

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440007

研究課題名(和文)ゲノム損傷応答修復機構におけるヒストン修飾とクロマチン制御因子の役割

研究課題名(英文)The role of chromatin organization and histone modifications in genome integrity network

研究代表者

高見 恭成 (Takami, Yasunari)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：80236356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNA複製、転写、修復に伴うヌクレオソームの形成や解体等のクロマチン再構築には一連のヒストンシャペロンやヒストン修飾酵素が関与する。本研究ではニワトリDT40変異株を用い生体内におけるヒストンシャペロンの役割を検討することでクロマチン構造制御機構とヒストン修飾・DNA修復機構のクロストークを分子機構を明らかにすることを目的とした。今回CAF-1サブユニットの一つであるRbAp48の機能欠損株の解析からRbAp48はCAF-1複合体の機能に必須の分子であると同時にエピジェネティック制御を介した厳密なクロマチン構造構築に関与する分子であり、ゲノム染色体の安定性に寄与していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：RbAp46/48 family, histone chaperone, is evolutionarily conserved WD40 proteins, which are involved in various chromatin-metabolizing process, but their in vivo functional relevance is yet unclear. To examine the biological role of pRbAp48, we generated a conditional RbAp48-knockout cells. Depletion of RbAp48 led to delayed S phase progression associated with slow DNA synthesis and nascent nucleosome formation, followed by cell death. Prior to cell death, these cells exhibited aberrant mitosis such as highly condensed and abnormal chromosome alignment on the metaphase plate, leading to chromosome missegregation, concomitant with loss of HP1 association to pericentromere and elevated levels of acetylation and slightly decreased levels of methylation, specifically at Lys-9 residue of histone H3. These results suggest that RbAp48 plays an important role for the chromosome stability in proper organization of heterochromatin structure through the regulation of epigenetic mark.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストン クロマチン

1. 研究開始当初の背景

DNA 複製修復反応は、複製、修復蛋白質そのものに加え、染色体内の多数のクロマチン制御因子が関与した複雑な反応である。これら因子によるクロマチン構造の調節機構が複製、修復機構と如何に連携しているかについての詳細は不明である。DNA 複製や転写反応に伴うヌクレオソームの形成や解体等のクロマチン再構築には一連のヒストンシャペロンやヒストン修飾酵素が関与する。クロマチンに取り込まれる前の新規合成ヒストンH3-H4はアセチル化されており、特に細胞質ヒストンアセチル化酵素であるHAT1によって触媒されるH4のLys-5, 12 (H4K5/K12)のジアセチル化は生物種を通じて保存されている。これらアセチル化(H3-H4)₂量体は、複製に共役したクロマチン形成を行うCAF-1(ヒストンH3.1,2 特異的)や転写に共役したHIRA(ヒストンH3.3 特異的)、さらにこれらと協調して働くASF1などのヒストンシャペロンとの結合を介して、DNA鎖上に取り込まれ、脱アセチル化された後、成熟したクロマチンを形成すると考えられている。我々はニワトリDT40細胞を用いたこれらの経路に関与する一連の遺伝子変異株の解析から、CAF-1p150とASF1がヒストンH3-H4を複製DNA鎖上に効率良く取り込む細胞増殖に必須の因子であり、S期の進行およびDNA複製制御機構と密接に関与していることを明らかにしている。ASF1及びCAF-1の欠損細胞では頻繁に複製フォークの進行遅延(停止)が起るが、ssDNAの蓄積による複製チェックポイント活性化を伴わないことがわかり、dsDNA巻き戻し活性の低下によるフォーク進行阻害が考えられた。この結果は、ASF1がヒストン(H3-H4)₂四量体分割活性を有し、MCMヘリカーゼとH3-H4を介して結合するという知見と一致し、ASF1はフォーク前方のヌクレオソームの解離とdsDNA巻き戻しに直接関与すると考えられる。しかしながらCAF-1p150やASF1欠損細胞で生じる複製後のフォーク後方のヌクレオソーム形成不全が複製フォークの進行に影響する可能性もあり、これらヒストンシャペロンのDNA複製制御に関わる詳細は不明である。一方、新規合成ヒストンH4K5/K12のジアセチル化能を欠いたHAT1欠損DT40細胞株は致死ではなく、一見正常なヌクレオソーム形成を行うが、CPTなどの複製中のDNAに傷害を与え

る薬剤に感受性を示す事から、HAT1がDNA修復に関与することが示唆された。さらにHAT1が細胞質H3-H4-ASF1複合体と結合してクロマチン取り込み前の安定なH3-H4を含む複合体形成に関与していること、ASF1を介する細胞内ヒストン代謝やヌクレオソーム形成経路とH4K5/K12のジアセチル化の機能的関連を示唆する知見を得ている。しかしながら新規複製鎖上のH4K5/K12ジアセチル化が修復の過程で有利に働くのか、修復時に除去されたクロマチンの再生に関与しているのかなどの詳細は不明である。これらの一連のクロマチン制御因子のDT40変異株の解析から、ヌクレオソーム形成関連因子やヒストンの化学修飾(酵素)はゲノムの恒常的安定性に極めて重要であることは明らかではあるが、各因子がどの段階でどのように機能するかは不明な点が多く、詳細な解析が必要である。

2. 研究の目的

複製に共役したヌクレオソーム形成を行うCAF-1はp150、p60、p48の3つサブユニットからなる複合体であり、機能構造解析からp150がPCNAとの結合を介して新規複製鎖上にヒストンH3-H4を取り込む中心的な役割を行うと考えられているが他のサブユニットの機能に関しては不明である。WD-40タンパク質であるCAF-1p48はRbAp48として知られるH3-H4結合能を有するヒストンシャペロンであり、CAF-1複合体の他にHAT1複合体、NURD(HDACを含む)クロマチンリモデリング因子、PRC2複合体(ヒストンメチル化酵素を含む)中に含まれているため、クロマチン構造構築に多面的に作用する分子と考えられるがその分子機構の詳細は不明である。また最近HAT1とは別種の細胞質HATであるNAA60が明らかとなったが、この遺伝子機能に関してほとんど研究がなされていない。本研究はDT40変異株を用いたこれらの因子の機能解析を通じてクロマチン形成制御機構を介したゲノム安定性維持の分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

高頻度で相同組換えを起すニワトリBリンバ細胞株DT40を用い、ジーン・ノックアウト/ノックイン法を駆使して、クロマチン関連因子の欠損変異株を系統的に作製した。得られた一連の変異株の表現型を一般的な分子生物学的、細胞生物学的、生化学

的手法で詳細に解析した。

4. 研究成果

DT40細胞を用いてDNA複製にカップルしたヒストン H3/H4 シャペロンであるCAF-1p150を欠損させるとDNA合成の低下、新生鎖上のヌクレオソーム成不全(遅延)、S期の遅延、G2/M期の蓄積を伴い死滅するは既に報告している。新たに作成したRbAp48の条件致死変異株においてもRbAp48の発現抑制によって上記の表現型が得られた。またp48発現抑制に伴いCAF-1p150とp60タンパク質の安定性の低下及び両タンパクの核内の複製fociの集積の消失が認められた。須の因子であることが明らかになった。RbAp48の機能ドメイン解析を様々な欠失及び点変異体を作製し、生存に必須な領域を調べたところ、WDの7つプロペラ構造以外にもN末端とC末端に存在するヘリックス構造が必要であった。変異体タンパク質と他のCAF-1サブユニットやヒストンH4との結合解析から、N末端とC末端にあるそれぞれのヘリックス構造を介してこれらのタンパク質と結合することが明らかになった。

RbAp48の条件致死変異株では発現抑制後期にはM期分裂異常が認められ染色体分配の異常頻度が上昇した。蛍光免疫染色やGFPタグを使ったヘテロクロマチンタンパク質HP1やセントロメアタンパク質の核内動態を調べたところ、正常ではペリセントロメア領域に結合しているHP1がRbAp48の消失に伴い解離していくことが明らかとなった。またこの時期にクロマチン構造がオープンになるエピジェネティックマークとして知られるヒストンH3K9のアセチル化の亢進が認められた。以上の結果からRbAp48はCAF-1複合体の機能以外の働きでエピジェネティック制御を介した厳密なクロマチン構造構築に関与し、染色体の安定性に寄与していることが明らかになった。

細胞質HATの機能に関しては以下の結果を得た。HAT1欠損細胞がカンプトテシンCPT(DNA複製中に2重鎖切断を作る)に高感受性であることはすでに明らかにしている。これは、HAT1阻害とCPTが相乗的にがん治療効果を発揮しうることを意味する。今回、新たに作成したNAA60遺伝子とHAT1遺伝子の二重破壊細胞はさらなるカンプトテシンに対する感受性の増大を示すことを明らかにした。この実験結果は、HAT1とNAA60が新たな抗がん剤のターゲットになること、

さらにこれら細胞質HATの阻害は既存の抗がん剤であるカンプトテシンとの併用でがん治療に効果的である考えられる。

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. Shang WH, Hori T, Westhorpe H, Godek M, Toyoda A, Misu S, Monma S, Takami Y, Fujiyama A, Kimura H, Straight A, Fukagawa T: Acetylation of histone H4 Lysine 5 and Lysine 12 is essential for CENP-A deposition into centromeres. *Nat. Commun.* 7:13465 (2016) (査読有り)
2. Satrimafitrah P, Barman HK, Ahmad A, Nishitoh H, Nakayama T, Fukagawa T, Takami Y: RbAp48 is essential for viability of vertebrate cells and plays a role in chromosome stability. *Chromosome Res.* 24:161-173 (2016) (査読有り)
3. Kadowaki H, Nagai A, Maruyama T, Takami Y, Satrimafitrah P, Kato H, Honda A, Hatta T, Natsume T, Sato T, Kai H, Ichijo H, Nishitoh H: Preemptive quality control protects the ER from protein overload via the proximity of ERAD components and SRP. *Cell Rep.* 13:944-956 (2015) (査読有り)
4. Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: Paired box gene 5 isoforms A and B have different functions in transcriptional regulation of B cell development-related genes in immature B cells. *Microbiol. Immunol.* 59:426-431 (2015) (査読有り)
5. Kikuchi H, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nakayama M, Takami Y, Nishitoh H, Nakayama T: Lack of GCN5 remarkably enhances the resistance against prolonged endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis through up-regulation of Bcl-2 gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 463:870-875 (2015) (査読有り)

6. Kikuchi H, Nakayama M, Kawai C, Kuribayashi F, Mimuro H, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: The histone acetyltransferase p300/CBP associated factor acts as an effective suppressor of secretory immunoglobulin synthesis in immature B cells. *Microbiol. Immunol.* 59:243-247 (2015) (査読有り)
7. Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: GCN5 is involved in regulation of immunoglobulin heavy chain gene expression in immature B cells. *Gene* 544:19-24 (2014) (査読有り)
8. Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: Protein kinase C gene expression is oppositely regulated by GCN5 and EBF1 in immature B cells. *FEBS Lett.* 588:1739-1742 (2014) (査読有り)
9. Kikuchi H, Nakayama M, Kuribayashi F, Imajoh-Ohmi S, Nishitoh H, Takami Y, Nakayama T: GCN5 is essential for IRF-4 gene expression followed by transcriptional activation of Blimp-1 in immature B cells. *J. Leukoc. Biol.* 95:399-404 (2014) (査読有り)

〔学会発表〕(計 4件)

1. 菊池秀彦、中山雅美、栗林太、大海忍、西頭英起、高見恭成、中山建男：Gene expression of protein kinase C theta is oppositely regulated by GCN5 and EBF1 in immature B cells. 第9回日本エピジェネティクス研究会年会，2015 5月25-26日，学術総合センター 一橋講堂(東京都)
2. Satrimafitrah P, Nishitoh H, Takami Y: RbAp48 is essential for viability of vertebrate cells and plays a role in chromosome stability. 平成27年度日本生化学会九州支部例会，2015 5月16-17日，九州大学(福岡県・福岡市)
3. Satrimafitrah P, Nishitoh H, Takami Y: Protective role of Naa60, a cellular acetyl transferase in chemicaly induced DNA damage. 第37回日本分子生物学会 (2014年11月

25-27日パシフィコ横浜(横神奈川県・横浜市)

4. 菊池秀彦、中山雅美、栗林太、大海忍、西頭英起、高見恭成、中山建男：GCN5 is essential for IRF-4 gene expression followed by transcriptional activation of Blimp-1 in immature B cells. 第8回日本エピジェネティクス研究会年会 2014年5月25-27日，東京大学(東京都)

〔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
 高見 恭成 (TAKAMI YASUNARI)
 宮崎大学・医学部・准教授
 研究者番号：80236356

(2)研究分担者
 ()

研究者番号：

(3)連携研究者
 西頭 英起 (NISHITOU HIDEKI)
 宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：00332627

(4)研究協力者
()