

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月16日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370075

研究課題名（和文）DNA複製・修復、染色体分配におけるヒストン分子の動態

研究課題名（英文）Dynamics of histones during DNA replication, DNA repair, and chromosome segregation

研究代表者

関 政幸 (SEKI MASAYUKI)

東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：70202140

研究成果の概要（和文）：

真核細胞の DNA はヒストン八量体に巻き付きヌクレオソーム構造をとる。しかし DNA 複製や修復時のヒストンの役割については良くわかっていない。本研究では、DNA 複製時にヒストンシャペロン FACT が複製フォーク前方のヌクレオソームの解体を促進することで DNA 複製の進行を担うことを初めて示唆した。一方、DNA 修復において、ヒストン H3 の 56 番目のリジン残基のアセチル化に依存した新規組換え制御機構を発見した。

研究成果の概要（英文）：

The nucleosome is a histone octamer which is wrapped by 146 bp eukaryotic DNA. Dynamics of histones during DNA replication/repair remains elusive. We proposed here that FACT facilitates DNA replication elongation by promoting efficient pre-replicative nucleosome disassembly. Furthermore, we showed that acetylation of histone H3 on lysine 56 is required for homologous recombination.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

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：染色体構築・機能・分配

1. 研究開始当初の背景

ヌクレオソームは、ヒストン(H3-H4)₂ 四量体とヒストン H2A-H2B 二量体ふたつからなるヒストン八量体に DNA が巻き付

いたものである。

DNA 複製時における未解明のヒストン動態の問題として、親鎖ヒストンの娘鎖への分配様式があった。特に親鎖上のヌクレ

オソームを複製時にどのように解体されるか全くわかっていなかった。

一方 DNA 修復とヒストンとの関係については、出芽酵母を用いたヌクレオソームの表面に露出しているヒストン H2A, H2B, H4, H4 のアミノ酸残基をアラニンに置換した 320 のヒストン点突然変異株の解析から DNA 修復に関わる多数のアミノ酸残基が同定されるようになっていた。しかし、DNA 修復に関わる個々のアミノ酸の役割については未解析であった。

2. 研究の目的

本研究では、DNA 複製時の親鎖上のヌクレオソーム解体機構の解明と、DNA 修復における特定のヒストンのアミノ酸残基の役割の解明を目指した。

3. 研究の方法

具体的な方法を箇条書きする。

- (1) ヒストンシャペロン CIA/Asf1 の DNA 複製時の機能を、アフリカツメガエル無細胞 DNA 複製系を用いて生化学的に解析する。
- (2) ヒストンシャペロン FACT の DNA 複製時の機能を、FACT 枯渇トリ細胞を用い、細胞生物学的に特定する。
- (3) DNA 修復に関わるヒストンのアミノ酸残基群の中から、アセチル化修飾を受ける H3-K56 に着目し、その残基が担う DNA 修復を遺伝学的に特定する。

4. 研究成果

上記の研究方法に沿って得た成果を箇条書きする。

- (1) ヒストンシャペロン CIA/Asf1 の DNA 複製時における役割の解明；野生型 CIA/Asf1 およびヒストン結合能を喪失した CIA/Asf11-V94R 変異型をアフリカツメガエル卵抽出系を用いたクロマチン複製系で解析した。その結果、野生型 CIA/Asf1 の添加により複製フォーク進行速度の低下が、逆に CIA/Asf11-V94R の添加による複製フォーク進行速度の加速という予期せぬ結果を得た。様々な角度からの実験結果から、CIA/Asf1 は親鎖ヌクレオソームの解体と、解体されたヒストンの娘鎖への分配に関わるというモデルを提出した (*Genes Cells* 16, 1050-1062, 2011)。
- (2) FACT の DNA 複製時での役割の解明；FACT (SPT16/SSRP1) 複合体の小サブ

ユニット SSRP1 の条件枯渇ニワトリ DT40 細胞を樹立した。SSRP1 枯渇条件下で、複製フォークの進行速度が顕著に低下すること、娘鎖上に新規に形成されるヌクレオソームには影響が見られないことを見いだした。これらのことから、FACT は複製フォークの前方にある親鎖ヌクレオソームの効率的な解体に関与するというモデルが最も本研究で得た結果に合致するという主旨の論文として報告した (*J. Biol. Chem.* 286, 30504-30512, 2011)。

- (3) H3-K56 のアセチル化による相同組換えの制御；ヒストン H3-K56A 変異株において、姉妹染色分体間の組換え (SCR) の効率が著しく低下することを見いだした。この反応には H3-K56 のアセチル化に必要とされるヒストンシャペロン CIA/Asf1 とヒストンアセチル化酵素 Rtt109 が要求された。さらに、H3-K56 のアセチル化の下流で機能する Rtt101-Mms1-Mms22 ユビキチンリガーゼ複合体がこの SCR に必要だった。以上より、本研究で初めて H3-K56 のアセチル化で制御される相同組換えの存在を証明した (*Genes Cells* 15, 945-958, 2010)。

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 20 件)

- (1) Endo, H., Nakabayashi, Y., Kawashima, S., Enomoto, T., Seki, M., Horikoshi, M., Nucleosome surface containing nucleosomal DNA entry/exit site regulates H3-K36me3 via association with RNA polymerase II and Set2., 査読有, *Genes Cells* 17 巻、2012 年、65-81
- (2) Ishikawa, K., Ohsumi, T., Tada, S., Natsume, R., Kundu, L-R., Nozaki, N., Senda, T., Enomoto, T., Horikoshi, M., Seki, M., The roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication., 査読, *Genes Cells* 16 巻、2011 年、1050-1062
- (3) Abe, T., Sugimura, K., Hosono, Y., Takami, Y., Akita, M., Yoshimura, A., Tada, S., Nakayama, T., Murofushi, H., Okumura, K., Takeda, S., Horikoshi, M., Seki, M., Enomoto, T., The histone

- chaperone FACT maintains normal replication fork rates.、査読有、*J. Biol. Chem.* 286 巻、2011 年、30504-30512
- (4) Kawashima, S., Nakabayashi, Y., Matsubara, K., Sano, N., Enomoto, T., Tanaka, K., Seki, M., Horikoshi, M., Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation.、査読有、*EMBO J.* 30 巻、2011 年、3353-3367
- (5) Abe, T., Yoshimura, A., Hosono, Y., Tada, S., Seki, M., Enomoto, T., The N-terminal region of RECQL4 lacking the helicase domain is both essential and sufficient for the viability of vertebrate cells.、査読有、*Biochim. Biophys. Acta* 1813 巻、2011 年、473-479
- (6) Kundu, L. R., Seki, M., Watanabe, N., Murofushi, H., Furukohri, A., Waga, S., Score, A. J., Blow, J. J., Horikoshi, M., Enomoto, T., Tada, S., Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication.、査読有、*Biochim. Biophys. Acta.* 1813 巻、2011 年、1129-1136
- (7) Endo, H., Kawashima, S., Sato, L., Lai, M.S., Enomoto, T., Seki, M., Horikoshi, M., Chromatin dynamics mediated by histone modifiers and histone chaperones in post-replicative recombination.、査読有、*Genes Cells* 15 巻、2010 年、945-958
- (8) Sakamoto, M., Noguchi, S., Kawashima, S., Okada, Y., Enomoto, T., Seki, M., Horikoshi, M., Global analysis of mutual interaction surfaces of nucleosomes with comprehensive point mutants.、査読有、*Genes Cells* 14 巻、2009 年、1271-1330
- [学会発表] (計 36 件)
- (1) 上野岳、岡田裕介、吉田隼人、榎本武美、堀越正美、関 政幸、Global analysis of functional relationships between histone H2A and its variant Htz1、第 34 回分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、横浜
- (2) Yu Nakabayashi, Satoshi Kawashima, Kazuko Matsubara, Norihiko Sano, Takemi Enomoto, Kozo Tanaka, Masayuki Seki and Masami Horikoshi, Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation、第 34 回分子生物学会年会 2011 年 12 月 15 日、横浜
- (3) Yu Nakabayashi, Satoshi Kawashima, Kazuko Matsubara, Norihiko Sano, Takemi Enomoto, Kozo Tanaka, Masayuki Seki, Masami Horikoshi, Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation、第 10 回核ダイナミクス研究会、2011 年 10 月 27 日、札幌
- (4) 関 政幸、ヒストンから迫る DNA 介在反応制御機構、BMB2010 (第 33 回分子生物学会年会；第 83 回生化学会大会)、2010 年 12 月 10 日、神戸
- (5) Yohei Hayashi, Lui Sato, Satoshi Kawashima, Yusuke Akai, Naruhiko Adachi, Ryo Natsume, Toshiya Senda, Masayuki Seki, Masami Horikoshi, Mechanistic models on eukaryotic gene regulation, BMB2010 (第 33 回分子生物学会年会；第 83 回生化学会大会)、2010 年 12 月 10 日、神戸
- (6) Lena R. Kundu, Masayuki Seki, Nanae Watanabe, Hiromu Murofushi, Asako Furukohri, Shou Waga, Alan J. Score, Julian J. Blow, Masami Horikoshi, Takemi Enomoto, Shusuke Tada、Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication、BMB2010 (第 33 回分子生物学会年会；第 83 回生化学会大会)、2010 年 12 月 9 日、神戸
- (7) Tatsuya Ohsumi, Takanori Hirano, Satoshi Kawashima, Gaku Ueno, Hiriki Kurihara, Takemi Enomoto, Masami Horikoshi, Masayuki Seki、Analysis of novel histone chaperone Cdc45 interacting with histone H3-H4、BMB2010 (第 33 回分子生物学会年会；第 83 回生化学会大会)、2010 年 12 月 9 日、神戸
- (8) Hirohito Endo, Satoshi Kawashima, Tomonori Mitsuki, Takemi Enomoto, Masayuki Seki, Masami Horikoshi, The nucleosome entry site regulates H3-K36me3 through the association of RNA polymerase II and Set2 on

chromatin、BMB2010 (第 33 回分子生物学会年会；第 83 回生化学会大会)、2010 年 12 月 9 日、神戸

- (9) Yu Nakabayashi, Lui Sato, Satoshi Kawashima, Gaku Ueno, Masayuki Seki, Masami Horikoshi、*In vivo* analysis of histone variant exchange with H2B-H2A and H2B-Htz1 fusion proteins、BMB2010 (第 33 回分子生物学会年会；第 83 回生化学会大会)、2010 年 12 月 9 日、神戸
- (10) 関 政幸、ヌクレオソームと複製フォークの進行、国立遺伝学研究所研究会「ユビキチン・SUMOによるDNA複製およびDNA修復系の制御」、2010 年 10 月 1 日、三島
- (11) 関 政幸、コアヒストンから迫る核内反応機構の解明へ、第 62 回生命機能研究科コロキウム、2010 年 9 月 15 日、大阪
- (12) 大隅達也、石川勝幸、多田周右、夏目亮、Lena R. Kundu、野崎直仁、千田俊哉、榎本武美、堀越正美、関 政幸、A mutant protein of histone chaperone CIA/Asf1 defective in disrupting histone (H3-H4)₂ tetramer accelerates rate of DNA replication、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- (13) 遠藤博人、関 政幸、川嶋聡、佐藤塁、榎本武美、堀越正美、Acetylation of histone H3-K56 regulates homologous recombination、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- (14) 石川勝幸、大隅達也、阿部拓也、夏目亮、多田周右、千田俊哉、榎本武美、堀越正美、関 政幸、親鎖ヌクレオソーム中のヒストン成分の娘鎖への分配機構解明にむけて、第 82 回日本生化学会大会、2009 年 10 月 10 日、神戸

[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

関 政幸 (SEKI MASAYUKI)
東北大学・大学院薬学研究科・准教授

研究者番号：70202140

(2) 研究分担者 ()

研究者番号：

(3) 連携研究者 ()

研究者番号：