

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570170

研究課題名(和文)細胞周期進行におけるヌクレオソーム形成と機能制御に関する研究

研究課題名(英文)Role of protein kinases in nucleosome formation during the progression of cell cycle

研究代表者

本間 美和子 (HOMMA, MIWAKO)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40192538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製に伴いヒストンタンパクの合成が誘導され、新生DNA鎖に取込まれてヌクレオソームを形成する。厳密な制御下にあるこの一連の過程に、細胞の生存と増殖に必須なキナーゼのひとつCK2が関与する機序を明らかにすることを目的とした。活性阻害剤やsiRNAにより細胞内CK2を抑制すると、細胞周期の遅延が観察されると共に、新生ヒストンタンパク量の低下がみられた。また、正常なヌクレオソームの形成にはシャペロンタンパクをふくむ多様な分子群が関与するが、特に新生DNAへ寄与するタンパクの一部が、G1期に直接CK2と相互作用しリン酸化を受けることが示唆された。分子メカニズムの詳細について今後検討する。

研究成果の概要(英文)：The histone deposition into chromatin is an important phenomenon for DNA synthesis and cell proliferation, which is regulated by numerous cellular factors including histone chaperones. We analyzed the unknown mechanistic basis of histone gene translational regulation and chaperoning. When cells were treated with inhibitors or siRNA toward a protein kinase CK2, we observed retarded progression of the cell cycle, lowered expression of histone proteins, and reduced association with chaperon proteins. These imply an involvement of protein kinase for histone deposition onto a newly synthesized DNA and nucleosome formation during the progression of cell cycle.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学

キーワード：キナーゼ CK2 リン酸化 ヒストン ヌクレオソーム

1. 研究開始当初の背景

(1) Serine/threonine kinase のひとつ CK2 について、増殖ならびに細胞周期進行への関与を検討した結果、家族性大腸腺腫症 (FAP) 原因遺伝子 APC がコードするタンパクと CK2 の間に機能的な相互作用があることを明らかにし、さらに CK2 下流直接のターゲットとして eIF5 (eukaryotic translational initiation factor 5) を同定した。CK2 による eIF5 のリン酸化は細胞周期の進行に依存し、正常なタンパク翻訳開始並びに細胞周期進行を指標とする増殖能に重要な役割を果たすことを明らかにした。

(2) CK2 複合体の構成要素を質量分析計、nano-LC Mass Spectrometry 等を用いて解析した結果、細胞周期進行の時間軸とともに、CK2 細胞内局在の変動と、局在に対応する複合体構成要素が変化することを明らかにした。特に核への移行に伴う CK2 機能として、クロマチンへの関与が強く示唆された。

(3) また、酵素活性サブユニットである CK2 α の制御の仕組みについて、構造科学的に解明することを目的とする研究も進行中である。これまでの研究から、CK2 α には活性を制御していると考えられる領域が存在することを見出した。この領域を欠失した変異体を作成し、活性制御のメカニズムを高次構造レベルで解析している。

2. 研究の目的

ゲノムを構成する DNA 複製時には、DNA 倍加と同様に、ヒストン遺伝子発現に続くヒストンタンパクの新たな合成が誘導され、新生 DNA 鎖等に取り込まれてヌクレオソームを形成する。一方、DNA 複製の終結と共に、ヒストン遺伝子 mRNA は速やかに分解され、ヒストンタンパクの合成も終結する。細胞周期進行においては、このようなヒストン遺伝子の厳密な発現制御が重要であり、DNA 複製とリンクして正しく DNA strand を格納する“ヌクレオソーム”が形成される。本研究は、G₁/S 期という特定の細胞周期に誘導される、ヒストンタンパクの合成と終結、複製と連携するヌクレオソームの形成に焦点を絞り、CK2 がそれに関与する機序と下流シグナルを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

細胞周期進行に必須であるヒストンタンパクの合成とその終結、ヌクレオソームの形成という観点から、細胞周期進行の時系列に即したヒストン mRNA とタンパクの発現、ヌクレオソーム形成、その制御に関与するタン

パク質群が、CK2 機能と関連してどのように変化するかを検討した。

具体的には、ヒト由来培養細胞を血清飢餓により G₀ 期へ誘導したのち、血清刺激により同調的に細胞周期を進行させ、およそ 2 時間ごとに細胞集団を採取した。ヒストン遺伝子 mRNA、ヒストンタンパク質、SLBP mRNA とタンパク質の発現、について定量的 PCR ならびにウェスタンブロットにより検討をおこなった。正常な細胞周期進行に伴うこれら分子の変化を調べると共に、CK2 阻害剤、siRNA 処理後の細胞、dominant negative 型 CK2 発現細胞、CK2 直接のターゲットである eIF5 のリン酸化部位変異型を発現させた細胞、についても同様の実験を行った。

また、ヌクレオソーム形成に関与する重要なタンパクとして知られる、複数のシャペロンタンパク等の機能発現について、CK2 の関与を検討を行った。

4. 研究成果

正常な細胞周期進行にともない、各種ヒストンタンパク質の発現誘導とタンパク量の増大が細胞周期特異的に観察された。一方、CK2 阻害剤、siRNA 処理後の細胞、dominant negative 型 CK2 発現細胞では、コントロールの細胞と比べ新生ヒストン mRNA の発現レベルの低下が観察された。

また、われわれが見出した CK2 下流の直接のターゲットである eIF5 について、その CK2 リン酸化部位変異型を発現した細胞では、細胞周期の停滞と共に、新生ヒストン発現の部分的な抑制が見出された。この結果から、正常なヒストンタンパク発現へ CK2 を介する経路の関与が示唆された。

さらに、コアヒストンの DNA 鎖への取り込みにより形成されるヌクレオソームについては、ヒストン deposition に関与するシャペロンタンパク群が、G₁ 期の CK2 活性化に伴い、直接 CK2 と相互作用しリン酸化を受けることが明らかになった。また、ヒストンコードを指標とするクロマチン活性化部位の解析により、コントロール部位と比較して CK2 の相互作用がみられ、遺伝子活性化への関与が考えられた。

以上の結果から、DNA 複製時に必須の役割を果たすヒストンタンパクの発現は、細胞周期進行にともなう CK2 活性化と関連がみられ、その下流シグナルが部分的に関与する可能性が示唆された。また、ヌクレオソーム形成に関与する複数の分子機能へも CK2 によるリン酸化が重要な役割を果たすと考えられた。今後、クロマチン活性化機能については、部位特異性に関与する分子メカニズムについて、また、細胞周期依存的な CK2 活性制御の仕組みについても、詳細な解析を進めて行きたい。

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)

Masato Ogura, Junko Yamaki, Miwako K. Homma and Yoshimi Homma., Phosphorylation of flotillin-1 by mitochondrial c-Src is required to prevent the production of reactive oxygen species, *FEBS Letters*, 査読有, in press (2014).
Miwako K. Homma et al., Maximizing the Potential of Scientists in Japan: promoting equal participation for women scientists through leadership development., *Genes to Cells*, 査読有, 18(7), 529-532 (2013).
Miwako K. Homma et al., Japan's lagging gender equality, *Science*, 査読有, 340(6131), 428-430 (2013).
Masato Ogura, Junko Yamaki, Miwako K. Homma and Yoshimi Homma., Mitochondrial c-Src regulates cell survival through phosphorylation of respiratory chain components., *Biochem. J.*, 査読有, 447, 281-289 (2012).

〔学会発表〕(計12件)

本間美和子、増殖におけるプロテインキナーゼ CK2 機能とその制御、大阪大学蛋白研セミナー、2014年3月14-15日、大阪大学。
本間美和子、CK2 活性制御と関連するサブユニットのリン酸化 (ワークショップ口頭発表)、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3日、神戸。
本間美和子、日本分子生物学会における属性調査と経年調査の意義、第11回男女共同参画学協会連絡会シンポジウム、2013年10月7日、東京。
Miwako K. Homma et al., Role of intramolecular phosphorylation for CK2 activity (Invited Talk), The 7th International Conference on Protein Kinase CK2, 2013年9月12日、Lublin Poland。
Miwako K. Homma et al, Proteomics analysis of CK2 interacting proteins during the progression of cell cycle (Poster Presentation), The 7th International Conference on Protein Kinase CK2, 2013年9月12日、Lublin Poland。
Yoshimi Homma, Masato.Ogura and Miwako.K.Homma, Generation and analysis of transgenic mice producing ROS stably in B cells, The 19th International Charles Heidelberger Symposium, 2013年2月14日、鹿児島。
Miwako K. Homma et al., Proteomic analysis of serine/threonine kinase CK2

associating proteins during the progression of cell cycle., 第85回日本生化学会年会、2012年12月16日、福岡。
Masato Ogura, Junko Yamaki, Miwako K. Homma and Yoshimi Homma., Identification and functional analysis of novel interaction proteins for regulation of reactive oxygen species generation in succinate dehydrogenase., 第85回日本生化学会年会、2012年12月16日、福岡。
Miwako K. Homma et al., Autophosphorylation of CK2 at the N-terminal region is required for its catalytic activity., Cold Spring Harbor Laboratory Symposium, 2011年10月29日、New York, United States.
Miwako K. Homma et al., Identification of autophosphorylation residues in CK2 by mass spectrometry analysis., 第34回日本分子生物学会年会(ワークショップ)、2011年12月16日、横浜。
小椋正人、八巻淳子、本間美和子、本間好 ミトコンドリア c-Src キナーゼ活性を制御する新規相互作用タンパク質の同定と機能解析、第84回日本生化学会大会、2011年9月21日、京都。
小椋正人、本間美和子、本間好 ミトコンドリア c-Src による細胞死制御メカニズム、日本生化学会 東北支部第77回例会、2011年7月23日、仙台。

〔図書〕(計1件)

Miwako K. Homma et al., Protein kinase CK2 on cell proliferation: Assessing the components of the CK2 complex in the nucleus during the progression of cell cycle., 査読有, *Protein kinase CK2 cellular function in normal and disease.* by Khalil Ahmed et al., Springer Inc. (2014)

〔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.fmu.ac.jp/home/biomol/HTML/index.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

本間 美和子 (HOMMA MIWAKO)
福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40192538

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：