

## 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 1日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570177

研究課題名（和文） M期染色体上におけるエピジェネティック情報の継承機構

研究課題名（英文） Mechanisms of Epigenetic Inheritance in Condensed Mitotic Chromosomes

研究代表者

小村 潤一郎 (KOMURA JUN-ICHIRO)

東北大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：10215410

研究成果の概要（和文）：細胞周期のM期（分裂期）には、DNAは凝縮した染色体の形に詰め込まれ、転写因子はDNAから脱落し、全遺伝子の転写が停止する。このため、M期の染色体の凝縮はDNA関連のすべての代謝活動を不可能にしていると想定されてきた。しかし、M期におけるDNA修復活性について検討したところ、意外なことに、DNA修復は効率よく起こること、すなわちDNA修復因子は凝縮した染色体上でも働きうるということが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：During the mitotic phase of the mammalian cell cycle, DNA is tightly packaged in condensed chromosomes, transcription factors are displaced from DNA, and all genes are silenced. Accordingly, the condensed condition of mitotic chromosomes has been assumed to inhibit all kinds of DNA metabolism. In the present study, DNA repair activity in mitotic cells was investigated. Unexpectedly, it was observed that some modes of DNA repair were functional in mitotic cells, suggesting that the proteins involved in these DNA repair modes could function in condensed mitotic chromosomes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

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

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高等真核生物の細胞では、細胞周期のM期（分裂期）には、クロマチンは高度に凝縮した染色体の形をとり、DNAとヒストンはほとんど隙間なく詰め込まれた状態となる。この時期、すべての遺伝子の転写は停止し、活性遺伝子のプロモーターなど転写関連装

置の構築は失われ、転写因子などの核タンパク質の多くも染色体から脱落する。しかし、M期が終了すると、M期以前にもともと転写されていた遺伝子のみ構築を再建し転写を再開すると考えられている。M期前後の転写因子の振る舞い—M期開始時にプロモーターから脱落し、M期終了時にもともと活性であったプロモーターにのみ再び結合する—

は、各遺伝子の活性／不活性に関するエピジェネティックな情報維持に重要と考えられるが、これを制御する機構については全く不明である。

(2) 上記のM期における染色体凝縮、転写因子の脱落、転写の停止に加え、DNA複製についてもM期には起こらないことから、「M期には、染色体の凝縮のためにDNAにさまざまな機能タンパク質がアクセスすることができず、DNAの代謝活動はすべて不可能になっている」とこれまで想定されてきた。DNAの代謝活動のうち、転写、DNA複製については、M期に起こらないことが証明されているが、一方、DNA修復については、そのように想定されているが実験的証拠はほとんどない。

## 2. 研究の目的

(1) M期前後のエピジェネティック情報の維持と転写因子の振る舞いが、ヒストン修飾に依存している可能性を検討する。具体的には、細胞周期を通して変化しないヒストン修飾（たとえばヒストンH3のリジン4のメチル化）がエピジェネティック情報の保持および転写因子のリクルートを行い、一方、M期に特異的に起こるヒストン修飾の変化（たとえばヒストンH3のスレオニン3およびセリン10のリン酸化）が、M期における転写因子の脱落を指示しているという可能性を考え、とくにM期特異的ヒストンリン酸化を阻止した時の影響を検討する。

(2) DNA代謝活動の一種であるDNA修復がM期に起こるか否かを検討する。

## 3. 研究の方法

(1) 転写因子の脱落とヒストンリン酸化

- ①細胞培養：HeLa細胞を用いた。
- ②転写因子の局在：蛍光抗体法を用いた。転写因子などのDNA結合核タンパク質（TATA-binding protein, heat shock factor 1, CTCF, Ku70）に対する一次抗体、蛍光二次抗体、DNA結合色素 DAPI を用い、転写因子が染色体上に存在するか、細胞質に散らばっているかを判別した。
- ③ヒストンリン酸化の人工的制御：M期には、ヒストンH3のスレオニン3およびセリン10がそれぞれ haspin キナーゼおよび aurora B キナーゼによってリン酸化されるが、haspin に対する siRNA および aurora B キナーゼに対する阻害剤 ZM447439 を用いてM期のリン酸化を妨げた。それぞれのリン酸化の

レベルは、リン酸化ヒストンに対する抗体を用い蛍光抗体法で確認した。

(2) M期のDNA修復

- ①細胞培養：HeLa細胞をノコダゾールで処理し、ほとんどM期細胞のみの集団を調製した。
- ②紫外線損傷の修復：殺菌灯の紫外線（波長254nm）を  $10\text{J}/\text{m}^2$  細胞に照射した。ゲノム全体におけるシクロブタン型ピリミジン二量体および(6-4)光産物の修復を、ELISA法を用いて定量した。DHFR（ジヒドロ葉酸還元酵素）遺伝子およびc-MYC遺伝子の領域におけるシクロブタン型ピリミジン二量体の修復を、サザン法およびT4エンドヌクレアーゼVを用いて定量した。
- ③放射線損傷の修復：200kVのX線を15Gy細胞に照射した。ゲノム全体におけるDNA二本鎖切断の修復を static-field gel electrophoresis 法を用いて定量した。

## 4. 研究成果

(1) 転写因子の脱落とヒストンリン酸化

転写因子は、M期にはDNAから脱落し細胞質中に拡散するが、このことは蛍光抗体法で容易に確認できる（図1）。

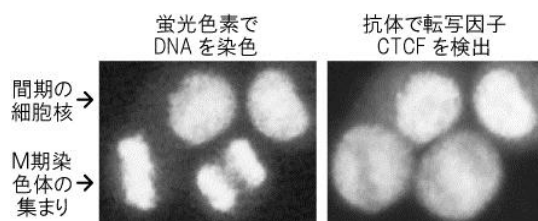


図1. HeLa細胞の蛍光顕微鏡写真。転写因子はM期には染色体から脱落し細胞質全体に拡散する。

M期には、ヒストンH3はスレオニン3およびセリン10の位置でリン酸化されるが、このリン酸化はさまざまな染色体機能を調節していると考えられている。とくに、染色体構成タンパク質のひとつ、ヘテロクロマチンタンパク質（HP1）のM期における染色体からの脱落は、ヒストンH3セリン10のリン酸化によって引き起こされることが明らかになっている。転写因子のM期における脱落が、類似の機構によるものである可能性を検討した。HeLa細胞を薬剤もしくはsiRNA処理し、M期特異的なヒストンH3のリン酸化のレベルを蛍光抗体法で検出できない程度まで低下させた場合の、転写因子（TATA-binding protein, heat shock factor 1, CTCF, Ku70）の振る舞いを蛍光抗体法で調べた。結

果は、M期特異的ヒストンリン酸化を阻害しても、転写因子の脱落は妨げられないというものであった。すなわち、ヒストンリン酸化は、HP 1の脱落を指示していると考えられているが、同様の機構は必ずしも転写因子には当てはまらなると考えられる。

## (2) M期のDNA修復

M期におけるDNA損傷修復の定量的解析を行い、そのほかの時期(間期)の場合と比較した。M期のHeLa細胞に紫外線照射後の(6-4)光産物の修復を定量したところ、間期の場合と同様に非常に効率のよい修復が見られた(図2)。このことは、M期の高度に凝縮した染色体においても、ヌクレオチド除去修復系(とくに global genome repair と呼ばれる経路)の酵素は、DNAの損傷部位に効率よくアクセスし酵素活性を發揮することができることを示している。

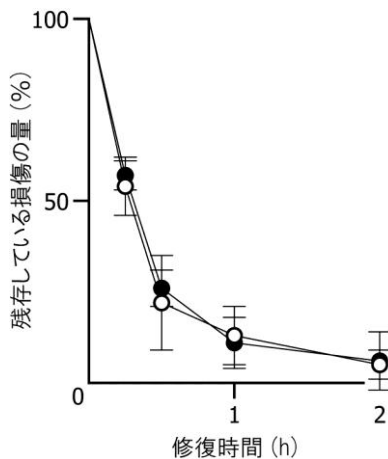


図2. 10J/m<sup>2</sup>の紫外線を照射したHeLa細胞ゲノムにおける(6-4)光産物の修復。ELISA法で損傷を定量。●: 間期細胞、○: M期細胞。

また、M期細胞にX線照射後のDNA二本鎖切断の修復を定量したところ、間期の場合よりは遅いものややはりかなり効率よく修復されることがわかった(図3)。このことは、ふたつある二本鎖切断修復の主経路(homologous recombination および non-homologous end joining)のうち少なくともひとつは、やはりM期の凝縮した染色体において作動可能であることを示唆している。

これらの結果から、M期染色体はDNAを完全に不活性な状態で格納しているわけではないということが出来る。ただ、すべてのDNA修復経路がM期染色体において働くわけではないようである。紫外線によって誘発されるシクロブタン型ピリミジン二量体はヌクレオチド除去修復系のうちのひとつ

の経路である転写共役修復によっておもに修復されるので、転写されている遺伝子領域でのみ効率よい修復が見られることがわかっている。実際、間期細胞ではDHFR および c-MYC 遺伝子で効率のよい修復が観察されたが、M期細胞では認められなかった(図4)。これは、M期にはこれら遺伝子の転写が停止しているため、転写共役修復も起こらないことを示していると考えられる。

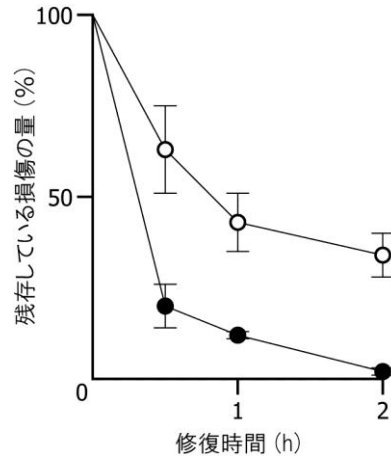


図3. 15GyのX線を照射したHeLa細胞ゲノムにおけるDNA二本鎖切断の修復。Static-field gel electrophoresis法で損傷を定量。●: 間期細胞、○: M期細胞。

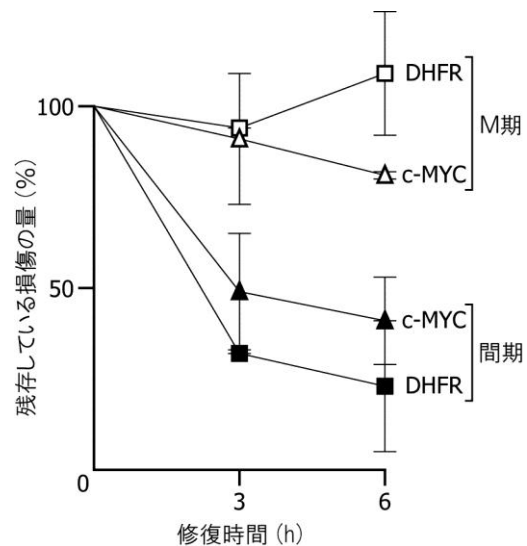


図4. 10J/m<sup>2</sup>の紫外線を照射した間期およびM期のHeLa細胞のDHFRおよびc-MYC遺伝子におけるシクロブタン型ピリミジン二量体の修復。サザン法とT4エンドヌクレアーゼVを用いて損傷を定量。

本研究の成果を概観すると、M期における転写因子の振る舞いに関する機構については、当初予想した結果は得ることができなかった。一方、M期染色体の凝縮した構造と機能の関係については、凝縮したM期染色体はDNAの代謝活動に関して不活性なものであるとするこれまでの通念を否定する結果が得られた。

#### 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4件)

① Komura J, Ikehata H, Mori T, Ono T (2012) Fully functional global genome repair of (6-4) photoproducts and compromised transcription-coupled repair of cyclobutane pyrimidine dimers in condensed mitotic chromatin. *Exp Cell Res*, 318:623-631. (査読あり)

② He D, Uehara Y, Furuya M, Ikehata H, Komura J, Yamauchi K, Kakinuma S, Shang Y, Shimada Y, Ootsuyama A, Norimura T, Ono T (2011) Effects of calorie restriction on the age-dependent accumulation of mutations in the small intestine of lacZ-transgenic mice. *Mech Age Dev*, 132:117-122. (査読あり)

③ 小村潤一郎 (2011) 活性遺伝子のクロマチン微細構造のM期における変化に関する研究. *東北医学雑誌*, 123 (1):37-39. (査読なし)

④ Uehara Y, Ikehata H, Furuya M, Kobayashi S, He D, Chen Y, Komura J, Ohtani H, Shimokawa I, Ono T (2009) XPC is involved in genome maintenance through multiple pathways in different tissues. *Mutat Res*, 670:24-31. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

① 小村潤一郎、池畑広伸、森俊雄、小野哲也、M期の凝縮した染色体におけるDNA修復：効率的なゲノム全体の修復と不活性な転写共役修復、日本放射線影響学会第54回大会、2011年11月18日、神戸商工会議所会館。

② 小野哲也、上原芳彦、池畑広伸、小村潤一郎、放射線誘発突然変異のエイジ依存性、日本放射線影響学会第54回大会、2011年11月18日、神戸商工会議所会館。

③ 小村潤一郎、池畑広伸、森俊雄、小野哲也、M期細胞における効率的なDNA修復、日本放射線影響学会第53回大会、2010年10月22日、京都テルサ。

④ 古谷真衣子、小野哲也、小村潤一郎、上原芳彦、地元祐輔、仲田栄子、高井良尋、大澤郁朗、水素ガスの放射線防護効果、日本放射線影響学会第53回大会、2010年10月22日、京都テルサ。

[図書] (計1件)

① 小野哲也、上原芳彦、小村潤一郎 (2010) 「ゲノムの加齢変化」の項、*新老年学第3版* (大内尉義、秋山弘子、編)、東京大学出版会、pp 23-29.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

小村 潤一郎 (KOMURA JUN-ICHIRO)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：10215410