

平成22年4月1日現在

研究種目：若手研究 (A)

研究期間：2008～2009

課題番号：20687001

研究課題名 (和文) ヘテロクロマチン領域伸長停止メカニズムの解明

研究課題名 (英文) Analysis of heterochromatin boundary function

研究代表者

沖 昌也 (OKI MASAYA)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：60420626

研究成果の概要 (和文) : 我々はヘテロクロマチン領域の伸長が停止するメカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的に解析を行った。新規スクリーニングにより分離した遺伝子の解析から、ヘテロクロマチンとプロテアソームの関与を示唆する実験結果を得た。また、新規ヒストン結合タンパク質を同定し、生体内での機能領域も明らかにした。今後、これらの遺伝子を更に解析することにより、従来報告されていない新たな視点からヘテロクロマチン領域の機能解明が期待できる。

研究成果の概要 (英文) : We analyzed the boundary which the extension of the heterochromatin domain stopped. Our result suggested that heterochromatin and proteasome had genetic interaction. In addition, we identified a novel histone binding protein and clarified the function domain in the living cell. I expect the function elucidation of the heterochromatin domain from the new viewpoint that is not reported conventionally in future by analyzing these genes more.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	15,100,000	4,530,000	19,630,000
2009年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
年度			
総計	20,400,000	6,120,000	26,520,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：ゲノム構築・再編・維持

1. 研究開始当初の背景

ヘテロクロマチン領域は無限に広がっているわけではなく、ある領域を境に伸長は停止している。我々は他の研究者とは視点を変え、ヘテロクロマチン領域はどのようなタン

パク質が関与し、調節・制御され伸長が停止しているのか、この境界形成機構を分子レベルで明らかにすることが将来的にはヘテロクロマチン領域形成機構を明らかにする上で重要であると考え研究をスタートさせた。

我々は既に出芽酵母の遺伝子数の少なさを利用し、全遺伝子の中から境界形成に関わるタンパク質を分離する新規スクリーニング法を開発し、55個の境界形成因子を分離しており、本プロジェクトではこのスクリーニングで得られた遺伝子のうち、特に種を越えて保存されているが機能の知られていない遺伝子に注目して解析を進めて行った。また、我々は既に酵母生体内における境界領域を決定しており、同様の方法を用いることにより本プロジェクトで解析を行う未知遺伝子が実際の生体内における境界領域にどのように関わっているかを明らかに出来ると考えた。

染色体上における境界形成機構に関しては、発生・分化の分野で数多く研究されており、発生段階により特定の領域を境に転写のONとOFFが入れ替わり、ヒストンの修飾状態が変わるといった報告がされていた。しかし、我々のスクリーニングでもヒストン修飾酵素、クロマチンリモデリング因子等が多数分離されたことから分かるように、現在解析されているのは結果として起こっている現象であり、最初にどのようなタンパク質が関与し、調節・制御されているかについてはほとんど明らかにされていなかった。我々は全遺伝子1つ1つを解析したため、高次クロマチン構造形成機構との関与を現段階では予測出来ない遺伝子を多数分離した。これらの遺伝子を解析することにより、結果ではないその前段階のヘテロクロマチン領域調節機構が明らかに出来ると考え研究をスタートさせた。

2. 研究の目的

本研究ではクロマチン構造研究において優れたモデル生物である出芽酵母を用い、ヘテロクロマチン領域伸長停止メカニズムを分子レベルで明らかにすることを目的とした。最初に、スクリーニングで得られた機能未知遺伝子に注目し解析を行った。次に、生体内におけるヘテロクロマチン境界領域形成に、スクリーニングにより分離された因子が関与しているのか、あるいは場所により使い分けされているのか、それぞれの境界領域に特異性があるか解析した。これらの結果をもとに、細胞周期との関与、更にスクリーニング法に改良を加え、ヘテロクロマチン領域形成と境界領域形成のタイミング等、生体内におけるヘテロクロマチン領域伸長停止のメカニズムをより詳細に解析し、得られた結果を統合し、分子レベルでのメカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(1) スクリーニングにより分離された未知タンパク質 Gic1 と Ycr076c の解析

- (a) 未知タンパク質と GFP の融合タンパク質を作成し、細胞内局在を観察した。
- (b) 大腸菌内で発現させ、それぞれのタンパク質を精製し、抗体を作成した。
- (c) Two-hybrid 法を行い、結合するタンパク質を解析した。
- (d) 未知タンパク質と特異的に相互作用する因子について、生化学的手法と LC-MS/MS を組み合わせ、その同定を試みた。

(2) スクリーニングにより分離された未知タンパク質 Gic1、Ycr076c と生体内における境界形成機構との関与

未知遺伝子破壊株を作成し、生体内における境界領域が失われるかを抗 Sir3p 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) により解析した。

(3) ヘテロクロマチン構造の確立及び境界領域確立のメカニズムの解明

境界形成に関与するタンパク質を分離したスクリーニング法を更に改良し、ヘテロクロマチン領域確立後に境界が形成されるか、確立前に境界が形成されるかを解析した。解析にはガラクトース添加後に境界形成に関わるタンパク質及び、ヘテロクロマチン構造形成に必須なタンパク質が誘導出来るシステムを利用した。

(4) スクリーニングにより分離された未知タンパク質の染色体上における局在の解析
生体内における境界領域に未知タンパク質が存在するかをクロマチン免疫沈降法 (ChIP 法) により解析した。

4. 研究成果

(1) スクリーニングにより分離された未知タンパク質 Gic1 と Ycr076c の解析

- (a) 未知タンパク質と GFP の融合タンパク質を作成し、細胞内局在を観察した。細胞内タンパク質量は少なく明確な局在は確認出来なかったが、核と細胞質両方に存在することが示唆された。
- (b) 大腸菌内で発現させ、それぞれのタンパク質を精製し、抗体を作成した。今回作成した抗体は、特異性が低く、現段階では実験に使用することが出来なかった。
- (c) Two-hybrid 法を行い、結合するタンパク質を解析した。Gic1 がヒストンと特異的に結合することが示唆された。しかし、結合力が弱いため今後更なるアプローチが必要であると考えている。
- (d) 未知タンパク質と特異的に相互作用する因子について、生化学的手法と LC-MS/MS を組み合わせ、その同定を試みた。Ycr076c はタンパク質分解系に関与するプロテアソーム複合体のうち 20S 複合体の構成因子である Pre4、Pre5、Pre6、Pre7、Pre8、Pre9 と結合することが明らかとなった (図1)。Gic1 に特異的に結合するタンパク質は

LC/MS/MS では同定出来なかった。

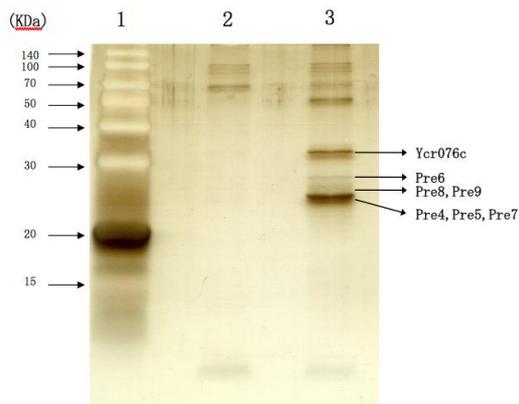


図1：Ycr076c と特異的に結合するタンパク質を確認した際の銀染色の結果
lane1：サイズマーカー、lane2：コントロールの野生株、lane3：Flag-Ycr076C を挿入した酵母株

(2) スクリーニングにより分離された未知タンパク質 *Gic1*、*Ycr076c* と生体内における境界形成機構との関与

遺伝子破壊用プラスミドを作成し、相同組換え技術を用い、*YCR076C*、*YHR061C* 遺伝子を破壊した。破壊株を用い、生体内における境界領域が失われるかを抗 *Sir3p* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により確認した。これらの遺伝子が生体内で境界形成機構に直接関与していれば、野生株において決定した境界は失われ、*Sir3p* タンパク質が更に伸長する。*HMR* 領域左側境界領域に関して解析を行った結果、*GIC1* 破壊株では *Sir3* タンパク質の伸長が見られ、*HMR* 左側境界領域の形成に直接関与することが示唆された (図2)。この領域では *YCR076C* は直接関与しなかった。

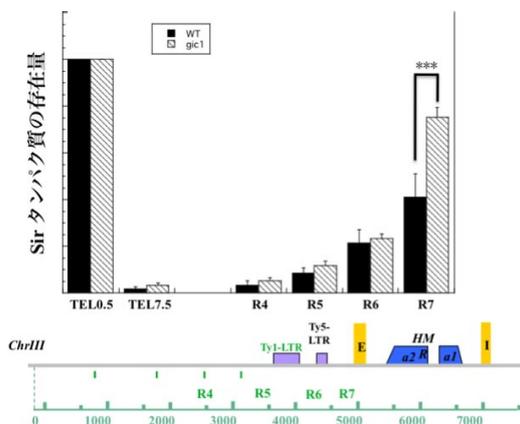


図2：*GIC1* の生体内での境界形成機能領域 (***) $p < 0.001$

(3) ヘテロクロマチン構造の確立及び境界領域確立のメカニズムの解明

研究方法に述べた新たな解析方法により境界はヘテロクロマチン領域確立後にも形成出来ることが明らかとなった。

(4) スクリーニングにより分離された未知タンパク質の染色体上における局在の解析
抗 *Sir3p* 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により解析を行ったが現在のところ優れた結果は得られていない。

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 Maeda Y, Dobayashi D, Oki M, Nose H, Sakurai A, Isa K, Fujii Y and Uchida H. (2009) Expression in Escherichia coli of an unnamed protein gene from Aspergillus oryzae RIB40 and cofactor analyses of the gene product as formate oxidase. Biosci. Biotechnol. Biochem. **73**, 2645-2649
- ② Maeda Y, Oki M, Fujii Y, Hatanaka A, Hojo M, Hirano K and Uchida H. (2008) Cloning and expression of three formate oxidase genes from Debaryomyces vanriijiae MH201. Biosci. Biotechnol. Biochem., **72**, 1999-2004

[学会発表] (計13件)

- ① Yasunobu Mano, Akira Hatanaka, Hiroyuki Uchida and Masaya Oki (2009 November 10) "Analysis of the heredity change of the boundary" Chromatin domains and Insulators (Baeza, Spain)
- ② Masaya Oki, Yasunobu Mano, Akira Hatanaka and Hiroyuki Uchida (2009 July 13) "Analysis of the heredity change of the gene expression in the single cell" FASEB summer research conference (Colorado, USA)
- ③ Akira Hatanaka, Yasunobu Mano, Hiroyuki Uchida and Masaya Oki (2008 May) "Analysis of heterochromatin barrier function in S.cerevisiae" Gordon Research Conferences (Barga, Italy)
- ④ Masaya Oki (2008 May) "Analysis of heterochromatin barrier function in S.cerevisiae" International Symposium on Chromosome Dynamics (Ise, Japan)
- ⑤ 沖 昌也 「新たなアプローチからのエピジェネティクスの解明」産業技術研究所 講演会 (札幌) 2010年2月19日
- ⑥ 眞野恭伸、山口さやか、坂季美子、小林武彦、内田博之、沖昌也 「エピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解析」

第 27 回 染色体ワークショップ (御殿場)

2010 年 1 月 20 日

⑦ 沖昌也, 眞野恭伸, 畑中彬良, 内田博之
「単一細胞におけるエピジェネティックな
遺伝子発現切り替わりメカニズムの解析」

第 8 回核ダイナミクス研究会 (伊豆) 2009
年 6 月 19 日

⑧ 畑中彬良, 眞野恭伸, 具雲峰, 新名主カオ
リ, 中山潤一, 内田博之, 沖昌也

「生体内におけるサイレンシング領域伸長
停止メカニズム」第 26 回 染色体ワークシ
ョップ (姫路) 2009 年 1 月

⑨ 沖昌也, 畑中彬良, 野上恵美, 内田博之「ヘ
テロクロマチン領域伸長停止機能と Ty 因
子の関与」第 31 回 日本分子生物学会 (神
戸) 2008 年 12 月

⑩ 沖昌也 「ヘテロクロマチン領域伸長停止メ
カニズムの解析」第 11 回 クロマチン研究
会 (三島) 2008 年 10 月

⑪ 沖昌也, 畑中彬良, 野上恵美, 内田博之「*HMR*
left boundary の機能解明」

第 41 回 酵母遺伝学フォーラム (札幌) 2008
年 9 月

⑫ 沖昌也, 畑中彬良, 野上恵美, 内田博之「生
体内におけるヘテロクロマチン領域伸長停
止メカニズムの解析」第 80 回 日本遺伝学
会 (名古屋) 2008 年 9 月

⑬ 畑中彬良, 眞野恭伸, 内田博之, 沖昌也「ヘ
テロクロマチン領域伸長停止メカニズムの
解析」第 2 回日本エピジェネティクス研究会
年会 (静岡) 2008 年 5 月

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沖 昌也 (OKI MASAYA)

福井大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号: 60420626