DNA damage repair in euchromatin

研究代表者

坪田 智明 (TSUBOTA TOSHIAKI)

京都大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：4 0 5 3 8 1 3 8

研究成果の概要（和文）：DNA 損傷修復におけるユークロマチン領域のクロマチン制御機構の解析を行なった。その結果、ユークロマチン特異的にヒストン H3 の K9 メチル化を欠損させても、ヘテロクロマチンの場合とは異なり、DNA 損傷応答速度は低下しなかった。このことから、ユークロマチン領域は H3K9 メチル化に非依存的に損傷応答を活性化させていることが考えられる。さらに、これには別のヒストン修飾が関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：It has been reported that the efficient DNA damage response in heterochromatin requires histone H3 K9 methylation. However, in this study, it is suggested that H3 K9 methylation is not required for damage response signaling in euchromatin. Furthermore, the other histone modification is indicated to be involved in this regulation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：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：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

二本鎖DNA 切断などの損傷が正常に修復されなかった場合、細胞は細胞死やガン化等の重大なダメージを受ける。損傷が起これるとチェックポイント因子ATM が活性化されて下流因子をリン酸化し、細胞周期制御やDNA 修復を促進することが知られている。

申請者はこれまで、ヒストンH3 の56 番目のリジン (H3K56) のアセチル化修飾について研究してきた。このアセチル化は、染色体安定性/DNA 修復に重要な役割を果たしている (坪田智明、実験医学、2008)。最近、卵巣癌、甲状腺癌、咽喉頭癌、皮膚癌でそのレベルが異常に増大していることが報告され、ガン化との関連が示唆されている (Das et al., Nature, 2009)。申請者は、このH3K56 アセ

チル化酵素を酵母細胞より同定し、その分子基盤を明らかにした (Tsubota et al., Mol Cell, 2007)。

最近、密集した構造を取るヘテロクロマチン領域でDNA 損傷が生じた場合、ATM の活性化にヒストンメチル化酵素SUV39H1/H2 によるヒストンH3 の9 番目のリジン (H3K9) のトリメチル化修飾が必需であることが示された (Sun et al., Nat Struct Mol Biol, 2009)。しかし、細胞内の二本鎖DNA 切断損傷は比較的緩やかな構造を取るユークロマチン領域内でも多く発生している。ユークロマチンとヘテロクロマチンは性質が大きく違うため、DNA 損傷に対するクロマチン制御も異なる可能性が考えられた。

2. 研究の目的

そこで、本研究の目的は、DNA 損傷修復におけるユークロマチン領域のエピジェネティックな制御機構の解明を行なうことである。研究期間内には、以下の項目について明らかにする。

(1) ユークロマチン領域特異的な H3K9 メチル化酵素である G9a を欠損させた場合に、DNA 損傷に対して損傷応答経路がどのように活性化されるのかについて明らかにする。

(2) ユークロマチン領域における新規のエピジェネティック制御機構を明らかにする為に、G9a 欠損細胞における他のヒストン修飾への影響および細胞内機能の検討を行なう。

3. 研究の方法

(1) ヘテロクロマチン領域の H3K9 メチル化

酵素である SUV39H1/H2 のノックアウト細胞では、DNA 損傷に対する ATM の活性化が遅延することが報告されている。そこで本研究では、ユークロマチン領域特異的な H3K9 メチル化酵素 G9a を欠損させた場合の DNA 損傷に対する損傷応答シグナルの活性化速度の評価を行う。

(2) G9a 欠損細胞を用いてユークロマチン領域特異的に H3K9 メチル化を低下させた場合における他のヒストン修飾への影響、および細胞内機能について検討を行なう。

4. 研究成果

(1) G9aを欠損させた場合における損傷応答速度を検証するために、G9a欠損細胞にDNA傷害剤を加えた後、ATMのリン酸化速度についてウエスタンブロッティング法を用いて解析を行なった(図1)。コントロールとして、野生型およびSuv39H1/H2ノックアウト細胞を用いた。

その結果、Suv39H1/H2ノックアウト細胞ではDNA損傷後のATMのリン酸化速度は、野生型のものよりも低下していた(図1)。この結果はこれまでの報告と同様のものであった。そこで次に、G9a欠損細胞を用いて解析を行なったところ、G9a欠損細胞では野生型細胞よりもATMの活性化速度は低下するどころか、逆に促進されていた。これはSuv39H1/H2ノックアウト細胞の場合とは逆の現象である。以上のことから、1) ユークロマチン領域はヘテロクロマチン領域とは異なり、H3K9メチル化に非依存的にATMを活性化する機構を持つことが示唆される。また、2) G9a欠損細胞では、むしろ損傷応答速度が増加していることから、G9a欠損下では染色体/クロマチン構造が不安定化しており、より損傷を受けやすくなっている可能性が考えられる。

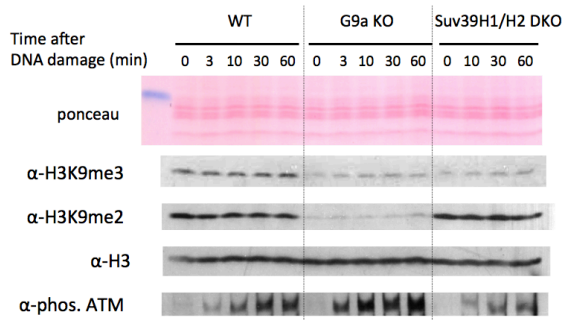


図 1. DNA 損傷応答速度解析

(2) そこで次に、ユークロマチン領域における新規の制御機構を明らかにする為にG9a欠損細胞を用いて他のヒストン修飾への影響を検討した。

その結果、G9a欠損細胞ではヒストンH3の56番目のリジン (K56) のアセチル化修飾に増加傾向がみられた。これまでに、H3K56アセチル化の亢進はゲノムの不安定性や細胞の癌化との関連が報告されている。そのため、G9a欠損細胞にみられるゲノム不安定性にH3K56アセチル化の亢進が関与している可能性が考えられる。

さらに、H3K56のアセチル化と競合する可能性があるH3K56のメチル化レベルを解析したところ、G9a欠損細胞ではこれが有意に低下していた。加えて、G9aは直接的にH3K56メチル化修飾を行なっていることが示唆された。これらのことから、G9a欠損細胞では、H3K56のメチル化レベルが低下することによって、H3K56アセチル化の亢進が引き起こされる可能性が考えられる。

以上のことから、ユークロマチン領域特異的なメチル化酵素であるG9aは、H3K56のメチル化を通してH3K56アセチル化レベルを制御することにより、ゲノムの安定性に寄与していることが示唆される。

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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) 坪田智明、Epigenetic roles in DNA repair/ genome integrity、若手放射線生物学研究会 (招待講演)、2012年06月14日～2012年06月16日、青森

(2) 坪田智明、眞貝洋一、The role of histone methyltransferase in genome integrity、日本エピジェネティクス研究会、2012年05月14日～2012年05月15日、東京

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坪田智明 (TSUBOTA TOSHIAKI)
京都大学・大学院医学研究科・助教
研究者番号：4 0 5 3 8 1 3 8

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：