

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770177

研究課題名（和文）哺乳類の細胞周期静止期の維持と分裂の再開を制御する分子機構

研究課題名（英文）The molecular mechanism of quiescent state

研究代表者

島田 緑 (SHIMADA MIDORI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：60444981

研究成果の概要：

DNA 損傷により様々な遺伝子の発現が変化することが知られている。これまで転写誘導を引き起こす機構について多くの報告があるが、転写抑制をもたらす機構はほとんど知られていない。私は DNA 損傷後、クロマチンから Chk1 が解離するため、ヒストン H3-T11 のリン酸化が急速に減少し、サイクリンや Cdk など増殖関連遺伝子の転写が抑制されることを見出した。哺乳類の細胞周期静止期の維持において、増殖関連遺伝子の転写を抑制する機構においても同様に Chk1 を介したヒストン修飾が関与している可能性を示した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	0	1,800,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞周期、DNA 損傷、チェックポイント

1. 研究開始当初の背景

DNA 損傷によってさまざまな遺伝子の発現が変化する。実際、紫外線を照射後、発現量が3倍以上変化する遺伝子は全遺伝子の4%にもおよび、このうち90%は転写が抑制される遺伝子である。DNA 損傷後、転写が活性化される機構については p53 や NFkB のような転写活性化因子の解析から多くの知見が得られているが、転写が抑制される機構はほとんど知られていない。私は転写に重要な役割を果たすヒストンの修飾が DNA 損傷後どのよ

うに変化するかに注目した。Chk1 は DNA 損傷時にセントロソームに移行し、Cdc25 をリン酸化することで Cdk1 の活性を抑制するという重要な機能を持つが、DNA 損傷非存在下においては約20%がクロマチンに結合している。このクロマチンに結合している Chk1 の機能はこれまで知られていなかった。

2. 研究の目的

多細胞真核生物は様々なゲノムストレスに対して複数の防御機構（チェックポイント、

DNA 修復、アポトーシス誘導、早期細胞老化)を持っており、これらの協調した作用により染色体DNAを安定に維持しながら自己複製を行っている。これらの防御機構の破綻は発ガンや様々な遺伝子疾患に大きく寄与している。ストレス応答機構の分子基盤は、タンパク質分解、翻訳後修飾、タンパク質細胞内局在変化、転写調節により制御されており、クロマチン修飾は細胞増殖、分化、老化など多くの重要な生命現象に関わることが示されている。早期細胞老化は、最も重要な癌防御機構であると認識されその重要性がますます注目されている。しかしながら制御機構についてある程度理解が進んでいるチェックポイント、DNA 修復およびアポトーシス誘導に対して、細胞老化の分子機構はほとんど分かっていない。私は①細胞増殖に必要な Chk1 キナーゼがヒストン H3-Thr11 (H3-T11) をリン酸化することにより転写制御を担うこと、②DNA 損傷に反応した転写抑制機構に H3-T11 の脱リン酸化が重要であることを発表した (Shimada M et al. Cell 2008)。この転写抑制機構は、同じく細胞増殖因子の転写が強く抑制される細胞老化の分子機構の解明に大きく貢献すると考えられる。そこで、どのような分子機構により、DNA 損傷後の転写抑制が引き起こされるのかについて検討し、その分子機構を通じて、細胞老化誘導機構を明らかにしたいと考えた。本研究の目的は、申請者が世界に先駆けて報告したヒストン修飾 (H3-T11 の脱リン酸化) に注目し、いかにしてクロマチン構造の変化を伴った不可逆的な増殖停止が導かれ、細胞老化が誘導されるのか、細胞老化の分子機構を明らかにすることである。そして得られた知見を基盤として細胞分化、増殖、老化の分子機構の全体像を解明し、癌治療や癌予防などの応用を最終的な目標としている。

3. 研究の方法

HCT116 細胞は McCoy's 5A 培地で、MEF 細胞、MJ90 細胞、HeLa 細胞は DMEM 培地で 37 度、CO2 濃度 0.5% にて培養した。DNA 損傷方法としては、紫外線照射、X 線照射、ブレオマイシン、ヒドロキシ尿素、アフィディオコリン処理を行い、処理後は細胞をトリプシンにより回収し、タンパク抽出、RNA 抽出を行った。

4. 研究成果

(1) ヒストン H3 の T11 のリン酸化は DNA 損傷後減少する

N 末端側のヒストン (ヒストンテール) は、細胞内でアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化などのさまざまな化学修飾を受け、クロマチンの多様な機能を生み出している。ヒストン H3 の K9 と K14 のアセチル化

は転写の活性化に重要でヒストン H3 の S10 のリン酸化がこれらのアセチル化反応を促進することが知られている。逆に K9 のメチル化は転写の抑制に働く。またヒストン H2A の K5 のアセチル化やヒストン H4 の K8 のアセチル化も転写の活性化に重要である。私はヒストンの修飾が DNA 損傷後どのように変化するかを検討した結果、ヒストン H3 の K9、ヒストン H2A の K5、ヒストン H4 の K8 のアセチル化の減少とともに、ヒストン H3 の T11 のリン酸化が急激に低下することを見出した。S10 のリン酸化は M 期における染色体の凝縮や、間期においては転写の活性化に重要である。T11 はこれらの転写に影響を与える修飾部位に近接して存在していることから、転写において何らかの働きを持つ可能性があるが、その機能は全く分かっていない。私は T11 のリン酸化と DNA 損傷との関係について興味を持ち、まず細胞周期のどの時期にこのリン酸化がおきるかを同調実験により検討した。その結果、M 期特異的な S10 のリン酸化とは対照的に、間期の細胞でも T11 はリン酸化されることが分かった。

(2) T11 のリン酸化を担うキナーゼはチェックポイントキナーゼ Chk1 であった

DNA 損傷後、急激に T11 のリン酸化は減少する。どのキナーゼが T11 をリン酸化し、DNA 損傷後なぜ脱リン酸化されるのか? これまで T11 をリン酸化するキナーゼとしてはセントロメアに局在する M 期キナーゼ、Dlk1 が報告されているが、in vivo におけるこのキナーゼの重要性は示されていない。興味深いことに T11 はチェックポイント因子の Chk1 によってリン酸化されるコンセンサス配列になっている。Chk1 は細胞の増殖とチェックポイントに必要で、その重要な機能の一つは、G2 から M への進行に必要な Cdk1 を、Cdc25 のリン酸化を介して不活性化することである。試験管内におけるキナーゼ活性測定結果より Chk1 は H3 をリン酸化でき、その主な部位は T11 であった。さらにコンディショナル Chk1 欠失細胞の解析から、細胞内においても T11 のリン酸化に Chk1 が必要であることが分かった。

(3) DNA 損傷後にクロマチンから Chk1 が遊離し、H3-T11 のリン酸化が減少する。

DNA 損傷がおきると、ATR によりクロマチン上の Chk1 はリン酸化され、セントロソームへ移行する。そこで DNA 損傷後、クロマチン上の Chk1 とリン酸化された T11 の量的変化について調べると、Chk1 は紫外線を照射後、ただちにクロマチンから遊離し、これと一致して T11 のリン酸化も減少していくことがわ

かった。さらに、DNA 損傷後に Chk1 のクロマチンからの解離を阻害したときの変化を調べた。Chk1 のクロマチンからの解離には ATR によってリン酸化されることが必要なので、ATR をカフェインにより阻害すると、紫外線照射後も Chk1 がクロマチンから解離しなかった。このとき T11 のリン酸化の減少と、転写の抑制も阻害された。私はさらに ATR によるリン酸化部位 S317 と S345 をアラニンに置換した Chk1 (非リン酸化型 Chk1 はクロマチンからの解離が阻害される) を発現させると、紫外線を照射した場合においても T11 のリン酸化の減少と転写の抑制が阻害された。この結果は、DNA 損傷後 Chk1 がクロマチンから遊離することが、T11 の脱リン酸化と転写の抑制に重要であることを示している。

(4) H3-T11 のリン酸化は H3 分子と GCN5 ヒストンアセチラーゼとの結合を促進する。

どのようなメカニズムにより、T11 のリン酸化の減少が転写の抑制を引き起こすのだろうか？私は T11 のリン酸化とともに DNA 損傷後減少する、転写の活性化に重要な K9 のアセチル化に着目した。K9 をアセチル化するヒストンアセチル化酵素は GCN5 である。そこで GCN5 と T11 のリン酸化の関係を調べると、T11 をリン酸化させた H3 ペプチドは非リン酸化型と比べて GCN5 との相互作用が 20 倍上昇するという結果を得た。またサイクリン *BI*, *cdk1* プロモーター領域を用いた ChIP 解析から、DNA 損傷後これらのプロモーター領域から Chk1 が離れ、T11 のリン酸化が減少し、さらに GCN5 の結合と K9 のアセチル化も減少した。すなわち、Chk1 のクロマチンからの解離、T11 のリン酸化の減少と GCN5、K9 のアセチル化の減少には相関があることが示された。以上の結果より私は Chk1 による転写制御について以下のようなモデルを提唱した。通常は Chk1 がクロマチンに存在するので、T11 がリン酸化されており、GCN5 を介した K9 のアセチル化が上昇し、*cdk1* などの転写が活性化される。DNA 損傷が生じると、Chk1 がクロマチンから離れるので T11 のリン酸化が減少し、GCN5 の結合が弱くなるため、K9 のアセチル化が減少し転写が抑制される。Chk1 にはチェックポイントキナーゼとしての働きとともに、ヒストンのリン酸化により、細胞増殖に関わる遺伝子の転写にも重要であることが明らかとなった。私の発表と同時期に PRK1 (Protein kinase C Related Kinase 1) が T11 をリン酸化し、このリン酸化はアンドロジェンレセプター依存的な転写に重要であることが報告された。現在、T11 のリン酸化は転写に重要な新たなヒストン修飾として注目を浴びている。

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 9 件)

- (1) Katsuno Y, Suzuki A, Sugimura K, Okumura K, Zineldeen DH, Shimada M, Niida H, Mizuno T, Hanaoka F and Nakanishi M. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106: 3184-3189, 2009 (査読有り) .
- (2) Zineldeen DH, Shimada M, Niida H, Katsuno Y and Nakanishi M. Ptpcd-1 is a novel cell cycle related phosphatase that regulates centriole duplication and cytokinesis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 380: 460-466, 2009 (査読有り)
- (3) 中西 真、島田 緑
チェックポイントキナーゼ Chk1 による転写制御とストレス応答、細胞工学、28:22-26、2009 (査読無し) .
- (4) Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Tagami H, Tanaka M, Saito H and Nakanishi M. Chk1 is a histone H3-T11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. Cell. 132: 221-232, 2008 (査読有り) .
- (5) Shimada M, Yamada-Namikawa C, Murakami-Tonami Y, Yoshida T, Nakanishi M, Urano T and Murakami H. Cdc2p controls the forkhead transcription factor Fkh2p by phosphorylation during sexual differentiation in fission yeast. The EMBO Journal. 27: 132-142, 2008 (査読有り) .
- (6) Naruyama H, Shimada M, Niida H, Zineldeen DH, Hashimoto Y, Kohri K and Nakanishi M. Essential role of Chk1 in S phase progression through regulation of RNR2 expression Biochem. Biophys. Res. Commun. 374: 79-83, 2008 (査読有り) .
- (7) Shimada M and Nakanishi M. Checkpoint meets transcription at a novel milestone (H3-T11). Cell Cycle. 7: 1555-1559, 2008 (査読有り) .
- (8) 島田 緑、中西 真、
DNA 損傷反応とクロマチン修飾、細胞工学、27:1162-1167、2008 (査読無し) .
- (9) 島田 緑、中西 真、
Chk1 の新しい機能-ヒストン H3-Thr11 のリン酸化を介した転写制御機構、実験医学、26:1740-1743、2008 (査読無し) .

[学会発表] (計 6 件)

(1) Shimada M

DNA damage-induced transcriptional repression through histone H3-Thr11 dephosphorylation, Chromatin meeting, Feb 10, 2009, Singapore

(2) 島田 緑

The role of phosphorylation of H3-Threonine 11 in transcriptional regulation and cellular senescence, 第 9 回がん若手ワークショップ、2008 年 9 月 5 日、蓼科

(3) Shimada M

Checkpoints meet transcription at a novel milestone. International Symposium on Chromosome Dynamics, May 28, 2008, Ise, Japan

(4) Shimada M

DNA damage-induced transcriptional repression through histone H3-Thr11 dephosphorylation. Gordon Research Conferences, Chromatin structure and function, May 11, 2008, Lucca, Italy

(5) 島田 緑

Chk1 に依存したヒストン H3-T11 のリン酸化の減少が DNA 損傷後の転写抑制を引き起こす 第 25 回染色体ワークショップ、2008 年 1 月 30 日、湯河原

(6) 島田 緑

Chk1 に依存したヒストン H3-T11 のリン酸化の減少が DNA 損傷後の転写抑制を引き起こす 第 30 回日本分子生物学会年会、2007 年 12 月 12 日、横浜

[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

<http://www.med.nagoya-cu.ac.jp/w3med/research/reports/results/001.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 緑 (SHIMADA MIDORI)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号 : 60444981

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :