

平成 23 年 4 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007 ～ 2009  
 課題番号：19310127  
 研究課題名（和文） 遺伝子破壊法を用いた高等真核細胞のクロマチン構造構築因子群の構造機能解析  
 研究課題名（英文） Functional analyses of chromatin structure changing-related factors in higher eukaryotic cells by gene targeting techniques  
 研究代表者  
 中山 建男（NAKAYAMA TATSUO）  
 宮崎大学・理事  
 研究者番号：60031712

研究成果の概要（和文）：ニワトリ DT40 細胞株を用い、遺伝子破壊法を駆使してクロマチン構造構築因子群の欠損変異株を作製して、CAF-1 依存性の急速なヌクレオソーム会合は細胞分裂と DNA 複製に必須であること、HDAC2 は EBF1, Pax5, Aiolos, Ikaros, E2A 遺伝子の発現制御を介して、IgM H 鎖と L 鎖の遺伝子発現をコントロールしていること、GCN5 と BCR シグナリングは ICAD と IAP2 の減少とカスパーゼの活性化を介して、未熟 B 細胞のアポトーシス誘導に協動的に関与していることなどを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：To clarify individual roles of chromatin structure changing-related factors in higher eukaryotic cells, we generated systematically a number of chicken DT40 mutant cell lines, respectively, lacking each of appropriate genes. By analyses of these mutant cells, we obtained important results as follows. (1) CAF-1-dependent nucleosome assembly is essential in DNA replication and cell proliferation via its interaction with PCNA. (2) HDAC2 regulates indirectly gene expressions of IgM H- and L chains via opposite controls of gene expressions of EBF1, Pax5, Aiolos plus Ikaros, and E2A. (3) GCN5 and BCR signaling regulate cooperatively pre-mature B cell apoptosis through both increases of caspase-3 and caspase-8 activities and decreases of ICAD and IAP2.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008 年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
2009 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	15,700,000	4,710,000	20,410,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

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、アポトーシス、転写制御

1. 研究開始当初の背景

|

真核細胞のクロマチン構造は多様な構造・動態をとり、DNA の関与する複製、転写、修復、組換えなどの DNA の関与する多彩な細胞機能の発現を制御する。この構造の多様性を規定する多くの要因の中で、ヒストンのアセチル化は最も重要な要因の1つであり、多種類のヒストンアセチラーゼ(HAT)とデアセチラーゼ(HDAC)によって可逆的に触媒され、クロマチン構造を局所的に変換する。研究開始当初には、ヒストン修飾酵素は酵母の転写調節因子の GCN5 や RPD3 のホモログであること、PCAF などの転写因子複合体構成タンパク質が HAT 活性を持つこと、HDAC 活性も転写因子複合体として転写制御に係っていること、HAT および HDAC はクロマチンアセンブリーにも関与していることなどが明らかにされていた。しかし、高等真核細胞における個々の HAT や HDAC 及び CAF-1 などの生理機能についてはほとんど不明であった。

## 2. 研究の目的

高等真核細胞のクロマチン構造の構築や変換と細胞機能との係り合いを明らかにするため、本研究は主に、コアヒストンのアセチル化に基づくクロマチンの構造変換機構とヌクレオソームアセンブリー機構の2つに焦点を絞って、具体的にはこれらに関与するクロマチン構造構築因子群の構造機能を分子レベルで解明することを目的とした。

## 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 を用いて、ジーン・ノックアウト法を駆使して、HAT (GCN5, PCAF, HAT1), HDAC (HDAC2, HDAC3), クロマチンアセンブリファクター (CAF-1, ASF1), 転写制御因子 (E2A, Aiolos), 種々のヒストンバリエーションなど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

高等真核細胞のクロマチン構造の構築・維持・変換に関する分子機構を解明するため、それに関与する重要因子である CAF-1, ASF1, GCN5, HAT1, HDAC2, HDAC3, E2A, Aiolos, ヒストンバリエーション等の DT40 変異株を作製・解析して、以下のような成果を得た。(1) 細胞増殖に必須な CAF-1 の各サブユニット p48, p60, p150 の欠損はいずれも S 期進行の遅延、DNA 合成能低下などを伴って死滅する。細胞増殖には p150 と p60, PCNA の結合は必須であるが、HP1 との結合は必須でなかった。(2) DNA 複製阻害剤 (HU や APH

等) で誘起される S 期チェックポイントキナーゼ Chk1 の活性化は CAF-1 非存在下で顕著に減少し、DNA 複製チェックポイントを介したシグナル伝達に CAF-1 それ自体が、CAF-1 による新生 DNA 鎖上での rapid ヌクレオソーム形成が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。(3) ASF1 は CAF-1 と同様に細胞増殖に必須であり、その欠損は DNA 合成能低下を伴う S 期進行の遅延、multipolar spindles の形成などを伴って死滅する。増殖には ASF1 と CAF-1p60, HIRA との結合は必要でなかった。(4) HAT1 は細胞質のヒストン H3-H4 を含む複合体の integrity をコントロールすることを明らかにした。HAT1 は細胞質の新生ヒストン H4 の Lys-5, Lys-12 と共にクロマチン結合性ヒストン H4 の Lys-5 のアセチル化も触媒すること、DNA 複製とカップルしたクロマチンアセンブリーには必要でないこと、MMS や CPT による DNA 複製阻害で誘起される DNA 障害の修復に関与することなどを明らかにした。(5) rH2AX と Rad51 パラログ Xrcc3 は相同組換え DNA 修復機構において協調的に機能する。(6) HDAC3 の切断と細胞質への再局在は細胞のアポトーシス過程において重要な役割を果たす。(7) HDAC2 は EBF1, Pax5, Ikaros, Aiolos, E2A の各遺伝子の発現制御を介して、IgM H/L chains の遺伝子発現をコントロールしている。(8) 6個存在する H1 ヒストンバリエーションの1つである H1R は DNA 損傷に対する応答反応に関与する。(9) GCN5 と B 細胞受容体 (BCR) シグナリングは、ICAD と IAP2 の減少およびカスパーゼ活性の活性化を介して、未熟 B 細胞のアポトーシス誘導に協調的に関与する。(10) E2A は survivin, IAP2, caspase-8 の各遺伝子の転写制御を介して、BCR シグナリング依存性の未熟 B 細胞のアポトーシス機構の微細な制御に関与する。(11) Aiolos 欠損はミトコンドリアからのチトクローム c の遊離を促進することを介して、BCR シグナリング依存性の未熟 B 細胞のアポトーシスを増大させる。(12) 6個のヒストン H1 (12 copies) を全て欠損した null mutant はヌクレオソーム構造に変化を及ぼす。(13) クルクミンは U937 細胞で p47-phox, p67-phox の蓄積を介して、レチノイン酸誘導性のスーパーオキシド産生活性を劇的に促進する。(14) 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し、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。(15) 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した ASF1 機能低下変異株の作成を試み、ヒストン結合能の低下したある種の点変異株において ASF1 機能低下変異株を得た。この点変異により 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や相同組換え能の影響はほとんど認められないものの、ある種の損傷剤(エトポシド)に対する感受性は顕著に増加した。

#### 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 14 件)

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

Sonoda, E., Zhao, G.-Y., Kohzaki, M., Dhar, P. K., Kikuchi, K., Redon, C., Pilch, D. R., Bonner, W. W., Nakano, A., Watanabe, M., Nakayama, T., Takeda, S. and Takami, Y.: Collaborative roles of rH2AX and the Rad51 paralog Xrcc3 in homologous recombinational repair. *DNA Repair* 6, 280-292, 2007. (査読有)

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. (査読有)

Nakayama, M., Suzuki, H., Yamamoto-Nagamatsu, N., Barman, H. K., Kikuchi, H., Takami, Y., Toyonaga, K., Yamashita, K. and Nakayama, T.: HDAC2 controls IgMH and L-chain gene expressions via EBF1, Pax5, Ikaros, Aiolos and E2A gene expressions. *Genes Cells* 12, 359-373, 2007. (査読有)

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* 6, 1584-1595, 2007. (査読有)

Kikuchi, H. and Nakayama, T.: GCN5 and BCR signalling collaborate to induce pre-mature B cell apoptosis through depletion of ICAD and IAP2 and activation of caspase activities. *Gene*, 419, 48-55, 2008. (査読有)

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. (査読有)

Toyonaga, K., Kikuchi, H., Yamashita, K., Nakayama, M., Chijiwa, K. and Nakayama, T.: E2A participates in a fine control of pre-mature B cell apoptosis mediated by B cell receptor signaling via transcription regulations of survivin, IAP2 and caspase-8 genes. *FEBS J.* 276/5, 1418-1428, 2009. (査読有)

Kikuchi, H., Yamashita, K., Nakayama, M., Toyonaga, K., Tsuneyoshi, I., Takasaki, M. and Nakayama, T.: Lacking of Aiolos accelerates pre-mature B cell apoptosis mediated by BCR signaling through elevation in cytochrome c release. *BBA-Molecular Cell Research*, 1793, 1304-1314, 2009. (査読有)

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)

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)

Kikuchi, H., Kuribayashi, F., Kiwaki, N. and Nakayama, T.: Curcumin dramatically enhances retinoic acid-induced superoxide generating activity via accumulation of p47-phox and p67-phox proteins in U937 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 395, 61-65, 2010. (査読有)

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)

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)

〔学会発表〕(計 16 件)

菊池秀彦、高見恭成、中山建男：DT40細胞を用いた遺伝子ノックアウト法によるGCN5の機能解析. 日本生化学会九州支部例会. 2007年5月20日、宮崎.

高見恭成、中山建男：DT40細胞を用いたASF1の機能解析. 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会、合同大会. 2007年12月12日、横浜.

菊池秀彦、高見恭成、中山建男：DT40細胞を用いた遺伝子ノックアウト法によるGCN5の機能解析. 第30回日本分子生物学会年会、第80回日本生化学会大会、合同大会. 2007年12月13日、横浜.

菊池秀彦、中山建男：ヒストンアセチルトランスフェラーゼGCN5によるBCRシグナリング制御. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会、合同大会. 2008年12月10日、神戸.

高見恭成、中山建男：ニワトリDT40細胞を用いた histone acetyltransferase-1 (Hat1)の機能解析. 第31回日本分子生物学会年会、第81回日本生化学会大会、合同大会. 2008年12月10日、神戸.

Hirak Kumar Barman、高見恭成、中山建男：ニワトリDT40細胞を用いた histone acetyltransferase-1(Hat1)の機能解析. 平成20年度日本生化学会九州支部例会. 2008年、福岡.

菊池秀彦、豊永健二、山下幸貴、中山雅美、中山建男：転写因子E2AによるBリンパ球アポトーシス制御機構の解析. 日本分子生物学会第9回シンポジウム. 2009年5月11日、宮崎.

高見恭成、Hirak Kumar Barman、中山建男：ニワトリDT40細胞を用いたHat1の機能解

析. 日本分子生物学会第9回シンポジウム. 2009年5月11日、宮崎.

菊池秀彦、豊永健二、山下幸貴、中山雅美、中山建男：転写因子E2AによるBリンパ球アポトーシス制御. 第82回日本生化学会大会. 2009年10月23日、神戸.

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.

木脇直美、菊池秀彦、栗林太、中山建男：GCN5による白血球スーパーオキシド産生系制御機構の解析. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月9日、横浜.

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.

阿部拓也、大沢洸司、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.

菊池秀彦、山下幸貴、中山雅美、豊永健二、中山建男：転写因子AiolosによるBリンパ球アポトーシス制御機構の解析. 第32回日本分子生物学会年会. 2009年12月12日、横浜.

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.

菊池秀彦、中山建男：クルクミンによる白血球スーパーオキシド産生系誘導増強効果. 第33回日本分子生物学会年会/第83回日本生化学会大会、合同大会. 2010年12月9日、神戸.

〔図書〕(計 1 件)

Kikuchi, 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 1 件)

名称：レチノイン酸効果増強剤およびこれを用いたリンパ腫治療剤キット、並びに、活性酸素産生促進剤およびこれを用いた免疫賦活剤

発明者：菊池秀彦、木脇直美、中山建男

権利者：宮崎大学

種類：特許出願

番号：特願 2010-059734

出願年月日：2010年3月16日

国内外の別：国内

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

中山 建男 (NAKAYAMA TATSUO)

宮崎大学・理事

研究者番号：60031712

### (2) 研究分担者

高見 恭成 (TAKAMI YASUNARI)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：80236356

菊池 秀彦 (KIKUCHI HIDEHIKO)

宮崎大学・医学部・助教

研究者番号：10301384