

機関番号 : 23903

研究種目 : 若手研究 (A)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21689010

研究課題名 (和文) クロマチン修飾を介した細胞老化の分子機構を解明する

研究課題名 (英文) The molecular mechanism of cellular genescence

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・講師

研究者番号 : 60444981

研究成果の概要 (和文) :

私は DNA 損傷後のヒストン修飾の変化に着目し、さまざまな修飾の中でヒストン H3-Threonine 11 (H3-T11) のリン酸化の減少と E2F ターゲット遺伝子の転写抑制との間に相関があることを見出した。さらに、H3-T11 を脱リン酸化酵素 PP1 が脱リン酸化すること、②Chk1 が E2F1 および GCN5 と相互作用し、DNA 損傷後これらの相互作用は減少すること、③Chk1-GCN5 複合体にかわって PP1-HDAC-pRB 複合体が E2F1 ターゲット遺伝子のプロモーター領域にリクルートされること、④DNA 損傷後 Cdk1 の阻害による PP1 の脱リン酸化が減少し活性化されること、を見出した。以上の結果から転写の活性化に必要なヒストン修飾を担う Chk1-GCN5 複合体が DNA 損傷後は PP1-HDAC 複合体に置き換わり、転写が抑制される可能性が示された。

研究成果の概要 (英文) :

Transcriptional repression of E2F1 target genes is regulated by rapid reduction of histone H3-T11 phosphorylation, which is mediated at least in part by DNA damage induced Chk1 dissociation from chromatin. However, molecular mechanism(s) how this dephosphorylation triggers transcriptional repression remains elusive. Here, we identify an 'acetyl/phospho' cassette at H3-K9/T11 on E2F promoters, which is switched by replacement of Chk1-GCN5 complexes with protein phosphatase 1 (PP1)-HDACs complexes scaffolded on Rb-family pocket proteins. PP1 activity toward T11 dephosphorylation is regulated by Cdk1-dependent phosphorylation of PP1 at T311. Under unperturbed condition, Chk1/GCN5 complex existed on E2F1 promoters. After DNA damage, PP1/HDACs complex on pRb was recruited to E2F1. Our results thus suggest that T11 phosphorylation may function as a phospho-acceptor targeted by ATR-Chk1 axis and accelerate K9 acetylation, which is reversed by the activation of PP1 and recruitment of HDACs bound to Rb-related proteins by Chk1-dependent inhibition of Cdks after DNA damage.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	12,100,000	3,630,000	15,730,000
2010 年度	9,500,000	2,850,000	12,350,000
年度			
年度			
年度			
総計	21,600,000	6,480,000	28,080,000

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：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

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を持つため、染色体 DNA を安定に維持しながら自己複製を行うことができる。特に DNA 損傷に対しては、チェックポイント、アポトーシス誘導、様々な遺伝子発現制御を介した恒常的細胞周期停止（早期細胞老化）がそれぞれ協調しながら作動することで、個体レベルにおいて異常細胞の蓄積を防いでいる。DNA 損傷に伴ってさまざまな遺伝子の転写が抑制されることが知られている。我々は DNA 損傷後のヒストン修飾の変化に着目し、さまざまな修飾の中でヒストン H3-Threonine 11 (H3-T11) のリン酸化の減少と E2F ターゲット遺伝子の転写抑制との間に相関があることを見出した。しかしながらその詳細な分子機構は不明であった。

2. 研究の目的

様々なゲノムストレスに対して複数の防御機構が協調して作用することにより、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。DNA 損傷後の増殖関連因子の転写抑制の分子機構の理解は、同じく増殖関連因子の転写が抑制される細胞老化誘導機構の理解につながる。本研究の目的は、クロマチン修飾を介してどのように細胞老化の分子機構が誘導されるのか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) H3-T11 の脱リン酸化酵素は PP1 である。フォスファターゼ阻害剤オカダ酸存在下で UV を照射すると PP1, PP2A 両方を阻害する 100nM 以上で T11 の脱リン酸化が抑制された。さらに siRNA 法を用いた実験により PP1 が DNA 損傷後の T11 の脱リン酸化に必要であることが分かった。実際に PP1 の活性が DNA 損傷後上昇することも分かった。

(2) DNA 損傷後の PP1 の活性調節には Cdk によるリン酸化制御が重要である。一般的にフォスファターゼの活性調節には、Cdk によるリン酸化が重要だと考えられている。Kinase assay やリン酸化部位特異的抗体を用いたウェスタンブロットにより、①Cdk1 は PP1 の T311 をリン酸化する ②PP1 リン酸化フォームは不活性化型、脱リン酸化フォームは活性化型である ③UV 照射後 PP1 の T311 のリン酸化が減少し、活性化状態となることが分かった。

(3) PP1 が RB, HDAC と相互作用することにより、転写抑制を担う。PP1 と相互作用する HDAC を同定するために、クロマチン画分から PP1g を IP し、検討したところ、HDAC3 が相互作用することが分かった。さらに PP1 は HDAC3 だけでなく、Rb, E2F1, p107, E2F4 と相互作用し、Rb と E2F1 との相互作用は UV 照射後上昇することなどが分かった。従って PP1 はこのような蛋白質と相互作用し、DNA 損傷後の転写抑制に働いていると考えられる。ChIP アッセイにより、実際に

cdk1, cyclin B1 プロモーター領域における量的変化について検討した結果、PP1/E2F4/HDAC3/p107/pRb は UV 照射後、これらのプロモーター上で増加することが分かった。さらに Chk1/GCN5/E2F1 間の相互作用は、DNA 損傷が生じるとクロマチン上で解離することが分かった。

従って DNA 損傷がない場合は Chk1/GCN5 がおそらく E2F1 との相互作用を介して E2F ターゲット遺伝子のプロモーター上のヒストン H3 の修飾を行い、転写を活性化していると考えられる。DNA 損傷後はこれらの複合体が変わって、PP1/HDAC3/pRB/E2F1 もしくは p107/E2F4 が働き、転写を抑制すると考えられる。

このような増殖関連因子の転写抑制が最終的に老化細胞特異的なヘテロクロマチン形成や不可逆的な細胞周期の停止を導くことと関連がある。

H3-T11 の脱リン酸化を介した細胞周期関連遺伝子の発現抑制に伴い、増殖関連遺伝子のプロモーター領域のヘテロクロマチン化が誘導されることで、恒常的な細胞周期停止が誘導される可能性が示された。

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 9 件)

- ① PP1 γ is a phosphatase responsible for dephosphorylation of histone H3 at threonine 11 after DNA damage. Shimada M, Haruta M, Niida H, Sawamoto K and Nakanishi M. **EMBO Rep.** **2010 11:883-9** (査読有り)
- ② Cooperative functions of Chk1 and Chk2 reduce tumor susceptibility in vivo. Niida H, Murata K, Shimada M, Ogawa K, Ohta K, Suzuki K, Fujigaki H, Khaw AK, Banerjee B, Hande P, Miyamoto T, Miyoshi I, Shirai T, Motoyama N, Delhase M, Appella E and Nakanishi M. **EMBO J.** **2010 29:3558-70** (査読有り)
- ③ Mechanisms of dNTP supply that play an essential role in maintaining genome integrity in eukaryotic cells Niida H, Shimada M, Murakami

H and Nakanishi M. **Cancer Sci.** **2010 101:2505-9** (査読有り)

- ④ Essential role of Tip60-dependent recruitment of ribonucleotide reductase at DNA damage sites in DNA repair during G1 phase. 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. **Genes and Dev.** **2010 24: 333-338**, (査読有り)
- ⑤ Regulation of origin firing program in mammals through Chk1-cyclin A/Cdk1 axis. Nakanishi M, Katsuno Y, Niida H, Murakami H and Shimada M. **Chromosomal Res.** **2010 18: 103-113**, (査読有り)
- ⑥ DNA damage responses in skin biology-Implications in tumor prevention and aging acceleration. Nakanishi M, Niida H, Murakami H and Shimada M. **J Dermatol Sci.** **2009 56: 76-81**, **2009** (査読有り)
- ⑦ Casein kinase II is required for the spindle assembly checkpoint by regulating Mad2p in fission yeast. Shimada M, Yamamoto A, Murakami-Tonami Y, Nakanishi M, Yoshida T, Aiba H and Murakami H. **Biochem Biophys Res Commun.** **2009 388: 529-532**, (査読有り)
- ⑧ 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.* **2009 106: 3184-3189** (査読有り) .
- ⑨ 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.* **2009 380: 460-466** (査読有り)

[学会発表] (計1件)

- ① The 20th Hot Spring Harbor Symposium
in Japan
Histone binary switch mediated by
Chk1-HAT and PP1-HDAC regulates DNA
damage induced transcriptional
repression
Shimada M
Fukuoka, 2010年8月20日

[図書] (計1件)

- ① 細胞老化とチェックポイント
島田 緑、中西 真
細胞周期フロンティア (共立出版 2010年
p114-118

[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・講師

研究者番号：60444981