

機関番号：63801

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570169

研究課題名 (和文) セントロメア構築の基盤をなすヒストンの脱アセチル化

研究課題名 (英文) Histone deacetylation related with centromere functions

研究代表者

山尾 文明 (YAMA O FUMIAKI)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授

研究者番号：10158074

研究成果の概要 (和文)：

分裂酵母 DNA ポリメラーゼ α のアクセサリータンパク質 Mcl1 が欠損すると DNA 複製に異常と同時に、セントロメア、mat 領域における遺伝子サイレンシングが解除される極めて興味深い表現型を示した。特にセントロメア領域ではその中心ドメインとその外部のヘテロクロマチンドメインの両方でサイレンシングを解除しているという、それまでに見いだされていた変異とは異なった新奇な表現型であった。その原因を探る中で、変異株ではセントロメア領域におけるヒストン H3、4 のアセチル化が亢進していることが判明した。複製にカップルしたヒストンの脱アセチル化がセントロメア構造、ヘテロクロマチン形成に必要であるとの作業仮説のもと、その妥当性を検討した。

研究成果の概要 (英文)：

Specialized chromatin exists at centromeres and must be precisely transmitted during DNA replication. The mechanisms involved in the propagation of these structures remain elusive. Fission yeast centromeres are composed of two chromatin domains: the central CENP-A(Cnp1) kinetochore domain and flanking heterochromatin domains. We showed that fission yeast Mcl1, a DNA polymerase alpha (Pol alpha) accessory protein, is critical for maintenance of centromeric chromatin. In a screen for mutants that alleviate both central domain and outer repeat silencing, we isolated several cos mutants, of which cos1 is allelic to mcl1. The mcl1-101 mutation caused reduced CENP-A(Cnp1) in the central domain and an aberrant increase in histone acetylation in both domains. These phenotypes were also observed in a mutant of swi7(+), which encodes a catalytic subunit of Pol alpha. Mcl1 formed S-phase-specific nuclear foci, which colocalized with those of PCNA and Pol alpha. These results suggest that Mcl1 and Pol alpha are required for propagation of centromere chromatin structures during DNA replication.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：分子遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体機能、セントロメア、翻訳後修飾、染色体複製

1. 研究開始当初の背景

真核生物染色体セントロメアの特異構造は、その娘細胞への確実な伝達を保證するのに第一義的な意味を持つ。セントロメア構造はその中央のコアドメインであるキネトコアと、その外部近傍を占めるヘテロクロマチン領域から構成される。キネトコア領域は微小管結合の場として染色体分配・伝達に関するセントロメア機能の中樞を担い、ヘテロクロマチン構造とはまた別の特異なドメイン構造を保持する。ここではヒストン H3 に代わって、そのバリエーションである CENP-A が局在することが重要とされることはよく知られている。ヘテロクロマチン領域は HP1 蛋白などのヘテロクロマチン蛋白が局在し、姉妹染色体の接着(コヒージョン)に必要な機能を提供する。DNA 複製に伴いこれらの特異高次構造が染色体レベルでいかに保持・伝達されるかは、それが S 期の中で起こるドラスティックな現象であるにもかかわらず、ほとんど未解明のまま残っていた。相同組換え機構に関与する変異の選択から得られた遺伝子 Mcl-1 (分裂酵母) の機能解析を行った。この遺伝子産物は DNA ポリメラーゼ α のアクセサリタンパク質で欠損すると DNA 複製に異常を起こす。しかし同時に、それが欠損するとセントロメア、mat 領域、テロメア領域における遺伝子サイレンシングが解除される極めて興味深い表現型を示した。特にセントロメア領域ではその中心ドメインとその外部のヘテロクロマチンドメインの両方でサイレンシングを解除しているという、それまでに見いだされていたサイレンシング異常の変異とは異なった新奇な表現型であった。その原因を探る中で、変異株ではセントロメア領域におけるヒストン H3、4 のアセチル化が亢進していることが判明した。全染色体領域におけるヒストンのアセチル化の様子を調べると、ヘテロクロマチン領域に対応してアセチル化の亢進し、サイレンシングへの対応が明らかとなった。このタンパク質は DNA 複製マシンに含まれるタンパク質であることから、複製にカップルしたヒストンの脱アセチル化がセントロメア構造、ヘテロクロマチン形成に必要であるとの作業仮説のもと、その妥当性を検討してきた。

2. 研究の目的

われわれは分裂酵母の DNA 複製因子である Mcl1 蛋白質が、セントロメアのキネトコア、

ヘテロクロマチンの両方の領域で、その特異構造の維持に必須であることを見いだした。この因子の欠損により、DNA 合成の異常、姉妹染色体コヒージョンの破綻、染色体分配の異常が観察される。特にキネトコア領域への SpCENP-A のローディングが顕著に欠損していることが特徴的である。したがって、この因子の解析を通して上記の DNA 複製と高次クロマチン構造の構築・伝達とを繋ぐメカニズムの解明の一助となる可能性があるため、その解析を目的とした。

3. 研究の方法

分裂酵母 Mcl1 の複製因子としての機能は以下の諸点に整理された。

- 1) DNA ポリメラーゼ α と強い遺伝的、物理的相互作用があり、ラギング鎖合成と岡崎フラグメントのプロセッシングに関与すると考えられる。
- 2) 複製複合体 GINS に含まれる。
- 3) Mcl1 の細胞内局在は S 期を中心に、PCNA と挙動を同じくすることが判明した。

一方、Mcl1 が染色体機能を制御することは、その変異による表現型から以下のようにまとめられる。

- 4) 変異株ではセントロメアにおけるコヒージョンが欠損する。
- 5) 変異株でセントロメアのキネトコア領域 (cnt, imr) における遺伝子サイレンシングが破綻する。
- 6) セントロメアのヘテロクロマチン領域 (otr) 及び、mat 座のヘテロクロマチン領域 (mat3) における遺伝子サイレンシングが破綻。ちなみに、キネトコア領域とヘテロクロマチン領域の両者の遺伝子サイレンシングが同時に破綻する変異は Mcl1 が初めての例であった。
- 7) ヘテロクロマチン領域における遺伝子サイレンシングが解除されるにもかかわらず、ヘテロクロマチン蛋白である swi6 (HP1 ホモログ) の局在は正常、H3K9 のメチル化の程度も変化していなかった。
- 8) 変異株ではキネトコア領域における SpCENP-A の局在が著しく阻害されており、その代わりにヒストン H3 が蓄積している。CENP-A のキネトコアへの局在にはこれまで、Mis6、Ams2 による径路が証明されているが、細胞増殖、サイレンシングで見える限りは Mcl1

の機能はこれらのいずれとも遺伝学的には独立している。

9) Mc11 欠損により染色体分配異常を惹起する。

そこで本研究では、この複製因子の染色体構造への関与の解析を中心に据え、セントロメア構造と機能、ヘテロクロマチン構造とその機能を担うタンパク質群との関連を調べることにした。

4. 研究成果

Mc11 変異によるセントロメア領域における染色体構造への効果を調べる中で、いくつかの脱アセチル化酵素遺伝子の過剰発現で Mc11 変異の表現型が部分的に抑制されることが判明した。そこで染色体タンパク質のアセチル化状態を調べたところ、セントロメア領域のヒストン H4 のアセチル化が亢進されていることが判明した。他の、特にヘテロクロマチン領域での効果も調べる意味で、ChIP on chip でゲノムワイドに解析したところ、セントロメア領域と mat 領域に特異的に H3、H4 のアセチル化が亢進されていることがわかった。ちなみに分裂酵素の脱アセチル化酵素として知られているもののいずれが Mc11 と連携しているかを知るために、Hos2、Clr3、Sir2、Hst2、Hst4 などとの遺伝学的関連を調べたが、特異的な関与を示すものは同定できなかった。

先に示した Mc11 変異の表現型は、キネトコア構造、コヒージョン、ヘテロクロマチン形成で表現される一連の染色体特異構造の構築が DNA 合成の場でこの複製装置の因子を介して統御されている可能性を強く示唆しているが、それぞれを体現する蛋白質は SpCENP-A、コヘーシン、Swi6 (HP1) とヒストン H3K9Me と異なるが、上の結果によりそれらに共通するのはヒストンの脱アセチル化であり、それが上流にあつてそれぞれの蛋白質の局在と機能発現の基盤を形成しているように見える。

実際、ある種の HDAC の過剰発現で Mc11 欠損 (遺伝子サイレンシング) の異常が部分的に抑制されることを観察している。キネトコア等に組み込まれたヒストンは低アセチル化状態にあり、新規合成されたヒストンは高度にアセチル化されていることはよく知られている。そこで、複製時におけるヌクレオソームの再構成ないしは分配、及び新規ヒストンのデポジットがヒストン脱アセチル化反応で制御され、そのヒストン脱アセチル化反応を Mc11 蛋白が DNA 複製とカップルしてリクルートすることでヌクレオソームの解離、再会合ないしは分配、新規ヒストンの取り込みを統御しているという可能性をモデルと

して提出した。

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 2 件)

(1) T. Natsume, Y. Tsutsui, T. Sutani, E. M. Dunleavy, A. L. Pidoux, H. Iwasaki, K. Shirahige, R. C. Allshire, F. Yamao (2008). A DNA Polymerase a Accessory Protein, Mc11, Is Required for Propagation of Centromere Structures in Fission Yeast. Plos One. 3 (5) e2221- (査読あり)

(2) Y. Yamada, Y. Tsutsui, P. Russell, H. Iwasaki and B. Arcangioli. Mus81 is essential for sister chromatid recombination at broken replication forks. The EMBO J. (2008) 27, 1378 - 1387 (査読あり)

[学会発表] (計 7 件)

(1) Yumiko Kurokawa, Yasuhiro Tsutsui, Hiroshi Iwasaki, Fumiaki Yamao Characterization for sumoylation of Schizosaccharomyces pombe Rad22 protein involved in homologous recombination and recombination repair, BMB2010 2010. 12. 8-12 神戸

(2) Characterization for in vitro sumonylation of S. bombe Rad22 protein involved in homologous recombination recombination repair. Yumiko Kurokawa, Yasuhiro Tsutsui, Hiroshi Iwasaki, Fumiaki Yamao, 第 32 回日本分子生物学会年会 横浜市 2009. 12. 10-14

(3) Biochemical analysis of fission yeast F-box DNA helicase involved in regulation of homologous recombination Yasuhiro Tsutsui, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki, Fumiaki Yamao, 第 32 回分子生物学会年会 横浜市 2009. 12. 10-14

(4) Fission yeast Rhp51 is ubiquitinated by F-box DNA helicase in vitro Yasuhiro Tsutsui, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki, Fumiaki Yamao, The International Symposium on "Chromosome cycle and genome dynamics", Nasu, Tochigi, Japan 2009. 10. 20-22

(5) Fission yeast Mc11, a DNA polymerase α accessory protein, interacts with SHREC complex in vivo

Yasuhiro Tsutsui, Toyoaki Natsume, Takashi Sutani, Hiroshi Iwasaki, Katsuhiko Shirahige, Fumiaki Yamao

The International Symposium on "Chromosome cycle and genome dynamics", Nasu, Tochigi, Japan 2009.10.20-22

(6) BIOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF FISSION YEAST FBH1, A DNA HELICASE WITH F-BOX INVOLVED IN HOMOLOGOUS RECOMBINATION

Yasuhiro Tsutsui, Yumiko Kurokawa, Hiroshi Iwasaki, Fumiaki Yamao

The 5th International Fission Yeast Meeting, Tokyo, Japan 2009. 5.10-14

(7) Y. Tsutsui, T. Natsume, F. Yamao,

Characterization of fission yeast Mc11 involved in propagation of centromere structure, BMB2008 2008.12.9-12, 神戸ポートアイランド

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山尾 文明 (YAMA O FUMIAKI)

国立遺伝学研究所・分子遺伝研究系・教授
研究者番号：10158074

(2) 研究分担者

筒井 康博 (TSUTSUI YASUHIRO)

東京工業大学 大学院・生命理工学研究科・助教

研究者番号：00390625

(H20.4→H22.3)