

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 10 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570174

研究課題名（和文） クロマチン構造形成と共役するヒストンバランス制御機構

研究課題名（英文） The mechanisms of histone balance control coupling with chromatin assembly

## 研究代表者

田上 英明 (TAGAMI HIDEAKI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・准教授

研究者番号：70273216

研究成果の概要（和文）：クロマチン構造形成はゲノム統合性と関連して厳密に制御される。本研究では、クロマチン形成の反応中間体である可溶性ヒストン複合体を様々な条件で精製し、それらの機能解析を行うことにより、ヒストンバランス制御システムの分子基盤の解明を目指した。分裂酵母をモデル系として新規可溶性ヒストン H3 結合因子を同定し、その機能解析から可溶性ヒストン量の制御への関与、およびヒストン H3/H4 量と細胞増殖との関連性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Chromatin assembly is controlled strictly in association with genome integrity. In this study, in order to elucidate the molecular basis of histone balance control system, we purified the soluble histone complexes as reaction intermediates. We identified a novel soluble H3 binding factor in fission yeast. Further biochemical and genetic analyses suggest a new aspect for soluble H3 level control and cell growth.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ヒストン、クロマチン構造、ヒストン複合体、Mlo2、Cia1

## 1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造は、ヒストン H2A, H2B, H3, H4 各 2 分子に DNA が巻き付いたヌクレオソーム

ムを基本単位としたゲノム・エピゲノム情報の基盤である。ヒストンの染色体への挿入はDNA複製機構と同様に厳密に制御されるべき事象であり、ヒストン-DNA、およびヒストン分子間の量的バランスの破綻がDNA損傷感受性や染色体欠落などを引き起こすことが報告された。従って、ヒストンバランス制御は高等生物における細胞の癌化に繋がるゲノム不安定化とも密接に関わることが想像されたが、ヒストンバランス制御の分子機構については不明であった。近年、多様なヒストン化学修飾やヒストンバリエーションなど特異的なクロマチン構造の形成・変換・維持機構に関与するヒストンシャペロン因子群が次々と明らかとされつつあった。

酵母におけるヒストンの量的制御は遺伝子転写レベルでの制御が古くから知られてきたが、このヒストン転写制御に関わるHirは可溶性ヒストンと結合し、ヒストンシャペロンとしても機能する。また、他のヒストンシャペロンが細胞分裂や細胞増殖などと共役することも知られている。可溶性ヒストンと相互作用する因子群がヒストンバランス制御と細胞増殖等の細胞機能とを繋ぐキー分子として働くのではないだろうか？

## 2. 研究の目的

このような状況下、申請者はヒストンバランス制御と細胞機能とを繋ぐキー分子として可溶性ヒストンと相互作用するヒストンシャペロン因子に着目し、複合体精製を生化学的スクリーニングと捉えて機能解析を進めることを計画した。既に、ヒストンダイナミクスやヒストンの量的制御に関わりうる候補因子群（出芽酵母H2A/H2B-FACT、分裂酵母H3/H4-Mlo2）を見いだしてきた。特に、分裂酵母で可溶性ヒストンH3/H4結合因子として同定したMlo2は、大量発現時に染色体分配異常を引き起こす機能不明の因子であった(NAR 24, 4674(1996))。特に、Mlo2の分子機能に焦点を当て、クロマチン形成と共役してヒストン量を監視、管理する可溶性ヒストン複合体の働きを理解することで、ヒストン代謝、染色体機能、細胞機能と協調的に

結び、相互にフィードバックする連携システムの一端を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) Mlo2の分子機能解析：

H3/H4-Mlo2相互作用の分子機構とその機能の解明を目指して、以下のリコンビナントタンパク質を用いた生化学的解析を計画した。GST融合Mlo2について一連の欠失変異体を作成し、リコンビナント分裂酵母ヒストンH3/H4との結合をプルダウン解析することで、H3/H4結合領域を同定することを試みた。また、Mlo2自身のヒストンシャペロン活性についての検討や、H3/H4複合体として同様に精製されている既知のヒストンシャペロンCia1との間で、Mlo2-Cia1間相互作用やヒストン転移について解析を進めた。さらに、Mlo2 N末端領域はUBRユビキチンリガーゼに相同領域をもつため、Mlo2のE3ユビキチンリガーゼ活性をリコンビナントE1, E2を用いた解析系で検討した。

### (2) Mlo2機能と染色体分配異常、細胞増殖阻害との関連性：

Mlo2大量発現系や、Mlo2欠損株を構築し、細胞増殖への影響や可溶性ヒストン量の変動を解析した。また、エピトープタグを付加した内在性Mlo2、および大量発現Mlo2を構築し、複合体として相互作用因子を探索した。

### (3) ヒストンバランス変動時の複合体解析：

分裂酵母において、それぞれのヒストン分子を単独もしくは、H2A/H2B, H3/H4ペアで大量発現する誘導系を構築している。H3/H4大量発現時に増殖阻害を観察しているが、それぞれの可溶性ヒストン複合体を精製し、ヒストンバランスを監視、制御する因子群を生化学的に探索した。

## 4. 研究成果

### (1) Mlo2の分子機能解析：

GST 融合 Mlo2 は既知のヒストンシャペロンである Cia1 とほぼ同程度の H3/H4 結合活性を持つことが明らかとなった。また、スーパーコイリング実験により、Mlo2 は新規 H3/H4 シャペロンであることが明らかとなった。Cia1 と Mlo2 は直接結合しないものの H3/H4 を介して相互作用し、Cia1 から Mlo2 に H3/H4 が転移されることを見いだした。ヒストンシャペロン間における H3/H4 の受け渡しの実体はこれまで報告されておらず、多くの因子が関わる複雑なクロマチン形成の分子機構の解明に繋がる成果であると考えられる。

Mlo2 の E3 ユビキチンリガーゼ活性について、様々な E1, E2 との組み合わせで解析を行ったが、*in vitro* で活性は検出されず残念ながら現在までに明確な結論を得るに至っていない。このモチーフの生理機能については今後の課題であるが、*In vivo* における変異体解析を進めていきたいと考えている。

一連の Mlo2 欠失変異体を作成し、H3/H4 との結合実験を行ったところ、いくつかの領域で H3/H4 結合活性をもつものの、酸性領域を含む C 末端領域が特に強く結合することが明らかとなった。C 末端領域についてさらに欠失変異体を作成したところ、酸性領域を持たない 50 アミノ酸は、生理的条件下において従来解離しないとされてきた H3/H4 を解離させる活性を持つことを見いだした。

この領域はヒトまで高度に保存されており、新規ヒストン H3 結合モチーフとして今後のさらなる解析が期待される。特に、細胞質で合成された H3/H4 二量体はこれまで分離しないと考えられてきており、新しいヒストン代謝の制御システムがある可能性が示唆される。

(2) Mlo2 機能と染色体分配異常、細胞増殖阻害との関連性：

分裂酵母において、Mlo2 大量発現は染色体分配異常を起こし、細胞増殖が著しく阻害されることを確認した。Mlo2 欠損株は、分裂酵母の生育にほとんど影響しないが、H3 大量発現に対して感受性を示すことが明らかとなった。

また、内在性 Mlo2 や Cia1 にエピートプタ

グを付加し、複合体を精製したところ、Cia1 複合体には HIRA 複合体構成因子の Hip1, Hip3, Slm9 が含まれるが、CAF-1 複合体や Mlo2 は含まれず、Mlo2 複合体には既知のヒストンシャペロンは含まれなかった。この結果は、*in vitro* 実験の結果と一致して、細胞内においても Mlo2 と Cia1 は直接結合しないことを示している。さらに、同条件で Cia1 が H3/H4 と結合するのに対し、Mlo2 は H3 に優先的に結合することが明らかとなった。また、GFP 融合 Mlo2 は細胞周期を通して核に局在することも明らかになった。

以上の結果から、Mlo2 は細胞核内で H3 に結合し、可溶性 H3/H4 量制御に関与することが考えられる。

(3) ヒストンバランス変動時の複合体解析：

ヒストンバランス変動時における酵母の増殖阻害とヒストン複合体に焦点を当てて解析を行った。各ヒストンについて、単一もしくは H2A/H2B, H3/H4 の各ペアで大量発現したところ、H3/H4 のペアを大量発現した場合に顕著な増殖阻害が起こることを見いだした。逆に、H3/H4 の遺伝子コピーを減少させた場合は高温感受性となったことより、可溶性 H3/H4 量は特に厳密に制御されることが示唆される。

Mlo2 欠損株では H3 大量発現による増殖阻害が増すことから、Mlo2 のヒストンバランス制御への関与が示唆された。さらに、各ヒストン分子の量比を変動させた場合の H2A 複合体や H3 複合体を様々な条件で精製することにより、特異的構成因子を見いだした。これらの因子によるヒストンバランス制御への関与について、今後解析を進めることで動的なクロマチン構造形成における DNA とヒストン八量体の量比や、各ヒストン分子間の量的バランス制御など新しい品質管理システムの分子基盤の理解に繋がることが期待される。

## 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)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 加藤麻希、田上英明「Roles of HiTAP1 for Chromatin Dynamics in Fission Yeast」第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、横浜
- ② 田上英明、加藤麻希「新規ヒストン結合因子 HiTAP1 による動的エピジェネティクス制御機構」第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 22 日、京都
- ③ 田上英明、加藤麻希「A new mode of histone dynamics: HiTAP1 separates histone H3 and H4」CSHL meeting "Mechanisms of Eukaryotic Transcription", 2011 年 9 月 2 日、CSHL、アメリカ合衆国
- ④ 田上英明、伊縫美妃、保坂いづみ「A new mode of histone dynamics: HiTAP1 dissociates histone H3 and H4」EMBO Conference: Chromatin and Epigenetics、2011 年 6 月 3 日、EMBL、ドイツ
- ⑤ 田上英明、加藤麻希、伊縫美妃「新規ヒストン H3 結合因子 HiTAP1 は H3/H4 を解離させる」5 回日本エピジェネティクス研究会年会、2011 年 5 月 18 日、熊本
- ⑥ 伊縫美妃、保坂いづみ、田上英明「ヒストン H3-H4 を介した Mlo2 と Asf1 の相互作用」第 33 回日本分子生物学会年会、第 84 回日本生化学会 合同大会、2010 年 12 月 10 日、神戸
- ⑦ 橋本真美、加藤麻希、田上英明「ヒストン複合体ダイナミクス：細胞抽出液内において複合体交換反応は起こるのか？」第 33 回日本分子生物学会年会、第 84 回日本生化学会 合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸

[図書] (計 2 件)

- ① 田上英明「ヌクレオソームとヒストン」『生体の科学』62 巻 5 号 pp432-435 医学書院 (2011)
- ② 田上英明「13 章 ヒストンバリエーションとエピジェネティクス」『エピジェネティクス (堀越正美 監訳)』pp291-309 培風館 (2010)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田上 英明 (TAGAMI HIDEAKI)  
名古屋市立大学・大学院システム自然科学  
研究科・准教授  
研究者番号：70273216

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし