

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：31305

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2010～2014

課題番号：22131002

研究課題名(和文) コアヒストンから迫る新規クロマチン構造変換機構の同定

研究課題名(英文) Identification of novel chromatin remodeling mechanisms through analyses of core histones

研究代表者

関 政幸 (SEKI, Masayuki)

東北薬科大学・薬学部・教授

研究者番号：70202140

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 95,400,000円

研究成果の概要(和文)：真核細胞ゲノムはクロマチンとして制御されるため、クロマチンの主要構成因子ヒストンの核内反応における役割解明が重要である。本研究では、ヒストンの新規機能の発見とその機構に迫り、1) 転写伸長と共役しヒストンH3-K36をメチル化する際のヒストンの役割、2) ヒストンが Sgo1の保護を介し染色体分配を保証する機構、3) ヒストンH2B-D71残基がヒストンH2Aよりそのバリエーション H2A.Zの機能に寄与すること、4) ヒストンシャペロンFACTが複製フォーク前方からヒストンを解除すること、などを報告した。いずれもオリジナルかつ科学的に重要な発見で、さらなる研究の発展が期待できるものとなった。

研究成果の概要(英文)：Eukaryotic genome is regulated as chromatin structure whose components are mainly DNA and histones. To understand molecular mechanisms behind a variety of DNA-mediated reactions, it is important to investigate missing roles of histones. In this study, we found novel roles of histones in a variety of DNA-mediated reactions including transcription, DNA replication, DNA repair, and chromosome segregation, as follows. 1) A novel role of histone surface in transcription elongation coupled H3-K36 methylation is found, 2) Protection of Sgo1 via histone surfaces is critical for faithful chromosome segregation, 3) Histone H2B is a common subunit for histone H2A-H2B dimer and histone variant H2A.Z-H2B dimer. Although D71 residue of H2B physically interacts with H2A and H2A.Z in corresponding dimers, H2B-D71A mutation mainly affect the function of H2A.Z-H2B rather than H2A-H2B, 4) Histone chaperone FACT may destabilize histones in ahead of replication fork and support fork progression.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：クロマチン ヒストン DNA複製 DNA修復 転写 染色体分配 ヒストンバリエーション

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞のゲノムはクロマチンとして存在し、その基本単位は DNA とヒストン八量体からなるヌクレオソーム構造である。クロマチン制御の研究のほとんどは、ヒストンにトランスに働きかけるタンパク質群の解析に偏っていた。一方、クロマチンの主要構成因子であるヒストンは、あまりにも普遍的な存在すぎて、ヒストン自身を詳細に機能解析するという発想自体がクロマチンの研究分野に存在していなかった。

研究代表者である関は、研究開始当初にヒストンの全残基にひとつずつアラニン置換を施した網羅的なヒストン点変異株のライブラリーの構築し、さらにそれらを用い「ヒストンが調べた限り全ての DNA 介在反応を制御しうることを示していた。このことは、ヒストン自身の解析が個別の DNA 介在反応のクロマチン・レベルでの解析に繋がるところを見事に立証していた。そのユニークかつオリジナルな実験系を出発点とすれば、ヒストンの関わる新規なクロマチン制御機構の発見は必然と思われた。

## 2. 研究の目的

当該新学術の領域では、DNA 修復タンパク質・ヒストン化学修飾酵素・クロマチンリモデラーの解析を中心とした計画研究や公募研究が主流であり、ヒストンそのものを対象とした研究は計画と公募を合わせても全体の 1 割に満たない。そのような中でも、ヒストン点突然変異ライブラリーを用いた研究は代表者である関だけが行っており、その研究の進展は当該領域研究に新しい視点をもたらすことができると期待された。

そこで具体的には、先の戦略を用い、転写・染色体分配・DNA 修復におけるヒストンの新規機能の発見とその分子機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

転写に関しては、RNA ポリメラーゼによる転写伸長の際にヒストン H3 の 36 番目の Lys 残基 (K) がトリメチル化されることが知られている。この H3-K36 のメチル化を制御しうるヌクレオソームの表面を同定するため、ヒストン点突然変異体ライブラリーをスクリーニングし、H3-K36 のメチル化が低下する変異体群の同定を目指し、得られた点変異株の性状解析を行うこととした。

染色体分配に関しては、微小管阻害剤であるベノミルに感受性を有する変異体群 24 株を得られていたので、それらの株の性状解析と、それらの変異体で起こる異常の特定を目指した。

DNA 修復に関しては、*FEN1* 欠損 (岡崎フラグメントのプロセッシングに関わる酵素の欠損) と DNA 組換え酵素との同時欠損で合成致死性を示すことを利用したスクリーニングを考案した。すなわち、*FEN1* 欠損とヒストン点突然変異ライブラリーとの二重変異株を作製し、その致死性をスクリーニングすることで DNA 組換え酵素と深い関連のあるヒストン残基を同定できる。そのスクリーニングを実行し、その結果として得られた「相同組換えに関わる可能性の高いヌクレオソーム表面」の機能を解析することにした。

最後に、DNA 複製に関わるクロマチン研究として、4 半世紀前のヒストンシャペロン CAF1 の発見以来 停滞していた「DNA 複製前後でのクロマチン動態」の解析にチャレンジすることにした。方法はヒストン点変異ライブラリー以外の実験系を用い、具体的には「アフリカツメガエル卵抽出液を用いた DNA 複製時のクロマチン動態の解析」および「ニワトリ DT40 細胞を用いたヒストンシャペロン条件致死株の樹立とその解析」を通じ、DNA 複製前後で起こるヌクレオソームの解体とその再形成機構の解明を目指した。

## 4. 研究成果

### 【転写伸長】

DNA とヒストン八量体が巻き付きヌクレオソームを形成する。その際に、巻き付きはじめる部位をヌクレオソーム・エントリー部位と呼ぶ。RNA ポリメラーゼによる転写伸長に共役した H3-K36 のメチル化は、ヌクレオソーム・エントリー部位のヒストン点変異株で低下した。それらの変異体では転写の活発なゲノム領域における「RNA ポリメラーゼのクロマチン結合量」および「H3-K36 のメチル化酵素 Set2 のクロマチン結合量」がともに低下した。Set2 が RNA ポリメラーゼの C 末に結合することを考慮すると、RNA ポリメラーゼがヌクレオソーム・エントリー部位に遭遇するという物理的な接触がクロマチン・レベルでの「転写伸長」のシグナルとして Set2 によるヒストンのメチル化反応を促進し、「転写伸長と H3-K36 メチル化の共役をクロマチン・レベルで保証する」という分子モデルを提出した(文献 5)。

### 【染色体分配 I】

ベノミルに感受性を示すヒストン点変異株は合計 24 個得られ、該当残基をヌクレオソーム上にマップすると、24 個中の 23 残基は TBS-I、-II、-III と名付けた 3 領域のいずれかに属した。このうち TBS-I はヌクレオソーム・エントリー部位にあり、TBS-II は全体的に塩基性を示すヌクレオソーム表面の中で酸性残基がクラスターを形成する領域(酸性領域)に存在していた。TBS-III はヌクレオソームの内部にあり、ヒストン

H2A, H2B, H4 が相互作用している領域であった。

この 3 つの領域のうち TBS-I と TBS-II は Sgo1 (正確な染色体分配に必要であることが判明しているタンパク質) あるいはその関連因子との相互作用表面であることを実証した。TBS-I, -II の点変異により Sgo1 の細胞内での量が激減することから、Sgo1 はこの 2 つの領域を介してヌクレオソームと相互作用し、そのことが Sgo1 の分解速度を低下させていると考えれば、すべてのデータを合理的に説明できる。

Sgo の語源は Shugoshin (守護神: コヘシンを分解から守る) であり、この視点からすれば「ヒストンは Sgo1 の守護神」ということになる。いずれにしても、ヌクレオソーム表面がタンパク質の安定性に寄与することなど、まるで想像もできなかった新規機能の特定に成功したと言える (文献 6)。

### 【染色体分配 II】

TBS-III の点変異は Sgo1 の安定性とは関連がなく、これらの点変異で大きな影響を受ける標的が Sgo1 と異なることが示唆された。TBS-III が「H2A-H2B 二量体と H4」、「H2A.Z-H2B 二量体と H4」の相互作用領域であることから、セントロメア領域での H2A, H2A.Z, H2B, H4 のクロマチン結合量を調べてみた。その結果、H2A のヒストンバリエーション H2A.Z が特異的にセントロメア領域から消失していることを見出した。

ここで、H2A-H2B, H2A.Z-H2B の 2 つの異なる二量体において、TBS-III 領域の H2B-D71A 点変異が、「何故、H2A.Z-H2B 二量体だけクロマチン結合量が低下したのか?」という本質的な疑問をなげかけた。この疑問に答えるべく、H2A-H2B 連結ヒストン、H2A.Z-H2B 連結ヒストンを構築し、その後それぞれの連結ヒストンの H2B 部分に D71A 変異を導入し、それら変異連結ヒストンのクロマチン結合量を測定した。その結果、H2A.Z-H2B (D71A) 連結ヒストン特異的にクロマチン結合量が低下した。このことは H2B-D71 残基の機能は H2A-H2B 二量体よりも H2A.Z-H2B 二量体のほうにより重要であることを明示している (文献 2)。

なお、今回示した、「タンパク質の連結と共通サブユニット (H2B に該当) への変異導入」は、組換え DNA 技術の発明 (1970 年代) 以来、いつでも実行可能であったにもかかわらず、45 年間なされていなかった。それは、共通サブユニットの共通残基の機能を区別しようとする発想が生命科学の全分野でなかったことに起因する。このような背景において、本研究で「共通サブユニットの遺伝学的解析法」を原理的にはじめて提示できたことを申し添えておく。

### 【DNA 修復】

FEN1 欠損とヒストン点変異との二重変異

株において、それぞれの単独株に比べて増殖が著しく悪化するあるいは合成致死を示すものをヒストン点変異株ライブラリーの中からスクリーニングした。その結果、HRD-I, II, -III と名付けたヌクレオソーム領域に存在する残基群が DNA 相同組換え修復に欠損があると推定された。そのうち、HRD-II は“酸性領域”に該当した。HRD-II 中の H2A-L66A 変異体における相同組換え反応を調べたところ、DNA 二重鎖切断 (DSB) 周辺のゲノム領域で組換え反応の主役である Rad51 の結合量が低下した。さらに DSB 後の DNA 末端の削り込み反応の遅延が観察されたため、「H2A-L66 残基は、DSB が生じた DNA 末端からの削り込み反応を円滑に進めるのに必要」であることが示唆できる (学会発表 3)。さらに、H2A-L66 の標的となるタンパク質を同定することは、クロマチン・レベルでの相同組換え反応の研究分野に新たな視点を与えると期待される。

### 【DNA 複製】

アフリカツメガエル卵抽出液に“膜を取り除いたアフリカツメガエル精子”を導入すると試験管内でクロマチン形成、核形成、DNA 複製が起こることが知られている。この系を用い、ヒストンシャペロン ASF1/CIA が複製フォーク前方のヌクレオソームを解体する際に、H3-H4 四量体を H3-H4 二量体まで解体すると、複製フォークの進行速度が大きく低下することを示唆できた (文献 7)。

一方、ヒストンシャペロン FACT は、DNA 複製開始複合体中に取り込まれる前と後で、クロマチン結合状態が大きく変化することを見出した。このことは、「DNA 複製フォークが開裂する直前までに MCM 複合体と FACT の間に強い相互作用が生じること」を示唆する (文献 10)。

FACT の DNA 複製フォークにおける役割は、ニワトリ DT40 FACT 条件致死株の解析より得られた。FACT が枯渇した細胞で、複製フォークの進行速度が大きく低下する一方、フォーク通過後に起こるヌクレオソームの再形成は FACT 枯渇で影響を受けなかった。以上を総合し、「FACT は MCM 複合体による二本鎖 DNA の開裂と共役してフォーク前方のヌクレオソームを解体し、フォークの進行を促進する」というモデルを提出した (文献 8)。

フォーク通過後にヒストンシャペロン CAF1 により、娘鎖にヌクレオソームが再形成されることが 1980 年代に示された。それ以降、フォークの前後でのヌクレオソーム動態に関わる研究は停滞していたことを考慮すると、本研究の一連の成果は 4 半世紀ぶりの当該分野の研究の進展にあたる。

以上、「ゲノム普遍的制御」を謳う本研究領域において、研究代表者・関は、様々な DNA 介在反応 (転写・DNA 複製・DNA 修

復・染色体分配)をヒストンの視点から解析し、それぞれの反応においてユニークな研究成果をあげることに成功したと言える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 21 件)

全て査読あり、研究代表者に下線、\*コレスポンディングオーサー、全 21 件中で関連がある主要なもの 11 件抜粋。

- (1) Hosono, Y., Abe, T., Higuchi, M., Kajii, K., Sakuraba, S., Tada, S., Enomoto, T., and \*Seki, M. (2014) Tipin Functions in the Protection against Topoisomerase I Inhibitor. *J. Biol. Chem.* 289, 11374-11384.
- (2) Nakabayashi, Y., Kawashima, S., Enomoto, T., \*Seki, M., and \*Horikoshi, M. (2014) Roles of common subunits within distinct multisubunit complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 699-704.
- (3) Yoshimura, A., Kobayashi, Y., Tada, S., Seki, M., \*Enomoto, T. (2014) WRNIP1 functions upstream of DNA Polymerase  $\eta$  in the UV-induced DNA damage response. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 452, 48-52.
- (4) Hosono, Y., Abe, T., Ishiai, M., Islam, M.N., Arakawa, H., Wang, W., Takeda, S., Ishii, Y., Takata, M., \*Seki, M., and \*Enomoto, T. (2014) Tumor suppressor RecQL5 controls recombination induced by DNA crosslinking agents. *Biochim. Biophys. Acta.* 1843, 1002-1012.
- (5) Endo, H., Nakabayashi, Y., Kawashima, S., Enomoto, T., \*Seki, M., and \*Horikoshi, M. (2012) Nucleosome surface containing nucleosomal DNA entry/exit site regulates H3-K36me3 via association with RNA polymerase II and Set2. *Genes Cells* 17, 65-81.
- (6) Kawashima, S., Nakabayashi, Y., Matsubara, K., Sano, N., Enomoto, T., \*Tanaka, K., \*Seki, M., and \*Horikoshi, M. (2011) Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation. *EMBO J.* 30, 3353-3367.
- (7) Ishikawa, K., Ohsumi, T., Tada, S., Natsume, R., Kundu, L-R., Nozaki, N., \*Senda, T., Enomoto, T., \*Horikoshi, M., and \*Seki, M., (2011) The roles of histone chaperone CIA/Asf1 in nascent DNA elongation during nucleosome replication. *Genes Cells* 16, 1050-1062.

- (8) Abe, T., Sugimura, K., Hosono, Y., Takami, Y., Akita, M., Yoshimura, A., Tada, S., Nakayama, T., Murofushi, H., Okumura, K., Takeda, S., \*Horikoshi, M., \*Seki, M., and \*Enomoto, T. (2011) The histone chaperone FACT maintains normal replication fork rates. *J. Biol. Chem.* 286, 30504-30512.
- (9) Abe, T., Yoshimura, A., Hosono, Y., Tada, S., Seki, M., and \*Enomoto, T. (2011) The N-terminal region of RECQL4 lacking the helicase domain is both essential and sufficient for the viability of vertebrate cells. *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 473-479.
- (10) Kundu, L. R., Seki, M., Watanabe, N., Murofushi, H., Furukohri, A., Waga, S., Score, A. J., Blow, J. J., Horikoshi, M., Enomoto, T., and \*Tada, S. (2011) Biphasic chromatin binding of histone chaperone FACT during eukaryotic chromatin DNA replication. *Biochim. Biophys. Acta.* 1813, 1129-1136.
- (11) Endo, H., Kawashima, S., Sato, L., Lai, M.S., Enomoto, T., \*Seki, M., and \*Horikoshi, M. (2010) Chromatin dynamics mediated by histone modifiers and histone chaperones in post-replicative recombination. *Genes Cells* 15, 945-958.

〔学会発表〕(計 12 件)

招待講演及びシンポジウムの講演から抜粋

- (1) 関 政幸 普遍的なヒストンが多様な DNA 介在反応を支える 第 38 回日本分子生物学会年会 / 第 88 回日本生化学会大会 合同大会 (2015 年 12 月 1~4 日、神戸ポートピアホテル、兵庫県・神戸市)
- (2) 関 政幸 核内反応におけるヌクレオソームの普遍的制御 新学術領域「ゲノム普遍的制御」公開シンポジウム (2015 年 8 月 28~29 日、京都大学、京都府・京都市)
- (3) 関 政幸 相同組換えに関わるヒストン残基 日本薬学会 135 年会 (2015 年 3 月 25~28 日、神戸学院大学、兵庫県・神戸市)
- (4) Yoshifumi Hosono, Takuya Abe, Kosa Kajii, Shusuke Tada, Takeme Enomoto, Masayuki Seki Tipin functions in the protection against topoisomerase inhibitors 5<sup>th</sup> US-Japan DNA Repair Meeting, (2014 年 10 月 28~31 日、グランドエクシブ鳴門、徳島県・鳴門市)
- (5) 関政幸 ヒストン H2A あるいはそのバ

- リアント H2A.Z の機能に必要なヒストン H2B 残基 第 87 回日本生化学会大会 (2014 年 10 月 15~18 日、京都国際会館、京都府・京都市)
- (6) Masayuki Seki Roles of common subunits within distinct multi-subunit complexes International Conference, Kyoto, 2014; Replication, repair and transcription; coupling mechanisms and chromatin dynamics for genome integrity (2014 年 2 月 4~5 日、京都大学、京都府・京都市)
- (7) 関 政幸 DNA 架橋損傷の修復における RecQL5 の役割 第 56 回日本放射線影響学会 (2013 年 10 月 18~20 日、ホテルクラウンパレス青森、青森県・青森市)
- (8) 関 政幸 コアヒストンから眺めたゲノム普遍的制御 新学術領域研究 がん支援活動 公開シンポジウム (2013 年 1 月 29~30 日、一橋記念講堂、東京都・千代田区)
- (9) 関 政幸 連結ヒストンを用いたヒストン H2B 変異解析の新戦略 第 85 回日本生化学会大会 (2012 年 12 月 14~16 日、福岡国際会議場、福岡県・福岡市)
- (10) Masayuki Seki, Yoshifumi Hosono, Takemi Enomoto Function of RecQL5 helicase in interstrand crosslink repair 4th Japan-US DNA Repair Meeting (2012 年 4 月 11~14 日、The National Conference Center, アメリカ合衆国・バージニア州・リーズバーグ)
- (11) 関 政幸 ヒストンから迫る DNA 介在反応制御機構 BMB2010 (第 33 回分子生物学会年会; 第 83 回生化学会大会) (2010 年 12 月 7~10 日、神戸ポートピアホテル、兵庫県・神戸市)
- (12) Masayuki Seki Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation Mini Symposium on Cell Cycle (2010 年 11 月 9 日、東北大学加齢医学研究所、宮城県・仙台市)

〔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：  
 出願年月日：  
 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

関 政幸 (SEKI, Masayuki)  
 東北薬科大学・薬学部・教授  
 研究者番号：70202140

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：