

高等真核細胞のクロマチン構造動態とゲノム機能発現制御機構の網羅的解明

●中山 建男¹⁾ ◆高見 恭成²⁾ ◆菊池秀彦¹⁾

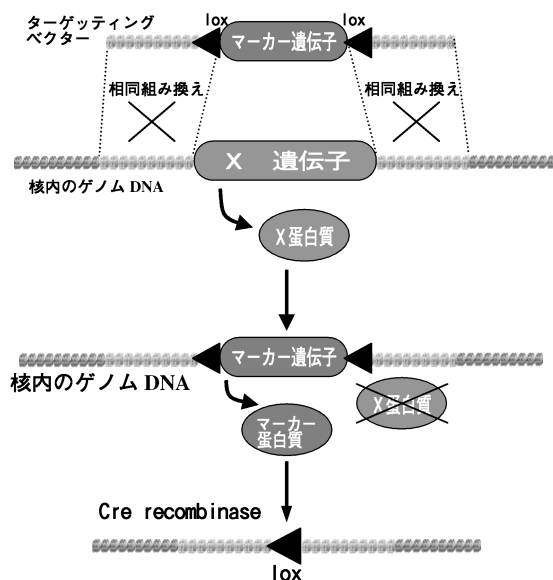
1) 宮崎大学フロンティア科学実験総合センター 2) 宮崎大学医学部

＜研究の目的と進め方＞

真核細胞のクロマチン構造は様々な要因により多様な動態をとり、複製、転写、修復、組換えなどの多彩なゲノム機能発現を制御している。この構造の多様性を規定する主要な要因は各ヒストンサブタイプのバリエーションの存在やコアヒストンのアセチル基による化学修飾などである。この修飾反応はヒストンアセチル化酵素(HAT)と脱アセチル化酵素(HDAC)で可逆的に触媒される。また、クロマチンの会合にはクロマチンアセンブリーファクター(CAF-1)が重要な役割を果たす。本研究の目的はクロマチンの構造変化に基づくゲノム機能発現の制御機構を、1) 各ヒストンバリエーションの機能的差異、2) コアヒストンのアセチル化と3) クロマチンのアセンブリーの3つの側面から明らかにすることである。

具体的な進め方としては、相同組換えに基づくターゲット・インテグレーションを高頻度で起すニワトリBリンパ細胞株DT40を用いて、ジーン・ノックアウト法を駆使して、ほぼ全てのヒストンバリエーション、HAT, HDAC, CAF-1の欠損DT40変異株(ダブルノックアウト株を含めて)を系統的に作成する(図1)。

図1 DT40細胞を用いたジーン・ノックアウト法



細胞増殖に必要なタンパク質に関しては、tet-responsive, conditional mutantを作成する。一連のクロマチン構造改変細胞を解析して、細胞特異的な遺伝子群や細胞増殖に必要な遺伝子群の発現制御などに関わるこれら核タンパク質の機能および相互の補償機能を網羅的に明らかにする。また、個々のHATおよびHDACがどのコアヒストンのLys残基をアセチル化または脱アセチル化するかなども明らかにする。

＜研究開始時の研究計画＞

「ヒストンバリエーションに関して」

- ・未作成のヒストンH1のバリエーションのホモ欠損変異株を作成し、これらの機能を解析する。

「HDACに関して」

- ・未作成のHDAC欠損変異株を作成して、それらの諸性質を調べる。
- ・HDAC-1, 2のダブル欠損変異株は作成出来ず、同時欠損は致死であることが示された。HDAC-3とは異なるプロセスで細胞増殖の制御に係っている可能性があり、2つを同時に欠損したconditional homozygous mutantを作成して、その差異を明らかにする。
- ・HDAC-2はHDAC-3, 4, 7, 8とホモロジーが低く、HDAC-1ともC-末端側の約50個のアミノ酸配列が大きく異なる。HDAC-2がどのLys残基のアセチル基を選択的に脱修飾するかを検討する。
- ・ΔHDAC-2におけるH-chain量の増大は、この遺伝子近傍のクロマチン構造変化を伴っていることが期待される。種々の抗アセチル化ヒストン抗体を用いたクロマチン免疫沈降法でIgM H-chain geneの関与するクロマチンのどのヒストンのどのLys残基のアセチル化レベルの変動がクロマチン構造を変化させ、遺伝子発現を制御しているかを明らかにする。
- ・HDAC-3は他のHDACと異なり、細胞増殖および細胞周期に必須であることが示唆されたので、そのconditional homozygous mutantを作成する。

「HATに関して」

- ・PCAFホモ欠損株は細胞増殖に変化がなく、GCN5ホモ欠損株は細胞増殖が遅延することが明らかになった(doubling time: 12 h → 17 h)ので、細胞周期関連遺伝子群の発現制御機構を調べる。
- ・HAT活性を持つTIP60, ELP3のヘテロ変異株は容易に作成出来たが、ホモ変異株の作成は成功せず、細胞増殖に必須であることが示唆された。これらのconditional homozygous mutantを作成し、これら2つのHAT活性を持つ因子の細胞増殖への関与を明らかにする。
- ・細胞質タイプHATであるHAT1ホモ欠損株を作成しその機能解析を行なう。

「クロマチンアセンブリー関連因子に関して」

- ・クロマチンアセンブリーファクター(CAF-1)は酵母の増殖には必須でないが、高等真核細胞の増殖には必須であることが示唆された。3つのサブユニットp150, p60, p48のconditional homozygous mutantを作成して、CAF-1の機能を解析する。
- ・ヒストンシャペロンHIRA, anti silencing function 1 (ASF1)の欠損変異株を作成して、これらの機能解析を行なう。

＜研究期間の成果＞

「ヒストンバリエーションに関して」

- ・6個のヒストンH1バリエーションそれぞれの欠損株を作成し、総タンパク質を2次元電気泳動法で解析した結果、各H1バリエーションはそれぞれ独自の転写制御機能を持つことが明らかになった（リスト1）。

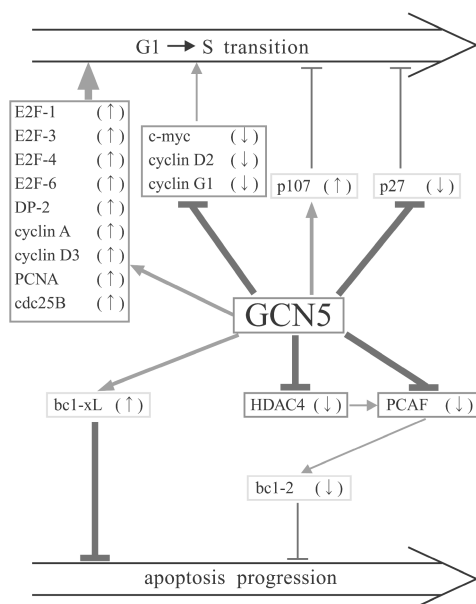
「HDACに関して」

- ・HDAC-3のtet-responsive homozygous mutant を作成した。本変異株は tet 添加後 24 時間でFLAG-tagged HDAC-3は検出出来なくなり、しばらくは正常に増殖し、以後、増殖速度が遅くなり死細胞が増加し、約7日で死滅する。細胞増殖にはHDAC-3のN-末端の約25個のアミノ酸、C-末端の約30個のアミノ酸、核外輸送シグナル(NES)とデアセチラーゼ活性自体が必須であることを明らかにした（リスト2）。
- ・HDAC-2はIgM H-chain geneと同様にIgM L-chain geneの転写も制御することを明らかにし、転写因子OBF-1をクロニングし、その性質を明らかにした（リスト6、7）。また、HDAC-2はIgM H-chain, L-chain geneの転写を直接ではなく数種の転写因子を介して制御していることが示唆された。さらにHDAC-2欠損株では4種のコアヒストンの数箇所の特異的なLys残基のバルクでのアセチル化レベルが変化していた（未発表）。
- ・NAD-dependent HDACであるSIRT1, SIRT2のradiation-induced cell deathへの関与を明らかにした（共同研究：リスト12）。
- ・残りの HDAC-4,7,8 それぞれの欠損ホモ変異株を作成した。

「HATに関して」

- ・GCN5は細胞周期関連遺伝子群（p107, E2F-4, cyclin D2, cyclin D3, cyclin G1, PCNA, bcl-2, bcl-xLなど）の発現制御を介して細胞周期に関与していることを明らかにした。ΔGCN5ではDT40ではほとんど発現していないPCAFの発現が増大し、このPCAFがcyclin D2, cyclin G1の転写は促進させ、さらに、bcl-2の転写も促進させて、GCN5機能の低下（細胞周期および細胞増殖の遅延、アポトーシス細胞の増加など）を一部補償していると考えられる（図2）（リスト11）。

図2 細胞周期関連遺伝子群の発現を一括制御するGCN5の役割

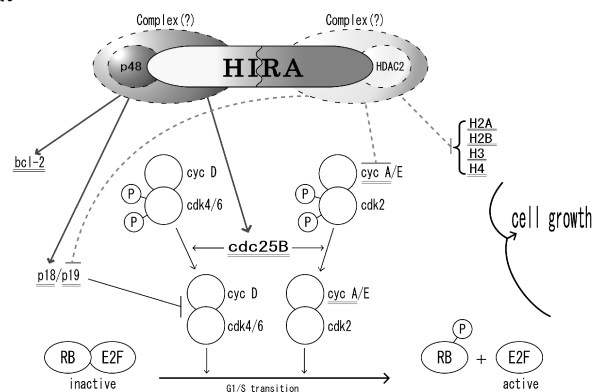


- ・細胞質タイプHAT1のleucine zipper motifはCAF-1p48との結合に必須であること（リスト4）、CAF-1p48ホモログp46はヒストンH2B, H4およびHAT1と異なる部位で結合することを明らかにした（リスト3）。HAT1のホモ欠損株を作成して解析した結果、HAT1はreplication-mediated DNA DSBsの修復に関与することが明らかになった（投稿準備中）。
- ・TIP60, ELP3など他のHATの欠損変異株は現在作成中である。

「クロマチンアセンブリー関連因子に関して」

- ・細胞増殖に必須なCAF-1p48, p60, p150のtet-responsive homozygous mutant を作成した。CAF-1欠損はS期進行の遅延、DNA合成能低下などを伴って死滅する。さらに、CAF-1欠損は新生DNA鎖上のヌクレオソーム形成能低下や様々な染色体異常を伴う。増殖にはp150とp60, PCNAの結合は必須であるが、HP1との結合は必須でなかった。特に、CAF-1はChk-1-mediated replication checkpointに関与することを初めて明らかにした（投稿準備中）。
- ・ASF1はCAF-1と同様に細胞増殖に必須であり、ASF1のtet-responsive homozygous mutantを作成した。ASF1欠損はDNA合成能低下を伴うS期進行の遅延、multipolar spindlesの形成などを伴って死滅する。また、増殖にはASF1とCAF-1p60, HIRAとの結合は必要でなかった（投稿準備中）。
- ・ヒストンシャペロンHIRAのWD motifとLXXLL motifは転写制御機能に必要であることを、さらに、それぞれはCAF-1p48, HDAC-2との結合に必須であることを明らかにした（リスト8、10）。HIRA欠損株を作成して解析した結果、そのN-末端領域、C-末端領域はそれぞれ異なる細胞周期関連遺伝子群の発現制御を介して細胞周期をコントロールしていることを明らかにした（図3）（リスト13）。

図3 細胞周期関連遺伝子群の発現を制御するHIRAの役割



- ・Dicerがヘテロクロマチン形成に必須であることを明らかにした（共同研究：リスト9）。
- ・以上の成果は国内外の2つの総説にまとめて発表した（リスト5、14）。

＜国内外での成果の位置づけ＞

クロマチンのアセンブリーやコアヒストンのアセチル化に基づく構造変化を介したゲノム機能発現制御に関する論文は膨大な数が報告されている。しかし、高等真核

細胞におけるHAT, HDAC, CAF-1, ASF1, HIRAなどの詳細な機能解析はいまだ不明のままである。高等真核細胞のクロマチン構造の形成、維持および変化に係わるこれらの核タンパク質の生理機能をジーン・ノックアウト法を駆使して *in vivo* で網羅的に解明する本研究は世界的にも唯一のものであり、上記のように国内外の2つの総説執筆依頼もそれによる。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

- ・期間内にそれぞれが10数個存在するHAT, HDACの欠損変異株を全て作成することができなかった。特に、細胞増殖に必須な遺伝子のノックアウトには幾つかの conditional mutant 作成の試みが必要なためである。
- ・クロマチンアセンブリーに関与する多くの遺伝子の欠損は致死性を示すため、その作成と機能解析にはかなりの期間が必要なためである。

〈今後の課題〉

- ・未作成のヒストン修飾酵素、クロマチンの会合・構築・変換に関連した遺伝子群の欠損変異株を作成する必要がある。
 - ・作成済および未作成の細胞増殖に必須な遺伝子の conditional mutant の解析を鋭意行なう必要がある。
 - ・シングルノックアウトではその影響が認められない遺伝子でもダブルノックアウトではその表現型に差異が認められるため、様々な組み合わせでのダブルノックアウト、トリプルノックアウト変異株を作成し、網羅的に解析することが必要である。
- 以上のようにして得られた成果を統合して、高等真核細胞におけるクロマチン構造変換を介するゲノム機能発現制御の分子機構を明らかにする必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- (1) Takami, Y., Nishi, R. and Nakayama, T. : Histone H1 variants play individual roles in transcription regulation in the DT40 chicken B cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 268, 501-508(2000).
- (2) Takami, Y. and Nakayama, T. : N-terminal region, C-terminal region, nuclear export signal and deacetylation activity of histone deacetylase-3 are essential for the viability of the DT40 chicken B cell line. *J. Biol. Chem.* 275, 16191-16201(2000).
- (3) Ahmad, A., Takami, Y. and Nakayama, T. : Distinct regions of the chicken p46 polypeptide are required for its *in vitro* interaction with histones H2B and H4 and histone acetyltransferase-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 279, 95-102(2000).
- (4) Ahmad, A., Nagamatsu, N., Kouriki, H., Takami, Y. and Nakayama, T. : Leucine zipper motif of chicken histone acetyltransferase-1 is essential for *in vivo* and *in vitro* interactions with the p48 subunit of chicken chromatin assembly factor-1. *Nucleic Acids Res.* 29, 629-637(2001).
- (5) Nakayama, T. and Takami, Y. : Participation of histones and histone-modifying enzymes in cell functions through alterations in chromatin structure. *J. Biochem.* 129, 491-499(2001).
- (6) Takechi, S., Adachi, M. and Nakayama, T. : Chicken HDAC2 down-regulates IgM light chain gene promoter activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 299, 263-267(2002).
- (7) Takechi, S., Adachi, M. and Nakayama, T. : Cloning

and characterization of the chick Oct binding factor OBF-1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1577, 466-470(2002).

(8) Ahmad, A., Takami, Y. and Nakayama, T. : WD dipeptide motifs and LXXLL motif of chicken HIRA are necessary for transcription repression and the latter motif is essential for interaction with histone deacetylase-2 *in vivo*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1266-1272(2003).

(9) Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T. and Oshimura, M. : Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *nature Cell Biology*, 8, 784-791(2004).

(10) Ahmad, A., Takami, Y. and Nakayama, T. : WD dipeptide motifs and LXXLL motif of chicken HIRA are essential for interactions with the p48 subunit of chromatin assembly factor-1 and histone deacetylase-2 *in vitro* and *in vivo*. *Gene*, 342, 125-136(2004).

(11) Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T. : GCN5: a supervisor in all-inclusive control of vertebrate cell cycle progression through transcription regulation of various cell cycle-related genes. *Gene*, 347, 83-97(2005).

(12) Matsushita, N., Takami, Y., Kimura, M., Tachiiri, S., Ishiai, M., Nakayama, T. and Takata, M. : Role of NAD-dependent deacetylases SIRT1 and SIRT2 in radiation and cisplatin-induced cell death in vertebrate cells. *Genes Cells*, 10, 321-332(2005).

(13) Ahmad, A., Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T. : Different roles of N-terminal and C-terminal halves of HIRA in transcription regulation of cell cycle-related genes which contribute to control of vertebrate cell growth. *J. Biol. Chem.* 280, 32090-32100(2005).

(14) Kikuchi, H., Barman, H. K., Nakayama, M., Takami, Y. and Nakayama, T. : Participation of histones, histone modifying enzymes and histone chaperones in vertebrate cell functions. *Reviews and Protocols in DT40 Research*, Springer-Verlag, Berlin, in press(2006).