

機関番号：23903
 研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20390083
 研究課題名 (和文) ゲノムストレス応答性転写抑制機構—ヒストン H3-T11リン酸化の制御—
 研究課題名 (英文) Mechanisms of transcriptional repression in response to genome stress—role of histone H3 phosphorylation at T11—
 研究代表者
 中西 真 (NAKANISHI MAKOTO)
 名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授
 研究者番号：40217774

研究成果の概要 (和文)：本研究では、ヒストン H3 分子のトレオニン 11 のリン酸化が DNA 損傷に応答した E2F 標的遺伝子群の発現制御に重要な役割を果たしていることを明らかにした。DNA 損傷非存在下においては E2F 転写因子に Chk1/GCN5 複合体が結合し、トレオニン 11 のリン酸化とリジン 9 のアセチル化を誘導して E2F 標的遺伝子の転写を活性化していることが分かった。DNA 損傷がおこると Chk1/GCN5 複合体が解離し、かわりに Rb/PP1 ガンマー/HDAC3 複合体が結合し、トレオニン 11 の脱リン酸化とリジン 9 の脱アセチル化を協調して制御することで E2F 標的遺伝子の転写を不活性化することを明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：In this study, we found that dephosphorylation of histone H3-pT11 (H3-pT11) plays an essential role in DNA damage-induced transcriptional repression of various E2F-targeting genes. In the absence of DNA damage, Chk1/GCN5 complexes bound to E2Fs and cooperatively catalyzed T11 phosphorylation and K9 acetylation on E2F promoters, thereby activating their transcription. In the presence of DNA damage, Chk1/GCN5 complexes released from E2Fs and in place, Rb-PP1 gamma-HDAC3 complexes bound to E2Fs, leading to dephosphorylation of T11 and deacetylation of K9, which resulted in the transcriptional repression of E2F-targeting genes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2009 年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：遺伝子、核酸、癌、発現制御

1. 研究開始当初の背景

真核細胞は様々な変異原ストレスに晒されており、このストレスに適切に対応することで自己の染色体を安定に維持しながら増殖

している。変異原ストレスに対する反応には、DNA 修復、細胞周期停止、アポトーシス、あるいは早期老化等があるが、これらの細胞

表現の分子基盤は、タンパク質分解、翻訳後修飾、タンパク質細胞内局在変化、転写制御等により制御されている。DNA 損傷に反応した転写制御は全遺伝子の 4%程度の転写が 3 倍以上変化し、そのうち 90%は転写抑制であることが知られている。DNA 損傷に反応した転写活性化機構については p53, NF-κB, AP-1 を介した経路について広く研究されておりその詳細について理解されつつあるが、転写抑制機構の本体については、抑制を受ける遺伝子数が活性化されるものに比較して圧倒的に多いにもかかわらず全く分かっていない。我々は、Chk1 は DNA 損傷非存在下においてはクロマチンに結合しており、DNA 損傷に反応して直ちに解離することを見いだした。このことから Chk1 は正常状態においてクロマチン上で機能していると考え、その基質がヒストン H3 でトレオニン 11(H3-T11)を特異的にリン酸化することを見いだした。このことは H3-T11 の脱リン酸化が転写抑制を制御している可能性を示唆していると考えられた。

2. 研究の目的

Chk1 が H3-T11 のリン酸化を介して様々な遺伝子の転写制御に関与していることを明らかにし、Chk1 に拮抗するフォスファターゼ経路の存在とその分子を同定する。すなわち DNA 損傷に反応して活性化（あるいは局在化変化）する H3-T11 フォスファターゼが存在し、Chk1 経路と同調して H3-T11 のリン酸化程度、ひいては GCN5 のクロマチンへの結合と転写活性化を制御していると考えられる。本研究期間内においては 1.このフォスファターゼ経路の全貌を同定し、ストレス反応に対する細胞応答に如何なる機能を果たすかを明らかにする。さらに、2.E2F 遺伝子群の発現調節に関与しているエピジェネ

ティック複合体を同定し、DNA 損傷に応答した E2F プロモーター上での動的変動について、CHIP-on-ChIP 法を用いたゲノムワイドな解析を行っていく。

3. 研究の方法

(1) H3-T11 脱リン酸化酵素を同定する目的で、In vitro でのフォスファターゼ活性測定系を確立する。すなわち、昆虫細胞から発現精製した Chk1 キナーゼを用いて試験管内で T11 をリン酸化した精製ヒストン H3 を基質として、DNA 損傷存在下、非存在下の核抽出液を用いて H3-T11 の脱リン酸化の程度を、抗 H3-pT11 抗体を用いて解析する。

(2) 上記測定系を用いて、オカダ酸、Fosteiecin、Tautomycin 等の阻害剤を使用して、DNA 損傷に反応した T11 脱リン酸化酵素の種類が PP1, PP2A, PP2B, PP2C のどれかを同定する。

(3) H3-T11 の脱リン酸化を介したサイクリン B1, cdk1 発現低下の生理学的意義を明らかにする目的で、外来的にサイクリン B1, cdk1 遺伝子を導入した後に、Chk1 遺伝子を欠損させて細胞表現を解析する。Chk1 遺伝子の欠損は MEFs 細胞に早期細胞老化を誘導し、S 期における細胞周期停止をきたすことが明らかとなっている。

4. 研究成果

(1) DNA 損傷に反応したヒストン H3-T11 の脱リン酸化を触媒する酵素を同定する目的で、細胞をオカダ酸等のプロテインホスファターゼ阻害剤で処理したところ、PP1 ファミリーが DNA 損傷に反応した T11 の脱リン酸化酵素であることが示唆された。

(2) PP1 ファミリーのプロテインホスファターゼは 3 種類のアイソザイムが存在していることが知られているため、それぞれのアイソザイム特異的な siRNA によりそれぞれのア

イソザイムを発現抑制して解析したところ、PP1 ガンマーが特異的にDNA 損傷に応答してH3-T11 を脱リン酸化する酵素であることが明らかとなった。

(3) DNA 損傷後のPP1 ガンマーの活性変化を解析したところ、DNA 損傷1 時間後にその脱リン酸化活性が著しく上昇していることが分かった。またこの時、PP1 ガンマー分子のT311 のリン酸化がDNA 損傷後に大きくて以下していることが分かった。

(4) DNA 損傷後のPP1 ガンマーのT311 残基の脱リン酸化を介した活性化機序を明らかにする目的で、DNA 損傷後のATRChk1-Cdk 経路によるPP1 ガンマーT311 の脱リン酸化に及ぼす役割について、それぞれのsiRNA 法によるノックダウン、あるいは恒常的な活性化変異体を用いて解析を行った。その結果、ATR の活性化によるChk1 のリン酸化、その後のCdk 活性の抑制が、PP1 ガンマー分子のT311 の脱リン酸化を制御していることが明らかとなった。

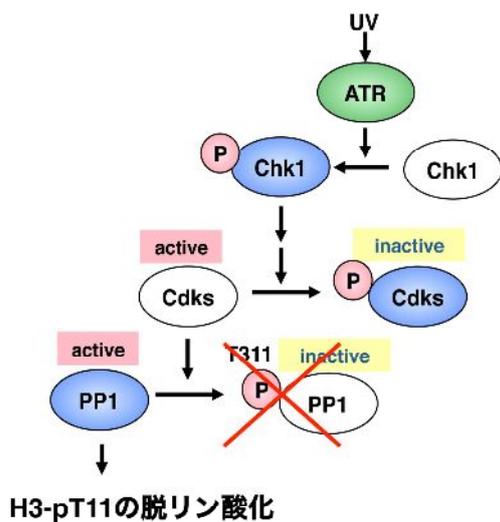


図1 ATR-Chk1 経路によるPP1 ガンマー活性化機構の模式図

(5) Cdk 依存的なT311 残基のリン酸化以外にPP1 ガンマー活性を制御する因子がNIPPI1 であることを同定した。NIPPI1 とPP1ガンマーとの結合はDNA 損傷に反応して解離することも明らかとした。

(6) DNA 損傷に応答したヒストン H3-T11/K9 のリン酸化/アセチル化のバイナリーコードを制御する複合体を解析する目的で、Chk1 およびPP1 ガンマー分子と結合するヒストンアセチル化、脱アセチル化酵素の同定を行った。その結果、DNA 損傷非存在下においてはChk1 分子はGCN5 ヒストンアセチル化酵素と、またDNA 損傷存在化においては、Chk1 分子はGCN5 と解離するが、PP1 ガンマー分子がHDAC3 分子と会合することを見出した。

(7) Chk1/GCN5 複合体、およびPP1 ガンマー/HDAC3 複合体がE2F プロモーター上において、DNA 損傷に反応してどのように動的変動を示すかを明らかにする目的で、サイクリンB1 およびCdk1 遺伝子上のE2F 結合サイトを用いてChIP 解析を行った。その結果、これらE2F サイトにおいてはDNA 損傷に応答してT11 の脱リン酸化とK9 の脱アセチル化が連動して起こること、さらに、DNA 損傷に応答してChk1 分子がE2F プロモーター上から解離し、一方HDAC3 分子が結合することが明らかとなった。また、PP1 ガンマーおよびHDAC3 複合体をE2F プロモーター上に誘導する役割を果たしていると考えられるRb タンパク質が、DNA 損傷に応答してE2F プロモーター領域に結合することが明らかとなった。

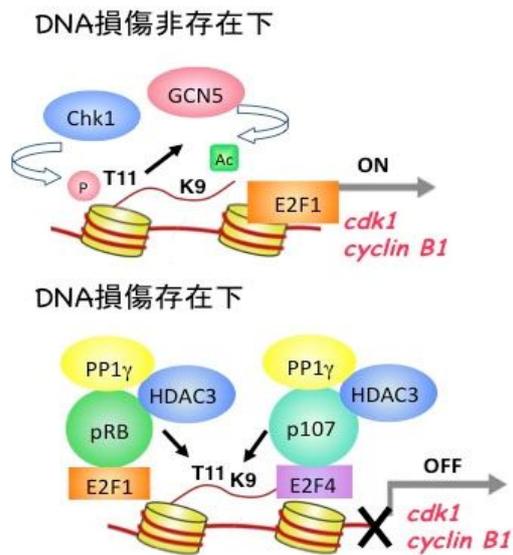


図2 E2F プロモーター上におけるヒストン H3-T11/K9 のリン酸化、アセチル化制御複合体のDNA 損傷存在下、非存在下での動的変動の模式図

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 21 件)

1. Mizutani, E., Suzumori, N., Ozaki, Y., Oseto, K., Yamada-Namikawa, C., Nakanishi, M., and Sugiura-Ogasawara, M. *Hum Reprod.* (査読有り) In press
2. Sugiyama, M., Tanaka, Y., Nakanishi, M., and Mizokami, M. Novel Findings for the Development of Drug Therapy for Various Liver Diseases: Genetic Variation in IL-28B Is Associated With Response to the Therapy for Chronic Hepatitis C. *J Pharmacol Sci.* (査読有り) in press
3. Shimada, M., Haruta, M., Niida, H., Sawamoto, K., and Nakanishi, M. PP1 γ is a phosphatase responsible for dephosphorylation of histone H3 at threonine 11 after DNA damage. *EMBO rep.*

(査読有り)11, 883-889 (2010)

4. Niida, H., Shimada, M., Murakami, H., and Nakanishi, M. Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells. *Cancer Sci.* (査読有り)101, 2505-2509 (2010)
5. Niida, H., Murata, K., Shimada, M., Ogawa, K., Ohta, K., Suzuki, K., Fujigaki, H., Khaw, A.K., Banerjee, B., Hande, P.M., Miyamoto, T., Miyoshi, I., Shirai, T., Motoyama, N., Delhase, M., Appella, E., and Nakanishi, M. Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumor susceptibility in vivo. *EMBO J.* (査読有り)29, 3558-3570 (2010)
6. Murakami, H., Aiba, H., Nakanishi, M., and Murakami-Tonami, Y. Regulation of yeast forkhead transcription factors and FoxM1 by cyclin-dependent and polo-like kinases. *Cell Cycle* (査読有り) 9, 3233-3242 (2010)
7. Sakai, S., Ohoka, N., Onozaki, K., Kitagawa, M., Nakanishi, M., and Hayashi, H. Dual mode of regulation of cell division cycle 25A protein by TRB3. *Biol Pharm Bull.* (査読有り)33, 1112-1116 (2010)
8. Niida, H., Katsuno, Y., Sengoku, M., Shimada, M., Yukawa, M., Ikura, M., Ikura, T., Kohno, K., Shima, H., Suzuki, H., Tashiro, S., and Nakanishi, M. Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. *Genes and Dev.* (査読有り)24, 333-338 (2010)

9. Ohoka, N., Sakai, S., Onozaki, K., Nakanishi, M., and Hayashi, H. Anaphase promoting complex/cyclosome-cdh1 mediates the ubiquitination and degradation of TRB3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り)392, 289-294 (2010)
10. Nakanishi, M., Katsuno, Y., Niida, H., Murakami, H., and Shimada, M. Chk1-cycline A/Cdk1 axis regulates origin firing programs in mammals. *Chromosomal Res.* (査読有り)18, 103-113 (2010)
11. Nakanishi, M., Niida, H., Murakami, H., and Shimada, M. DNA damage responses in skin biology-Implications in tumor prevention and aging acceleration. *J Dermatol Sci.* (査読有り)56, 76-81 (2009)
12. Shimada, M., Yamamoto, A., Murakami-Tonami, Y., Nakanishi, M., Yoshida, T., Aiba, H., and Murakami, H. Casein kinase II is required for the spindle assembly checkpoint by regulating Mad2p in fission yeast. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り)388, 529-532 (2009)
13. Zineldeen, D.H., 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.* (査読有り) 380, 460-466 (2009)
14. Nishizuka, M., Kishimoto, K., Kato, A., Ikawa, M., Okabe, M., Sato, R., Niida, H., Nakanishi, M., Osada, S., and Imagawa, M. Disruption of the novel gene fadl4 causes rapid postnatal death and attenuation of cell proliferation, adhesion, spreading and migration. *Exp. Cell Res.* (査読有り)315, 809-819 (2009)
15. Katsuno, Y., Suzuki, A., Sugimura, K., Okumura, K., Zineldeen, D.H., 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.* (査読有り)106, 3184-3189 (2009)
16. Nagata, D., Hashimoto, Y., Nakanishi, M., Naruyama, H., Okada, S., Ando, R., Tozawa, K., and Kohri, K. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and growth inhibition by its ligands in prostate cancer. *Cancer Detect Prev.* (査読有り)32, 259-266 (2008)
17. Naruyama, H., Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D.H., Hashimoto, Y., Kohri, K., and Nakanishi, M. Essential role of Chk1 in S phase progression through regulation of RNR2 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (査読有り)374, 79-83 (2008)

18. Shimada, M. and Nakanishi, M. Checkpoints meet transcription at a novel histone milestone (H3-T11). *Cell Cycle* (査読有り)7, 1555-1559 (2008).
19. Hikosaka, A., Ogawa, K., Sugiura, S., Asamoto, M., Takeshita, F., Sato, S. Y., Nakanishi, M., Kohri, K., and Shirai, T. Susceptibility of p27 kipl knockout mice to urinary bladder carcinogenesis induced by N-butyl-N-(4-hydroxybutyl)nitrosamine may not simply be due to enhanced proliferation. *Int. J. Cancer* (査読有り)122, 1222-1228 (2008)
20. Shimada, M., Niida, H., Zineldeen, D.H., Tagami, H., Tanaka, M., Saito, H., and Nakanishi, M. Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional repression. *Cell* (査読有り)132, 221-232 (2008)
21. Shimada, M., Yamada-Namikawa, C., Murakami-Tonami, Y., Yoshida, T., Nakanishi, M., Urano, T., and Murakami, H. Cdc2p controls the forkhead transcription factor Fkh2 by phosphorylation during sexual differentiation in fission yeast. *EMBO J.* (査読有り)27, 132-142 (2008)

[学会発表] (計5件)

1. 中西 真

「癌と細胞周期」

平成22年9月22日～24日

第69回日本癌学会総会

ガン研究入門コース

大阪国際会議場

2. 中西 真、島田緑、春田真由美

「Chk1-GCN5 と PP1g-HDAC3 複合体によるヒストンバイナリーコードの変換はDNA損傷によるE2F標的遺伝子の発現を抑制する」

2010 日本分子生物、生化学会合同会議
シンポジウム

平成22年12月10日

神戸ポートアイランド

3. 中西 真

「DNA損傷部位への適切なdNTP供給機構」

平成21年10月2日

第68回日本癌学会学術総会

パシフィコ横浜

4. 中西 真

第67回日本癌学会学術総合シンポジウム

平成20年10月28日～30日

「細胞周期と発がん」

名古屋白鳥センチュリーホール

5. 中西 真

第31回分子生物学会年会、第81回日本生化学学会大会合同大会シンポジウム

平成20年12月8日～12日

「DNA損傷応答における新たなヒストン修飾 H3-T11 のリン酸化を介した転写制御」

神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中西 真 (NAKANISHI MAKOTO)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・教授

研究者番号：40217774