

# GCN5及びHDAC-2による細胞周期及び 免疫グロブリン産生の統括的制御機構

(研究課題番号：16310134)

平成16年度～平成18年度 科学研究費補助金

(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 中山 建 男

宮崎大学フロンティア科学実験総合センター教授

## 1. はしがき

平成16～18年の3年度に渡って、「GCN5及びHDAC-2による細胞周期及び免疫グロブリン産生の統括的制御機構」という研究課題で科学研究費補助金（基盤研究（B）、課題番号16310134）を交付して頂きました。この冊子は本研究の成果を取りまとめたものです。

私共は、高等真核細胞で唯一、高頻度でターゲット・インテグレーションを起すニワトリBリンパ細胞株DT40を用いて、多くのヒストン修飾酵素であるヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)およびデアセチラーゼ(HDAC)やクロマチンアセンブリーファクター（ヒストンシャペロン）などの遺伝子群の欠損変異株を系統的に作成し解析して、クロマチン構造構築や構造変換と細胞機能との係り合いを明らかにすることをやっている。本研究は、主にコアヒストンのアセチル基による化学修飾に基づくクロマチンの構造変化とクロマチンの構築に焦点を絞って分子レベルで明らかにすることを目的とした。具体的には、ジーン・ノックアウト法を用いて、HAT (GCN5, HAT1), HDAC (HDAC2, HDAC3) やクロマチンアセンブリーファクター(CAF-1, ASF1)などの欠損DT40変異株を系統的に作成した。得られた一連のクロマチン構造改変細胞を解析して、高度に分化したB細胞に特異的な遺伝子群や細胞増殖に必須な遺伝子群の発現制御などに係わるこれら核蛋白質やヒストンシャペロンに関して、次のような特異的な機能を明らかにすることが出来た。

- 1) GCN5欠損DT40株においては、E2Fファミリー、サイクリン群、PCNAやc-mycなどの細胞周期制御関連遺伝子の発現に大きな変化が認められ、GCN5がこれらの遺伝子の発現を一括制御することによって、細胞周期を統括的に支配していることを明らかにした。
- 2) PMA/イオノマイシン処理で野生株は死滅するが、GCN5欠損DT40株ではアポトーシスが誘導されないという顕著な相違があることを初めて明らかにした。また、bcl-2, bcl-xLの他、PKCファミリー、カスパーゼファミリーや種々の転写因子の遺伝子発現に変化が生じていた。特に、アポトーシス制御因子であるPKCファミリーは大きな発現変化が認められ、GCN5がPKCファミリーの遺伝子発現を制御するkey factorである可能性が強く示唆された。
- 3) HDAC2欠損変異株の解析から、HDAC2は直接、IgM H-chain geneの関与するクロマチン構造を変化させるのではなくて、転写因子であるPax5, EBF1, E2A遺伝子などの発現制御を介して、IgM H-chain geneの発現をコントロールしていることを明らかにした。また、HDAC3はDT40細胞の生存に必須である。
- 4) HAT1欠損変異株の解析から、HAT1は細胞質と核の双方に局在し、細胞質の新生ヒストンH4のLys-5, Lys-12と共にクロマチン結合性ヒストンH4のLys-5のアセチル化も触媒し、さらに、DNA複製阻害で誘起されるDNA障害の修復に関与することを明らかにした。
- 5) 細胞増殖にはCAF-1p150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。CAF-1欠損変異株の解析から、DNA複製チェックポイントを介した一連のシグナル伝達にCAF-1それ自体か、あるいはCAF-1による新生DNA鎖上でのrapidヌクレオソーム形成が重要な役割を果たしていることが示唆された。
- 6) ASF1はCAF-1と同様に細胞増殖に必須であり、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。

以上のように、高等真核細胞のクロマチン構造の構築・維持・変換機構におけるヒストン修飾酵素およびヒストンシャペロンなどの生理機能に関する多くの興味ある知見をin vivoで得ることが出来、当初の目的は十分に達成出来たと考えております。

3年間に渡り、科学研究費補助金を交付して頂いたことに対して、ここに深く謝意を表すものであります。

平成19年3月

中山 建男

## 2. 研究組織

研究代表者： 中山建男（宮崎大学フロンティア科学実験総合センター教授）  
研究分担者： 高見恭成（宮崎大学医学部助教授）  
研究分担者： 菊池秀彦（宮崎大学フロンティア科学実験総合センター助手）

## 3. 研究経費

平成16年度	6,500千円
平成17年度	4,600千円
平成18年度	4,600千円
計	15,700千円

## 4. 研究発表

### (1) 学会誌等

- 1) Takechi, S., Yamaguchi, T., Nomura, H., Minematsu, T. and Nakayama, T. (2004) Growth inhibition and mutagenesis induced in *Escherichia coli* by dihydropyrazines with DNA strand-cleaving activity. *Mutation Research* 560, 49-55.
- 2) Fukagawa, T., Nogami, M., Yoshikawa, M., Ikeno, M., Okazaki, T., Takami, Y., Nakayama, T. and Oshimura, M. (2004) Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *nature Cell Biology* 8, 784-791.
- 3) Ahmad, A., Takami, Y. and Nakayama, T. (2004) 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.
- 4) Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T. (2005) 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.
- 5) Matsushita, N., Takami, Y., Kimura, M., Tachiiri, S., Ishiai, M., Nakayama, T. and Takata, M. (2005) Role of NAD-dependent deacetylases SIRT1 and SIRT2 in radiation and cisplatin-induced cell death in vertebrate cells. *Genes Cells* 10, 321-332.
- 6) Ahmad, A., Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T. (2005) Different roles of N-terminal and C-terminal halves of HIRA in transcription regulation of cell cycle-related genes that contribute to control of vertebrate cell growth. *J. Biol. Chem.* 280, 32090-32100.
- 7) Kikuchi, H., Barman, H. K., Nakayama, M., Takami, Y. and Nakayama, T. (2006) Participation of histones, histone modifying enzymes and histone chaperones in vertebrate cell functions. *Reviews and Protocols in DT40 Research* Springer-Verlag, Berlin, 225-243.

- 8) Sanematsu, F., Takami, Y., Barman, H. K., Fukagawa, T., Ono, T., Shibahara, K. and Nakayama, T. (2006) Asf1 is required for viability and chromatin assembly during DNA replication in vertebrate cells. *J. Biol. Chem.* 281, 13817-13827.
- 9) Barman, H. K., Takami, Y., Ono, T., Nishijima, H., Sanematsu, F., Shibahara, K. and Nakayama, T. (2006) Histone acetyltransferase 1 is dispensable for replication-coupled chromatin assembly but contributes to recover DNA damages created following replication blockage in vertebrate cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 345, 1547-1557.
- 10) Takami, Y., Ono, T., Fukagawa, T., Shibahara, K. and Nakayama, T. (2007) Essential role of CAF-1-mediated rapid nucleosome assembly for DNA replication and cell division in vertebrate cells. *Mol. Biol. Cell* 18, 129-141.
- 11) Sonoda, E., Zhao, G.-Y., Kohzaki, M., Dhar, P. K., Kikuchi, K., Redon, C., Pilch, D. R., Bonner, W. M., Nakano, A., Watanabe, M., Nakayama, T., Takeda, S. and Takami, Y. (2007) Collaborative roles of rH2AX and the Rad51 paralog Xrcc3 in homologous recombinational repair. *DNA Repair* 6, 280-292.
- 12) Escaffit, F., Vaute, O., Chevillard-Briet, M., Segui, B., Takami, Y., Nakayama, T. and Trouche, D. (2007) Cleavage and cytoplasmic relocalisation of histone deacetylase 3 is important for apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 27, 554-567.
- 13) Tanii, I., Yagura, T., Inagaki, N., Nakayama, T., Imaizumi, K. and Yoshinaga, K. (2007) Preferential localization of rat GAPDS on the ribs of fibrous sheath of sperm flagellum and its expression during flagellar formation. *Acta Histochem. Cytochem.* in press.
- 14) Nakayama, M., Suzuki, H., Yamamoto-Nagamatsu, N., Barman, H. K., Kikuchi, H., Takami, Y., Toyonaga, K., Yamashita, K. and Nakayama, T. (2007) HDAC2 controls IgM H and L-chain gene expressions via EBF1, Pax5, Ikaros, Aiolos and E2A gene expressions. *Genes Cells* 12, 359-373.

## (2) 口頭発表等

### シンポジウム等

- 1) 中山建男、高見恭成、菊池秀彦、Ahmad Ahyer：ジーンノックアウト法を用いたヒストンアセチル化の機能解析。大阪大学蛋白質研究所セミナー「ヒストンの修飾とその機能」。2004、大阪。
- 2) Takami, Y.: Functional role of chromatin assembly factor-1 in vertebrates. The 21st Radiation Biology Center International Symposium. 2004, Kyoto.

### 一般講演等

- 1) 実松史幸、高見恭成、中山建男：ヌクレオソームアセンブリーファクターAsf1のジーンターゲットイング法による機能解析。日本生化学会九州支部例会。2004、熊本。
- 2) Takami, Y., Fukagawa, T. and Nakayama, T.: Chromatin assembly factor 1-mediated nucleosome assembly, coupled with DNA replication, is essential for cell proliferation in vertebrate cells. 第77回日本生化学会大会。2004、横浜。
- 3) Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T.: Analysis of gene-acetylated histone interactions in the GCN5-deficient DT40 cells by ChIP assay. 第77回日本生化学会大会。2004、横浜。

- 4) Sanematsu, F., Takami, Y. and Nakayama, T.: Asf1 is essential during S and M phases of cell cycle in DT40 cells. 第77回日本生化学会大会. 2004、横浜.
- 5) 高見恭成、柴原慶一、深川竜郎、中山建男：高等動物細胞におけるクロマチンアセンブリーファクター1 (CAF-1)の機能解析. 第27回日本分子生物学会年会. 2004、神戸.
- 6) 菊池秀彦、高見恭成、中山建男：GCN5 による細胞周期関連遺伝子発現調節機構の解析. 第27回日本分子生物学会年会. 2004、神戸.
- 7) 実松史幸、高見恭成、中山建男：Asf1 は高等真核細胞の増殖に必須であり、S 期の進行に影響を与える. 第27回日本分子生物学会年会. 2004、神戸.
- 8) Barman, H. K., Takami, Y. and Nakayama, T.: The functional linkage between HAT1 and newly synthesized histone H4 in DNA damage repairs in vertebrate cells. 第27回日本分子生物学会年会. 2004、神戸.
- 9) 橋本秀春、高見恭成、園田英一郎、武田俊一、中山建男、立花誠、眞貝洋一：リンカーヒストン H1 バリエーション間での DNA 損傷に対する感受性の差異. 第27回日本分子生物学会年会. 2004、神戸.
- 10) 高見恭成、実松史幸、柴原慶一、深川竜朗、中山建男：DT40 細胞を用いたクロマチンアセンブリー関連因子の機能解析. 第22回染色体ワークショップ. 2005、仙台.
- 11) Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T.: GCN5 regulates cellular signaling induced by PMA/ionomycin treatment. 第78回日本生化学会大会. 2005、神戸.
- 12) Barman, H. K., Takami, Y. and Nakayama, T.: Chicken HAT1 contributes in cytoplasmic histone H4 stability and replication coupled DNA double-strand break repair. 第78回日本生化学会大会. 2005、神戸.
- 13) Takami, Y., Sanematsu, F., Ono, T., Shibahara, K. and Nakayama, T.: Chromatin assembly factor 1 (CAF-1) and ASF1-mediated nucleosome assembly, coupled with DNA replication, is essential for cell proliferation in vertebrate cells. 第78回日本生化学会大会. 2005、神戸.
- 14) 橋本秀春、園田英一郎、高見恭成、中山建男、武田俊一、眞貝洋一：Linker histone H1 is involved in homologous recombination repair pathway. 第28回日本分子生物学会年会. 2005、福岡.
- 15) 菊池秀彦、高見恭成、中山建男：DT40 細胞を用いた遺伝子ノックアウト法による GCN5 ファミリーの機能解析. 第28回日本分子生物学会年会. 2005、福岡.
- 16) 実松史幸、高見恭成、中山建男：The functional analysis of Asf1 in DT40 cell lines by gene targeting techniques. 第28回日本分子生物学会年会. 2005、福岡.
- 17) 実松史幸、高見恭成、Barman H. K.、中山建男：ヒストンシャペロン Asf1 に依存したクロマチン形成は細胞増殖に必須である. 日本生化学会九州支部例会. 2006、福岡.
- 18) Takami, Y., Sanematsu, F., Ono, T., Shibahara, K. and Nakayama, T.: Roles of CAF-1 and ASF1 in a nucleosome assembly coupled with DNA replication and cell proliferation in vertebrate cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006, Kyoto.
- 19) Barman, H. K., Takami, Y., Nishijima, H., Ono, T., Shibahara, K. and Nakayama, T.: The impact of HAT1 in forminf stable H4-containing complex in the cytoplasm of chicken DT40 cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006, Kyoto.
- 20) Kikuchi, H., Takami, Y. and Nakayama, T.: Functional analysis of the chicken GCN5 family using gene targeting techniques in DT40 cells. 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress. 2006, Kyoto.

## 5. 研究成果の概要

真核細胞における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 DNA の関与する多彩な細胞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な要因としては、ヒストンのアセチル化、メチル化、リン酸化などの化学修飾がある。コアヒストンのアセチル化は多種類のヒストンアセチルトランスフェラーゼ(HAT)およびデアセチラーゼ(HDAC)によって可逆的に触媒され、クロマチン構造を局所的に変換する。これらのヒストン修飾酵素の遺伝子は酵母のグローバルな転写調節因子として知られていた遺伝子(GCN5 や RPD3)のホモログであることが明らかになった。さらに、PCAF, P300/CBP, TAF230/250 などの転写因子複合体構成蛋白質が HAT 活性を有し、HDAC 活性も大きな転写因子複合体を形成して、転写制御に係わっていることなどが明らかにされつつある。また、HAT および HDAC はクロマチンアセンブリーにも重要な役割を果たすことも明らかにされてきた。

私共は、高等真核細胞で唯一、高頻度でターゲット・インテグレーションを起すニワトリ B リンパ細胞株 DT40 を用いて、多くの HAT, HDAC などのヒストン修飾酵素やクロマチンアセンブリーファクター (ヒストンシャペロン) などの遺伝子群の欠損変異株を系統的に作成して解析することによって、クロマチン構造構築や構造変換と細胞機能との係り合いを明らかにすることをを行っている。本研究は、主にコアヒストンのアセチル基による化学修飾に基づくクロマチンの構造変換機構とヌクレオソームアセンブリー機構の2つに焦点を絞って分子レベルで明らかにすることを目的とした。具体的には、ジーン・ノックアウト法を用いて、HAT (GCN5, HAT1), HDAC (HDAC2, HDAC3)やクロマチンアセンブリーファクター (CAF-1, ASF1, HIRA)などの欠損 DT40 変異株を系統的に作成した。得られた一連のクロマチン構造改変細胞を解析して、高度に分化した B 細胞に特異的な遺伝子群や細胞増殖に必須な遺伝子群の発現制御などに係わるこれら核タンパク質やヒストンシャペロンに関して、次のような特異的な機能を明らかにすることが出来た。

### (1) GCN5 について

- GCN5 欠損 DT40 株においては、E2F ファミリー、サイクリン群、PCNA や c-myc などの多数の細胞周期制御関連遺伝子の発現に大きな変化が認められ、GCN5 がこれらの遺伝子の発現を一括制御することによって、細胞周期を統一的に支配していることを明らかにした。
- PMA/イオノマイシン処理で野生株および PCAF 欠損 DT40 株は死滅するが、GCN5 欠損 DT40 株ではアポトーシスが誘導されないという極めて顕著な相違があることを初めて明らかにした。
- GCN5 欠損 DT40 株では、アポトーシス関連因子である bcl-2, bcl-xL の他、PKC ファミリー、カスパーゼファミリーや種々の転写因子の遺伝子群の発現に変化が生じていた。特に、アポトーシスの有力な制御因子である PKC ファミリーは大きな発現変化が認められ、GCN5 が PKC ファミリーの遺伝子発現を制御する key factor であり、pre-B 細胞のアポトーシスを統括的に制御している可能性が強く示唆された。

### (2) HDAC2 について

- HDAC2 欠損株の解析から、HDAC2 は IgM H-chain, L-chain gene の転写および H-chain pre-mRNA の膜結合型から分泌型へのスイッチングの2つのステップで一括して免疫グロブリン量をコントロールすることが示された。
- しかし、HDAC2 は直接、IgM H-chain gene の関与するクロマチン構造を変化させるのではなくて、転写因子である Pax5, EBF1, Ikaros, Aiolos 遺伝子の発現をポジティブに制御し、逆に、E2A 遺伝子の発現をネガティブに制御することを明らかにした。
- これらの転写因子の機能を調べるため、Pax5, EBF1, Ikaros, Aiolos, E2A 遺伝子それぞれの単独ホモ欠損 DT40 変異株を作成した。
- これらの欠損変異株の解析から、Pax5, EBF1, Ikaros, Aiolos は IgM H and L-chain genes をネガティブに制御し、一方、E2A は IgM H and L-chain genes をポジティブに制御することが明らかになった。

- ・これらの結果から、HDAC2は Pax5, EBF1, Ikaros, Aiolos, E2A 遺伝子の発現をネガティブおよびポジティブに制御することによって、間接的に IgM H and L-chain genes の発現を統括的にコントロールしていることを明らかにした。また、HDAC3は DT40 細胞の生存に必須であることを明らかにした。

### (3) HAT1 について

- ・HAT1 欠損変異株の解析から、HAT1 は細胞質と核の双方に局在することを明らかにした。
- ・HAT1 は細胞質の新生ヒストン H4 の Lys-5, Lys-12 と共にクロマチン結合性ヒストン H4 の Lys-5 のアセチル化も触媒することを明らかにした。
- ・HAT1 は DNA 複製とカップルしたクロマチンアセンブリーには必要でないことが明らかになった。
- ・さらに、HAT1 は MMS や CPT による DNA 複製阻害で誘起される DNA 障害の修復に関与することを初めて明らかにした。

### (4) CAF-1 について

- ・細胞増殖に必須な CAF-1 の p48, p60, p150 それぞれ3つのサブユニットの tet-responsive homozygous mutant を作成した。
- ・CAF-1 の各サブユニットの欠損はいずれも S 期進行の遅延、DNA 合成能低下などを伴って死滅する。また、細胞増殖には 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。
- ・本 CAF-1 欠損変異株の解析から、DNA 複製阻害剤 (HU や APH 等) で誘起される S 期チェックポイントキナーゼ Chk1 の活性化は CAF-1 非存在下で顕著に減少することから、DNA 複製チェックポイントを介した一連のシグナル伝達に CAF-1 それ自体か、あるいは CAF-1 による新生 DNA 鎖上での rapid ヌクレオソーム形成が重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

### (5) ASF1 について

- ・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。

### (6) HIRA について

- ・HIRA 欠損 DT40 株の解析から、HIRA の N-末端半分と C-末端半分は、細胞周期関連遺伝子群の転写制御に関して、それぞれ促進と抑制という逆の役割を担い、細胞周期・増殖をコントロールしていることを初めて明らかにした。
- ・HIRA はその N-末端領域の WD リピートを介して、p18 遺伝子のプロモーター領域と相互作用して、その転写を制御していることを明らかにした。