

平成 21 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007 -2008

課題番号：19370049

研究課題名（和文）ヌクレオソーム構造変換機構を介した染色体機能領域形成機構

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of establishment of chromosomal functioning regions through nucleosomal structural changes

研究代表者

堀越 正美 (HORIKOSHI MASAMI)

東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授

研究者番号：70242089

## 研究成果の概要：

真核細胞の遺伝子発現制御の特徴であるヌクレオソームを鋳型とした様々な制御機構に関して、ヒストンの化学修飾制御からヌクレオソーム構造変換制御に至る過程の仕組みを三次構造レベルで明らかにした上で、化学修飾に関してはスケールフリーネットワーク構造であることを示し、ヌクレオソーム構造変換制御に関してはヒストン点変異体解析を通して様々な素反応を機能的に解析した。

## 交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	11,200,000	3,360,000	14,560,000
2008 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：(1)遺伝子の情報発現と複製、(2)クロマチン、(3)染色体、(4)遺伝子サイレンシング、(5)ヒストンシャペロン、(6)ヒストン化学修飾

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞生物の遺伝子発現は主に 3 つの段階で制御されていると考えられる。

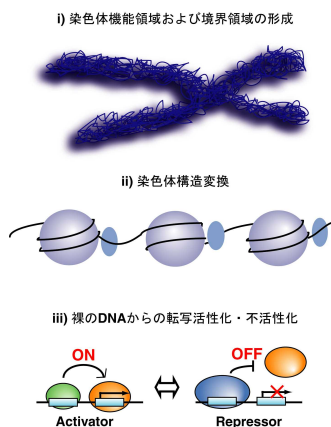
- i) 染色体機能領域および境界領域の形成（サイレンシング・抗サイレンシング反応）
- ii) ヌクレオソーム構造変換（ヌクレオソーム構造変換反応）

## iii) 裸の DNA からの転写活性化・不活性化（プロモーター特異的転写反応）

iii) の裸の DNA からの転写活性化・不活性化制御は、負の制御の代表例である 1961 年のオペロン説、正の制御の代表例である 1988 年のリクルート説に代表される研究により基本的な概念が DNA-蛋白質、蛋白質-蛋白質相互作用で説明された。

ii) のヌクレオソーム構造からの遺伝子発現制御においては、DNA をいかにヌクレオソーム状態から解くかということが大きな問題であるが、この研究は 1990 年代後半から本格的に始まり、特にヒストンアセチル化酵素、ヒストンメチル化酵素等のヒストン化学修飾酵素によるヒストン N 末端テイル領域の化学修飾及びそのパターンによって、相互作用するクロマチン因子群の結合特異性が決定され、転写活性化・不活性化に対応した機能状態が決定されるといった「ヒストンコード」が提唱されている。またヌクレオソームリモデリング酵素(ATPase)、ヒストンシャペロンなどの単離・解析をめぐる世界中でのしがが削られている。しかしながら、ヌクレオソームの構造変換がどのようになされるのかと言った主要課題に至っては解明されていない。その要因はヌクレオソームに働きかける因子ヒストンシャペロンの作用機構が明らかになっていないことによる。

図1. 3段階の真核細胞生物遺伝子発現制御



真核生物の遺伝子発現制御の理解には、ii)、iii) のレベルでの制御に加えて、高次の i) の染色体構造レベルでの遺伝子発現制御を解明することが不可欠である。このレベルでの制御に関しては、1930 年頃より

シヨウジョウバエの position effect variegation および出芽酵母の接合型遺伝子座における性変換機構等をモデル系とした遺伝学的解析により古くから追求されてきたものの、分子レベルでの解析はようやく進み始めてきたといつてよい。i) の解明が進まない要因として、真核細胞生物の染色体では機能的に異なる状態が混在しているということが挙げられる。真核細胞生物は多細胞生物として進化し、それに伴って遺伝子の数も飛躍的に増加している。細胞増殖に必要な遺伝子は数千個であり、発生・分化などに関与すると考えられている遺伝子は 1 万から 2 万個ほどである。個々の細胞で見ると後者のほとんどは、一生眠ったままの状態にあるといえる。こういった不必要な大量の遺伝子群は、ヒストンと DNA との複合体であるヌクレオソーム構造よりも更に不活性化状態が増強されるヘテロクロマチン状態が広く

形成されることで、遺伝子発現が一括して極度に抑制されている(サイレンシング状態)。そしてサイレンシング状態にあった領域でも細胞の分化段階依存にもしくは外部からのストレス依存に、遺伝子が活性化され、それが維持されるという抗サイレンシング反応が起こることで、必要な遺伝子群が深い眠りから起こされる。このように染色体は、様々な機能領域が時間的、空間的にダイナミックに変化する構造体である。以上のことを考え合わせると、複数の遺伝子を含む広い染色体領域を対象とした機能領域形成機構、特にサイレンシングと抗サイレンシングとの関連性を解明することが必要不可欠である。

## 2. 研究の目的

報告者は、染色体からの遺伝子発現制御に関わる研究を、(1)染色体の活性化・不活性化領域などの機能領域およびそれら機能領域間の境界領域の形成がどのように行われるのかという問題、(2)染色体の基本単位であるヌクレオソーム構造の構造変換反応がどのように行われるのかという問題と捉え、サイレンシング・抗サイレンシング反応及びヌクレオソーム構造変換反応に関する酵素と因子の単離・解析を進めてきた。世界に先駆け単離・機能解析を行ったヒストン化学修飾酵素 MYST HAT [*J. Biol. Chem.*, 272, 30595-30598 (1997)] を用いた解析から、出芽酵母の染色体末端のテロメア領域における染色体機能領域及び境界領域の形成機構に関する分子機構を発見することに成功し、“Negotiable border model” という新規の概念を世界に先駆けて提唱した [*Nature Genet.*, 32, 370-377 (2002); *Genes Cells*, 9, 499-508 (2004)] : (「従来の研究経過・研究成果」参照)。本研究計画においては、(1)の問題に関して、このモデルの一般化によって様々な染色体領域形成に対する応用を可能とすることを目標とするが、その検証において染色体内部の領域の代表として選ぶ mating loci についても共通性を確認しており、普遍的な分子機構であると予想されることから国際的にもこの分野の研究を牽引する重要な位置にあるといえる。(2)の問題に関しては、独自に得た因子に関するヌクレオソーム構造変換反応中間体の解析を進めることで、未だほとんどわかっていないヒストンシャペロンによるヌクレオソーム構造変換反応機構を明らかにすることを目標とするが、この試みも世界に先駆けたもので、先導的な研究と言える。

## 3. 研究の方法

(1) 染色体機能領域の形成機構の普遍性を検証するため、準備状況に示した出芽酵母

mating type loci (HMR locus) での RNA ポリメラーゼ II 及び III 転写系遺伝子による染色体機能領域形成機構の解明を目的とし、報告者らによる RNA ポリメラーゼ II 転写系遺伝子のテロメア領域での知見に加え、染色体機能領域および境界領域の形成機構に関する共通性と多様性を解明する。また、(2) ヒストンシャペロンの作用機構を明らかにすることを通して染色体機能領域の形成に伴うヌクレオソーム構造変換機構を解明することを目的とする。

#### (1) 染色体機能領域の形成機構の解析

##### 1. RNA ポリメラーゼ III 系遺伝子特有の制御の解析

報告者は、サイレンシング領域である HMR locus におけるサイレンシング・抗サイレンシング機構の解析過程において、HMR locus に隣接して存在する tRNA 遺伝子の周辺領域では、ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2p の欠損株においても、ヒストン H4 K16 のアセチル化レベルが低く抑えられたままであるといった知見を得た [*Nature Genet.*, 32, 370-377 (2002)]。このことから RNA ポリメラーゼ III 系によって発現誘導される tRNA 遺伝子領域にて Sir2p 以外のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) がリクルートされ働いている可能性が示唆された。以下の解析により、この領域への Sir2p 以外のヒストン脱アセチル化酵素のリクルート機構とそれに続くヒストン H4 K16 の脱アセチル化によるサイレンシング制御機構を明らかにする。

1. Sir2p 以外のヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 9 種類に関して欠損株を作製し、tRNA 遺伝子領域およびその周辺のヒストン化学修飾、並びにヘテロクロマチン因子の局在変化をクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) により検出する。

2. ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 破壊が遺伝子発現に与える影響を明らかにするため、野生株及びヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) 破壊株における HMR locus 周辺領域の遺伝子発現を RT-PCR により検定する。

##### 2. 他のサイレンシング領域における Negotiable border model の役割の解析

報告者が明らかにしてきた染色体機能領域形成機構に関する知見を最大限活用するため、引き続き出芽酵母の他の染色体機能領域に着目し、モデルの基本的な枠組みの共通性・多様性に関する理論の確立を目指す。例えば、出芽酵母におけるサイレンシング領域の中でも RNA ポリメラーゼ I 系によって発現が制御されているリボソーム RNA をコードする領域 (rDNA 領域) は、他の染色体領域とは異なる機能領域を形成している。

1. テロメア領域で行った解析と同様のヒ

ストン化学修飾酵素の欠損株に対して ChIP 法によりアセチル化ヒストン H4 K16 の局在・ヘテロクロマチン因子 Sir3p の局在・転写活性の解析を行う。

2. それぞれの系において、他のヒストン化学修飾とそれらに対応する化学修飾酵素及び他のクロマチン因子が染色体機能領域形成に関与するか否かの解析を行う。

報告者が進めている HMR locus での tRNA 遺伝子領域において上の解析を行うことにより RNA ポリメラーゼ III 系遺伝子に関する染色体領域制御機構が、更にはリボソーム DNA 領域 (rDNA locus) において研究を進めることで RNA ポリメラーゼ I 系遺伝子に関する染色体領域制御機構が明らかにされると考えられる。

#### (2) 染色体機能領域の形成に伴うヌクレオソーム構造変換機構の解析

##### 1. ヌクレオソーム構造変換反応中間体の構造解析

上述のヌクレオソーム構造変換反応に用いた様々な因子との相互作用複合体の構造解析を進める。CIA H3 H4 複合体、CIA-プロモドメイン複合体の解析で得られた結果は、更なる機能解析を行ううえで、有用な知見を与えることは勿論、ヌクレオソーム構造変換反応機構を考察する上で有用な知見となる。また、ヒストン点変異体ライブラリーを用いて、ヒストンと他の因子との機能的相互作用を生化学的、遺伝学的解析を通して行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 染色体機能領域及び境界領域の形成機構に関する共通性と多様性の解明

出芽酵母の接合型遺伝子座領域である HMR locus に位置する tRNA 遺伝子 (RNA ポリメラーゼ III 転写系遺伝子) に焦点を当て、同遺伝子周辺領域の染色体機能領域及び境界領域の形成機構の解析を行った。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) である Sir2p の脱アセチル化活性が関与しないことを明らかにしていたが、同領域のヒストン H4 K16 のアセチル化レベルが低く抑えられていることから、他の HDAC の関与が考えられた。そこで、他の HDAC9 種類それぞれに対して Sir2p との二重欠損株を作製し、ヒストン H4 K16 のアセチル化レベルが上昇するかをクロマチン免疫沈降法により解析したが、アセチル化レベルの上昇は見られなかった。

H4 K16 以外の残基の化学修飾の関与の可能性を検討し、様々なヒストン化学修飾残基の関与を示す結果が得られた。今後はこの残基の化学修飾に関わる酵素の同定及び関与のメカニズムを明らかにすること、またこの領域内に存在する tRNA 遺伝子の転写に関わる RNA

ポリメラーゼ III 転写系特有の因子の関与の可能性等を検証することで、同課題の解決を目指す。

## (2) 染色体機能領域の形成に伴うヌクレオソーム構造変換機構の解明

ヒストンシャペロン CIA と転写基本因子 TFIIID 最大サブユニットである CCG1 のプロモドメイン (アセチル化残基認識ドメイン) との複合体立体構造を、X 線結晶構造解析により 3.3 Å の解像能で明らかにした。本結果及び研究代表者が解明した CIA-ヒストン H3 H4 複合体構造により、細胞内外から伝達された情報の集約と考えられるヒストン化学修飾からヌクレオソーム構造変換反応に至るまでの DECODE 過程の反応中間状態を世界に先駆けて示すことができた。また、ヒストン化学修飾・脱修飾による染色体機能領域の規定からヌクレオソーム構造変換による染色体機能領域の形成に至る反応の流れを予測可能にした点でも、当該研究の前進に大きく貢献したといえる。

### 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 17 件)

1. M.Sakamoto, S.Noguchi, S.Kawashima, Y.Okada, T.Enomoto, M.Seki & M.Horikoshi. Global analysis of mutual interaction surfaces of nucleosomes with comprehensive point mutants

*Genes Cells*, in press, 2009. 査読有

2. Y.Hayashi, T.Senda, N.Sano & M.Horikoshi. Theoretical framework for the histone modification network: modifications in the unstructured histone tails form a robust scale-free network.

*Genes Cells*, in press, 2009. 査読有

3. N.Adachi, M.Senda, R.Natsume, T.Senda & M.Horikoshi. Crystal structure of *Methanococcus jannaschii* TATA-box-binding protein.

*Genes Cells*, 13, 1127-1140, 2008. 査読有

4. M.Senda, S.Muto, M.Horikoshi & T.Senda. Effect of leucine-to-methionine substitutions on the diffraction quality of histone chaperone SET/TAF-I $\beta$ /INHAT crystals.

*Acta Crystallogr.F*, 64, 960-965, 2008. 査読有

5. H.Shimojo, N.Sano, Y.Moriwaki, M.Okuda, M.Horikoshi & Y.Nishimura. Novel structural and functional mode of a knot essential for RNA

binding activity of the Esa1 presumed chromodomain.

*J.Mol.Biol.*, 378, 987-1001, 2008. 査読有

6. Y.Munemasa, T.Suzuki, K.Aizawa, S.Miyamoto, Y.Imai, T.Matsumura, M.Horikoshi & R.Nagai. Promoter region-specific histone incorporation by the novel histone chaperone ANP32B and DNA-binding factor.

*Mol.Cell.Biol.*, 28, 1171-1181, 2008. 査読有

7. M.Eitoku, L.Sato, T.Senda & M.Horikoshi. Histone chaperones: 30 years from isolation to elucidation of the mechanisms of nucleosome assembly and disassembly.

*Cell.Mol.Life Sci.*, 65, 414-444, 2008. 査読有

8. Y.Nakamura, T.Umehara, A.Tanaka, M.Horikoshi, B.Padmanabhan & S.Yokoyama. Structural basis for the recognition between the regulatory particles Nas6 and Rpt3 of the yeast 26S proteasome.

*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 359, 503-509, 2007.

9. T.Suzuki, T.Nishi, T.Nagino, K.Sasaki, K.Aizawa, N.Kada, D.Sawaki, Y.Munemasa, T.Matsumura, S.Muto, M.Sata, K.Miyagawa, M.Horikoshi & R.Nagai. Functional interaction between the transcription factor Krüppel-like factor 5 and poly(ADP-ribose) polymerase-1.

*J.Biol.Chem.*, 282, 9895-9901, 2007. 査読有

10. R.Natsume, M.Eitoku, Y.Akai, N.Sano, M.Horikoshi & T.Senda. Structure and function of the histone chaperone CIA/ASF1 complexed with histones H3 and H4.

*Nature*, 446, 338-341, 2007. 査読有

11. S.Muto, M.Senda, Y.Akai, L.Sato, T.Suzuki, R.Nagai, T.Senda & M.Horikoshi. Relationship between the structure of SET/TAF-I $\beta$ /INHAT and its histone chaperone activity.

*Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, 104, 4285-4290, 2007. 査読有

12. Y.Nakamura, K.Nakano, T.Umehara, M.Kimura, Y.Hayashizaki, A.Tanaka, M.Horikoshi, B.Padmanabhan & S.Yokoyama. Structure of the Oncoprotein Gankyrin in Complex with S6 ATPase of the 26S Proteasome.

*Structure*, 15, 179-189, 2007. 査読有

13. Y.Nakamura, T.Umehara, K.Nakano, MK.Jang, M.Shirouzu, S.Morita, H.Uda-Tochio, H.Hamana, T.Terada, N.Adachi, T.Matsumoto, A.Tanaka, M.Horikoshi, K.Ozato,

B.Padmanabhan & S.Yokoyama. Crystal structure of the human Brd2 bromodomain: Insights into dimerization and recognition of acetylated histone H4.  
*J.Biol.Chem.*, 282, 4193-4201, 2007. 査読有

14. M.Okuda, M.Horikoshi & Y.Nishimura. Structural polymorphism of chromodomains in Chd1.  
*J.Mol.Biol.*, 365, 1047-1062, 2007. 査読有

15. Y.Nakamura, T.Umehara, A.Tanaka, M.Horikoshi, B. Padmanabhan & S.Yokoyama. Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of the non-ATPase subunit Nas6 in complex with the ATPase subunit Rpt3 of the 26S proteasome from *Saccharomyces cerevisiae*.  
*Acta Crystallogr.F.*, 63, 190-192, 2007. 査読有

16. K.Matsubara, N.Sano, T.Umehara & M.Horikoshi. Global analysis of functional surfaces of core histones with comprehensive point mutants.  
*Genes Cells*,12, 13-33, 2007. 査読有

17. S.Muto and M.Horikoshi. Gene selectors consisting of DNA-binding proteins, histones, and histone-binding proteins regulate the three major stages of gene expression.  
*Nuclear Dynamics: Molecular biology and visualization of the nucleus*, 145-175, 2007. 査読有

〔学会発表〕(計 13 件)

1. 堀越正美. ヒストンコード仮説の問題点と克服.  
第 9 回日本蛋白質科学会年会, 2009.5.20, 熊本.

2. M.Horikoshi. Theoretical framework for the histone modification network: modifications in the unstructured histone tails form a robust scale-free network.  
2009 Global Biomarker Conference, 2009.3.20, Vancouver, BC, Canada.

3. M.Horikoshi. From histone modification to nucleosome disassembly.  
Keystone Symposia-Chromatin Dynamics and Higher Order Organization, 2009.2.26, Spokane, WC, USA.

4. M.Horikoshi. From isolation of novel chromatin factors to proposal of models leading to novel principles and concepts.

International symposium on Nuclear Architecture and Chromatin Dynamics, 2008.11.28, Hyderabad, India.

5. M.Horikoshi. Analysis of architecture of histone modification network.  
World Microarray Congress 2008, 2008.6.29, Vancouver, BC, Canada.

6. M.Horikoshi. From histone modification to nucleosome disassembly.  
Keystone Symposia Molecular Basis for Chromatin Modifications and Epigenetic Phenomena, 2008.4.8, Denver, CO, USA

7. M.Horikoshi. From histone modification to nucleosome disassembly.  
Keystone Symposia- Regulatory Mechanisms in Eukaryotic Transcription, 2008.02.05, Denver, CO, USA.

8. 堀越正美. ヒストンシャペロン ; 半保存的ヌクレオソーム複製及びエピジェネティック情報伝達-ヒストンシャペロン単離からヌクレオソーム構造変換機構までの 30 年-.  
第 30 回日本分子生物学会年会・第 80 回日本生化学会大会 合同大会, 2007.12.11, 横浜.

9. 堀越正美. DNA の半保存的複製からヌクレオソームの半保存的複製モデルへ.  
From DNA semi-conservative replication to nucleosome semi- conservative replication model.  
国際シンポジウム “Gene expression control and genome evolution” 日本遺伝学会第 79 回大会, 2007.09.19, 岡山.

10. M.Horikoshi. Gene regulation on both transcription and replication at nucleosomal level - Combinatory analyses of comprehensive mutant library and microarray -.  
World Microarray Congress 2007, 2007.6.29, Vancouver, Canada.

11. 堀越正美. Watson-Crick による DNA の半保存的複製からヌクレオソームの半保存的複製モデルへ.  
第 7 回日本蛋白質科学会年会, 2007.5.26, 仙台.

12. M.Horikoshi. From DNA semi-conservative replication to nucleosome semi-conservative replication model.  
The 7th MBSJ Spring Symposium “Biology-old codes and new molecules”, 2007.4.23, Awaji, Hyogo, Japan.

13. M.Horikoshi. Structure and functional basis of the histone chaperone CIA/ASF1-histone H3-H4 complex.  
Keystone Symposia : Mechanisms of Eukaryotic Transcription, 2007.4.12, Denver, CO, USA.

〔図書〕(計1件)

1. 堀越正美. 「スーパーサイエンスハイスクール講義」培風館, 272 ページ, 2009.

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀越 正美 (HORIKOSHI MASAMI)  
東京大学・分子細胞生物学研究所・准教授  
研究者番号：7 0 2 4 2 0 8 9

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし