

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08280

研究課題名(和文) ヒストンバリエントH2AXを介した染色体安定性維持機構

研究課題名(英文) H2AX plays a pivotal role in proper chromosome segregation

研究代表者

島田 緑 (Shimada, Midori)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：60444981

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において我々はAuroraBが分裂期でH2AXのS121をリン酸化することを見出し、染色体分配におけるH2AXのS121のリン酸化の重要性を明らかにした。H2AXをコンディショナルに発現抑制すると、異常な染色体分配が起き、詳細に検討したところ、S121のリン酸化は活性化型AuroraBのセントロメアへの効率よいリクルートに関わり、AuroraBの時空間的な活性化に重要であることが分かった。細胞増殖においてAuroraBの活性および局在が厳密に制御されることが必須であり、S121のリン酸化は分裂期において重要なエピジェネティック修飾であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Proper deposition and activation of Aurora B at centrosomes is critical for faithful chromosome segregation in mammals. We demonstrate here that Aurora B-mediated phosphorylation of histone H2AX at serine 121 promotes Aurora B autophosphorylation and is essential for proper chromosome segregation. H2AX knockout MEFs as well as knockdown cells showed a severe defect in cell proliferation, due to increased abnormal mitosis. H2AX depletion resulted in a severe defect in activation and deposition of Aurora B at centromeres, due to impaired Haspin-dependent H3-T3 phosphorylation. Wild-type H2AX, but not the S121A mutant, effectively rescued the impaired proliferation of H2AX-depleted cells. Taken together, these results indicate that Aurora B-mediated H2AX phosphorylation at S121 provides a platform for Aurora B auto-activation circuitry at centromeres and thus plays a pivotal role in proper chromosome segregation.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヒストン クロマチン 染色体分配 エピジェネティクス Aurora B

1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造は遺伝子発現調節、DNA複製、染色体分配、DNA修復など多彩な現象に必須の働きを持つ。このようなクロマチン構造の機能的制御には、ヒストンの翻訳後修飾、ATP 依存的なクロマチンリモデリング、ヒストンバリエーションによる機能分担が重要である。H2AX ノックアウトマウスはゲノム安定性に必須であり、発がん性が高まること、精子形成異常を伴い不妊になること、が示されているが、DNA 損傷後生じる S139 のリン酸化 (gamma-H2AX) を中心とした報告しかなく、実際にどのようにゲノム安定性の維持および生殖細胞の形成に重要なのかは不明である。

2. 研究の目的

H2A バリエーションである H2AX は染色体安定性維持に必須であり、H2AX ノックアウトマウスは放射線感受性、増殖遅延、不妊、染色体異常を引き起こす。本研究の目的は、ヒストンバリエーション H2AX の染色体分配、DNA 損傷応答、遺伝子発現における機能解析を通して染色体安定性維持機構を明らかにし、がん発症および生殖細胞の分裂異常に伴う疾患の解明と治療法に役立てることである。エピジェネティック修飾異常が癌などの疾患や老化と密接に関連していることから、H2AX を介した多様な制御システムの分子基盤を解明することは極めて重要である。

3. 研究の方法

MEF 細胞、HeLa 細胞は DMEM 培地 (10% FBS, Penicillin-Streptomycin) で 37 度、CO2 濃度 5.0% にて培養した。レンチウイルスの系により、ドキシサイクリン投与後コンディショナルに H2AX の発現を抑制できるヒト細胞株および CRISPR/Cas9 による H2AX ノックアウト HeLa 細胞を樹立し実験に用いた。G1/S で同調する場合は、ダブルチミジンプロックを行い、G2 期で同調する場合は R03306 (Cdk1 阻害剤) を用いた。またノコダゾールで 14 時間処理後、shake off することで prometaphase で同調し、以降の実験に用いた。FACS 解析、タイムラプス観察を行い、それぞれ細胞周期の進行、染色体分配の可視化を検証した。

4. 研究成果

(1) H2AX ノックダウン細胞は染色体分配が異常になる

H2AX は主に C 末が H2A と異なる構造であり、H2AX p53 のダブルノックアウトは p53 シングルと比べてがんになりやすい。また H2AX ノックアウト ES 細胞はゲノム不安定性、DNA 修復の異常、DNA 損傷チェックポイントの異常を示すことから、H2AX は特に DNA 損傷応答に重要なヒストンバリエーションであると認識されている。H2AX 欠損と分裂期の異常については報告されていなかったため、まず H2AX ノックアウト MEF とドキシサイクリン添加によ

り H2AX をノックダウンできる HeLa の増殖を調べた結果、顕著に増殖が遅いことを見出した。細胞周期の進行を詳細に調べるために、Cdk1 阻害剤を用いて G2 期に同調し検討したところ、H2AX ノックダウン細胞においては M 期の進行が遅れており、その後、subG1 が増加し細胞が死ぬことが分かった。そこでより詳細に分裂期の異常を調べるために、H2B-EGFP を細胞内に発現させて、分裂状態を可視化したところ、ノックアウト MEF では多核になっている細胞が多く、また染色体が正常に分配されずに micronuclei として取り残されていることが分かった。このような異常な分裂を示した細胞の割合はコントロールがほぼ 0 に対し、ノックアウト MEF では約 40% であった。HeLa においても同様の結果が得られた。

(2) M 期で H2AX-S121 は AuroraB によりリン酸化される

M 期において H2AX がリン酸化を受け染色体分配に関わる可能性を考え、mitotic phosphorylation proteomics 解析のデータベースにより、T120, S121, S139 が高度に M 期でリン酸化されることを見出した。H2AX の C 末端には、DNA 損傷応答に関わる修飾部位が複数存在し、S139 のリン酸化は DNA 損傷修復に重要であることが分かっている。T120 は H2A にも保存されていることから、S121 のリン酸化に注目した。S121 のリン酸化抗体を作製し免疫染色を行ったところ、prophase から metaphase にかけて最も強いシグナルが染色体上に見られた。またノコダゾール処理により M 期で同調した細胞のクロマチン画分において、最も強いシグナルが検出された。次に S121 をリン酸化する kinase の同定を試みた。AuroraB は chromosome passenger complex (CPC) と呼ばれる複合体の一員として、prophase から metaphase にかけてはセントロメアに局在することが AuroraB の機能に必要である。in vitro において AuroraB のカイネースアッセイを行ったところ、H2AX を AuroraB がリン酸化することが分かった。

次にノコダゾールで M 期に同調させクロマチンと可溶性画分に分けたところ、AuroraB ノックダウン細胞では S121 のリン酸化は見られなかったことから、AuroraB が M 期の S121 のリン酸化に必要であることが分かった。さらに AuroraB とリン酸化 S121 の局在を、分裂期の染色体を spread して詳細に検討した。AuroraB はインナーセントロメアに多く局在し、一方 S121 のリン酸化はアウター側に多く存在することが分かった。そこで AuroraB 活性化型である AuroraB-pT232 の局在について調べると、分裂期の染色体上でアウター側に多く局在することから、S121 のリン酸化は活性化型 AuroraB と共局在していると考えられた。

(3) H2AX-S121 のリン酸化が AuroraB の活性

化に必要である

S121 のリン酸化がセントロメア特異的に見られたことからセントロメアにおける二つのヒストン修飾が H2AX ノックダウンで変化しているかを検討した。その結果、H2AX ノックダウンにより、H2AT120 のリン酸化には影響しなかったが、H3-T3 のリン酸化は著しく減少し、Haspin のクロマチンへの局在が減少することが分かった。T3 のリン酸化は AuroraB のセントロメアの局在に重要であるが、Haspin の活性化には AuroraB が関わっており、正のフィードバックによって調節されている。AuroraB の活性化型である pT232 の局在およびリン酸化量を調べてみると、H2AX ノックダウン細胞では AuroraB の活性化が減少していた。S121 のリン酸化の重要性について検討するために、ノックダウン細胞に WT と S121A を発現させて表現型を検討した。H2AX をノックダウンさせた時に増殖が低下するが、WT を発現させると回復するものの、S121A ではほとんど回復しなかった。

colony formation assay を行ったところ、H2AX ノックダウン細胞および、この細胞に S121A を発現させた細胞では、増殖が回復しなかった。S121 のリン酸化が Haspin や AuroraB と結合するかどうかを調べるために、GST pull down assay を行った。大腸菌で精製した GST-H2AX とノコダゾール処理をした 293T lysate を反応させて、pull down 産物のウェスタンを行ったところ、H2AX のリン酸化をミミックする S121D, 特に S121E と Haspin, AuroraB-pT232 が強く結合した。このことから、S121 のリン酸化は活性化型 AuroraB と Haspin との結合を上昇させるように働いていると考えられた。

以上のことから、これまで DNA 損傷応答において重要な働きを持つことが分かっていた H2AX は、DNA 損傷非存在下においても重要であり、prophase から metaphase において AuroraB の活性が高まると、S121 がリン酸化され、このリン酸化は Haspin および活性化型 AuroraB のクロマチンへの局在に重要であると考えられる。

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 7件)

Iwata T, Uchino T, Koyama A, Johmura Y, Koyama K, Saito T, Ishiguro S, Arikawa T, Komatsu S, Miyachi M, Sano T, Nakanishi M and *Shimada M, The G2 checkpoint inhibitor CBP-93872 increases the sensitivity of colorectal and pancreatic cancer cells to chemotherapy, PLOS ONE, 12: e0178221, 2017 10.1371/journal.pone.0178221 査読

有り

Shimada M and *Nakanishi M, Aurora B twists on histones for activation, Cell Cycle, 2016; 15: 3321. 10.1038/ncomms12059 査読無し

Johmura Y, Yamashita E, Shimada M, Nakanishi K and *Nakanishi M, Defective DNA repair increases susceptibility to senescence through extension of Chk1-mediated G2 checkpoint activation, Scientific Report, 2016; 6: 31194. 10.1038/srep31194 査読有り

*Shimada M, Goshima T, Matsuo H, Johmura Y, Haruta M, Murata K, Tanaka H, Ikawa M, Nakanishi K and *Nakanishi M, Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis Nature Commun., 2016; 7: 12059. 10.1038/ncomms12059 査読有り

Sharif J, Endo A. T, Nakayama M, Karimi M. M, Shimada M, Katsuyama K, Goyal P, Brind'Amour J, Sun M, Sun Z, Ishikura T, Mizutani-Koseki Y, Ohara O, Shinkai Y, Nakanishi M, Xie H, *Lorincz C. M and *Koseki H Activation of Endogenous Retroviruses in Dnmt1-/- ESCs Involves Disruption of SETDB1-Mediated Repression by NP95 Binding to Hemimethylated DNA, Cell Stem Cell, 2016; 19: 81-94. 10.1016/j.stem.2016.03.013 査読有り

Haruta M, *Shimada M, Nishiyama A, Johmura Y, Le Tallec B, Debatisse M and *Nakanishi M, Loss of maintenance DNA methylation results in abnormal DNA origin firing during DNA replication, Biochem Biophys Res Commun., 2016; 469: 960-966. 10.1016/j.bbrc.2015.12.090 査読有り

Murata K, Sato S, Haruta M, Goshima T, Chiba Y, Takahashi S, Sharif J, Koseki H, Nakanishi M and *Shimada M, Physical interaction between MPP8 and PRC1 complex and its implication for regulation of spermatogenesis, Biochem Biophys Res Commun., 2015; 458: 470-475. 10.1016/j.bbrc.2015.01.122 査読有り

〔学会発表〕(計2件)

Midori Shimada, Essential role of auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. Kick-Off Symposium in Nagoya City University 2016 Regulatory Mechanisms of Epigenetic Information and Their Clinical Applications. Aichi, Japan, 2016.

Midori Shimada, Essential role of Auto-activation circuitry on Aurora B-mediated H2AX-pS121 in mitosis. International symposium on chromatin structure, dynamics, and function. Hyogo, Japan, 2015.

〔図書〕(計1件)

ヒストンのリン酸化、ユビキチン化活性測定法、島田 緑、中西 真、エピジェネティクス実験スタンダード，査読無，牛島俊和他編，羊土社，p240-250，2017

〔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.vet.yamaguchi-u.ac.jp/members/shimada-p.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

島田 緑 (Shimada Midori)

山口大学・共同獣医学部・教授

研究者番号：60444981