

【目的】 クロマチンの構造変化に伴うクロマチンリモデリング・ヒストン修飾に関与する因子は、細胞がん化や細胞老化に関与していることが知られている。近年、我々は転写近傍で DNA 二重鎖切断が起きると、転写と DNA 修復が共役して働き、ゲノム安定性維持に寄与することを見出した。本研究では新たに、転写の伸長期に加えて開始期を観察するための実験系を構築し、転写の開始と伸長期において DSB の誘導した際の転写とヒストン修飾の変化を解析した。またがん細胞におけるクロマチンリモデリング因子の発現解析を行った。

【方法】 近年、我々は U2OS 細胞のゲノムに転写を活性化し、ライブあるいは免疫染色により観察できる実験系を構築した (図 A)。この実験系を用いて、GFP タグをつけた転写因子クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾因子をトランスフェクションすることにより、これら因子の転写部位への結合がライブで観察できる (図 B)。また、ヒストン修飾を観察する際には、タモキシフェン処理より経時的に固定し、免疫染色を行った。転写活性化と同時に DSB を誘導する際には、上記 1 のプラスミドのトランスフェクションの際に I-SceI を発現するプラスミドを同時にトランスフェクションする。DSB の導入効率に関しては、DSB のマーカーである γ H2AX の免疫染色により確認する。

【結果】 今回の結果より、DSB の誘導により転写の伸長に関わる因子の一部が転写活性化部位から離脱することにより、伸長の時期が抑制されることが明らかになった。また、転写伸長期のマーカーである RNA polymerase II の S2 のリン酸化も減少した。このことにより、DSB が起きた際には、転写の開始よりも RNA polymerase II が RNA を合成している時期である転写伸長期の RNA polymerase II のリン酸化を制御することにより、RNA polymerase II のテンプレート DNA 上の移動が抑制されるのではないかと考えられた。また、この RNA polymerase II のリン酸化の変化に伴って、この際に特に H3K4 のジメチルとトリメチルが減少すること、それとは反対に H2AK119 のユビキチン化が誘導されることが明らかになった。このことにより、DSB の誘導により Trithorax 群に属する MLL の活性が弱まり、一方で Polycomb 群に属する PRC1 の活性が上昇することが明らかになった。このため、RNA polymerase II のテンプレート DNA 上の移動とクロマチン構造の変化が機能的に関連することにより、転写の伸長期が抑制される可能性が示唆された。今後はさらに、Trithorax 群と Polycomb 群の酵素と、これらのヒストン修飾に影響を与える因子のノックダウンした際の影響を観察することにより、どのようなクロマチンの構造変化が転写の伸長期を抑制しているのかを明らかにしたい。

転写・クロマチン構造変化と DSB 修復を同時に検出する実験系の構築

