

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 5 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 年度 ～ 2012 年度

課題番号：22580086

研究課題名（和文） 酵母におけるエピジェネティックな転写制御の解析とその応用

研究課題名（英文） Studies on the epigenetic regulation of meiosis/sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

土屋 英子 (TSUCHIYA EIKO)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：90127671

研究成果の概要（和文）：

出芽酵母の減数分裂開始におけるヒストン脱アセチル化酵素 (Rpd3/HDAC) の活性制御、および減数・孢子形成の進行における機能の解析を行い、1) 減数分裂初期遺伝子の発現に際して Rpd3/HDAC の活性は *HAC1* と *SET3* を含む複数の因子で制御されること、2) Rpd3/HDAC は減数分裂中期遺伝子の転写制御因子 *NDT80* の転写をこの抑制に働く Sum1/Hst1 の解離に働いて正に制御することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We explored the function of Rpd3/HDAC on the initiation and progression of meiosis/sporulation in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*, and found the followings. 1) HDAC activity of Rpd3 is repressed by the cooperation of multiple factors including at least Hac1 and Set3 upon induction of early-meiotic gene *IME2*. 2) Rpd3/HDAC positively regulates the expression of *NDT80*, encoding a key regulator of mid- and late-meiotic/sporulation genes, through facilitating the release of Sum1/Hst1 transcriptional repressor.

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、分子遺伝学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用微生物学

キーワード：細胞応答

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体は、ヒストン 8 量体に

DNA が約 2 回巻きついたヌクレオソームを

基本として、高度に折りたたまれた構造を持つ。従って遺伝子の転写制御にはヒストン分子の修飾や、クロマチン構造再編因子による染色体構造の変換が重要な意味を持つ。近年の研究により、プロモーター領域での、ヒストン分子アミノ末端リジン残基の高アセチル化状態が転写活性化に、逆に低アセチル化状態が転写抑圧に強く関与していることが明らかになっている。前者の状態はヒストンアセチル化酵素、後者はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の作用によって形成される。現在までにこれら酵素 (多くは多数のタンパク質からなる複合体として存在する) の細胞増殖や分化における転写制御へのかかわりや、酵素複合体の構造と機能に関する研究は精力的に行われ、多くの知見が得られている。しかし、細胞内でこれらの酵素がどのように調節されているのかについての知見は極めて少なく、特に HDAC については、実際にその酵素活性の調節に基づいた転写制御系が存在するかということも分かっていない。我々は出芽酵母の減数分裂開始を支配する遺伝子の1つ、*IME2* の転写活性化においてプロモーターに局在した HDAC (Rpd3-Sin3複合体) の酵素活性の阻害が、HDAC が結合するヌクレオソームのヒストンアセチル化の上昇を引き起こし、これにより転写因子 Ime1 とクロマチン再編因子 RSC が呼び込まれて TATA 領域のクロマチン構造が開いた状態となり、転写が開始することを見出した (Mol.Cell. Biol., 2007)。また、出芽酵母には Rpd3 を含め 10 種の HDAC が存在するが、このうち RPD3 を欠損させた 2 倍体のみが減数分裂胞子形成不能となることを見いだした。

2. 研究の目的

真核生物の遺伝子の転写には、ヒストンの化学修飾と多様なクロマチン再編因子

の作用が必要である。この制御の乱れは癌化等様々な病変に深く関与することが明らかになり医薬開発の標的として注目されているが、細胞内でのこれらの酵素の調節機構や、ヒストン修飾酵素と他のクロマチン制御因子の相互作用などについての知見は極めて少ない。また、出芽酵母の減数分裂・胞子形成はこの生物の分化過程と位置づけられ研究が進められているが、この過程の制御における HDAC の役割についてもほとんど分かっていない。本研究は、出芽酵母の減数分裂開始におけるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の転写タイミングを含めた制御、および HDAC の減数・胞子形成における機能の分子機構の解析の解明を行い、得られた結果を新たな特異性の高い HDAC 阻害剤探索系の開発につなげることを目的として行った。

3. 研究の方法

出芽酵母 W303 株を用い、本菌で常用されている分子遺伝学的手法を用いて行った。

4. 研究成果

- 1) **遺伝学的手法による HDAC 阻害因子の探索**: Rpd3-Sin3 複合体の細胞内での活性阻害に働く因子を探索することを目的として研究を行った。方法は以下の通りである。HDAC によって抑制を受ける *INO1* のプロモーターの下流に *HIS3* 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子は HDAC の作用によって発現が抑制されるため、この遺伝子を持つ *his3* 株はヒスチジンを欠く最小培地 (-His 培地) では生育できない。しかし遺伝子量の増加により HDAC 阻害因子を多量に発現させれば生育可能になることが期待される。この株に多コピー遺伝子ライブラリーを形質転換して得られた、約 60 万の形質

転換株から候補遺伝子を選抜し、最終的に1種の候補が得られた。配列解析と遺伝子切り詰め実験の結果これらは*UME6*遺伝子の部分配列を含むものであることが分かり、この部分タンパク質が本来HDACに含まれるUme6と競合することにより阻害が起こったものと考えられた。このスクリーニングは60万株と既に十分な形質転換体について検討していることから考え、HDACの細胞内での阻害は複数の因子によって制御されているものと考えられた。

2) 減数分裂初期遺伝子 *IME2* の発現タイミングの調節に関わる因子の探索: 過去にRpd3と相互作用することが報告されている因子について検討した結果、*HAC1*と*SET3*がこれに働くことを見出した。それぞれの蛋白質が実際に*IME2*遺伝子のプロモーター上に結合するかを検討した結果、後者がHDAC依存的に結合することを明らかにした。Set3タンパク質は八種のサブユニットで構成される複合体の因子で、この複合体にはHos2と呼ばれるHDACが含まれている。*IME2*遺伝子の発現タイミング制御がこのHDAC活性によるものであるかについて、破壊株を用いて検討した結果、HDAC活性には依存しない事を明らかにした。

3) ヒトHDAC1と相同性の高いRpd3-Sin3複合体の減数分裂開始における機能として、新たに中期遺伝子の転写制御因子*NDT80*の転写を正に制御することを見いだした。*NDT80*のプロモーターにはRpd3-Sin3複合体の結合サイトであるURS1と、自身が結合してポジティブフィードバック機能を果たすためのMSE配列が存在している。栄養増殖時にはURS1にRpd3-Sin3複合体、MSEにSum1/Hst1という抑制因子が結合し二重に転写の抑制を行っている。Rpd3-Sin3複合体は減数分裂開始に伴い、初期遺伝子*IME2*

での場合と同様に、一過的な活性の抑制を受けIme1の結合を促し転写を開始させると同時に、Sum1/Hst1の解離に必要であることが分かった。このため、*RPD3*破壊株では*NDT80*の転写は起こらないが、*RPD3SUM1*二重破壊株では*NDT80*の転写が観察できた。しかし興味深いことに野生株では転写開始後2時間以降に急激な転写量の上昇が観察されたのに比べ、二重破壊株ではこの上昇が全く観察されなかった。従ってRpd3-Sin3複合体はSum1/Hst1の解離に加え、Ndt80によるポジティブフィードバックにも必要であることが分かった。さらにこの制御におけるクロマチン構造レベルでの理解を得るため、プロモーター領域のヌクレソームの配置についてMNaseを用いた解析を行った結果、*RPD3*破壊株ではTATA配列をマスクするヌクレオソームの移動が起こらないことが分かった。

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4件)

- 1) K. Kimura, Y. Sakamoto, N. Jujiwawa, S. Uesugik N. Aburai, M. Kawada, S. Ohba, T. Yamori, E. Tsuchiya, and H. Koshino., Bioorg. Cleavage mechanism and anti-tumor activity of 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene isolated from edible wild plants, Med. Chem. 査読有り 20, 3887-3897. (2012).
- 2) Katsunori Takahashi, Ryota Imano, Tatsuya Kibe, Hiroyuki Seimiya, Yukiko Muramatsu, Naoki Kawabata, Genki Tanaka, Yoshitake Matsumoto, Taisuke Hiromoto, Yuka Koizumi, Norihiko Nakazawa, Mitsuhiro Yanagida, Masashi Yukawa, Eiko Tsuchiya, and Masaru Ueno, Fission yeast Pot1 and RecQ helicase are required for efficient chromosome segregation. Mol. Cell. Biol., 査読有り 31: 495 - 506 (2011).
- 3) Yuka Kobayashi, Koichiro Sato, Tatsuya Kibe, Hiroyuki Seimiya, Asako Nakamura, Masashi Yukawa, Eiko Tsuchiya and Masaru Ueno, Expression of Mutant RPA in Human Cancer Cells Causes Telomere Shortening, , Biosci. Biotech. Biochem., 査読有り 74, 382-385

- (2010).
- 4) E. Tsuchiya, M. Yukawa, M. Ueno, K. Kimura and H. Takahashi, A novel method of screening cell-cycle blockers as candidates for anti-tumor reagents by using yeast as a screening tool, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 査読有り 74, 411-414 (2010).

[学会発表] (計 24 件)

- 1) 佐藤雅弘、出芽酵母の経時寿命の維持における Rpd3/HDAC の機能解析、日本農芸化学学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 25 日、東北大学
- 2) 今村優子、シドケ由来抗癌活性物質エンドパーオキシサイドによる酵母の細胞周期制御の解明、日本農芸化学学会 2013 年度大会、2013 年 03 月 25 日、東北大学
- 3) 湯川格史、出芽酵母 Rpd3/HDAC 複合体による減数分裂中期遺伝子群の転写制御、酵母遺伝学フォーラム、2012 年 09 月 05 日、京都大学おうばくプラザきはだホール
- 4) 湯川格史、出芽酵母 Rpd3/HDAC 複合体による減数分裂中期遺伝子群の転写制御、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場
- 5) 余斐斐、出芽酵母クロマチンリモデリング因子 RSC によるミトコンドリア制御機構の解明、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日、福岡国際会議場
- 6) 湯川 格史、出芽酵母の Rpd3/HDAC 複合体による減数分裂中期遺伝子群の転写制御、日本農芸化学学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 23 日、京都女子大学
- 7) 門前宏陽、出芽酵母の経時寿命の維持における Rpd3/HDAC の機能解析、酵母遺伝学フォーラム、2012 年 09 月 05 日、京都大学おうばくプラザきはだホール
- 8) 今村 優子、酵母を用いたシドケ由来の抗癌活性物質エンドパーオキシサイドの作用機序、日本農芸化学学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 24 日、京都女子大学

- 9) 余 斐斐、出芽酵母のクロマチンリモデリング因子 RSC によるミトコンドリア制御機構の解明、日本農芸化学学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学
- 10) 湯川 格史、(招待講演) 出芽酵母の飢餓応答とエピジェネティクス制御、日本農芸化学学会 2012 年度大会、2012 年 3 月 25 日、京都女子大学
- 11) 湯川 格史、出芽酵母の減数分裂中期遺伝子群の転写誘導における Rpd3/HDAC 複合体の役割、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜
- 12) 大屋 朋之、酵母 Rpd3/HDAC を介した減数分裂遺伝子群の転写タイミング調節、第 34 回日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜
- 13) 今村 優子、The role of RSC chromatin-remodeling complex for mitochondrial function in budding yeast、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜
- 14) 河村 浩、Rpd3/HDAC を介した減数分裂遺伝子 *NDT80* の転写調節機構、酵母遺伝学フォーラム、2011 年 9 月 5 日、九州大学医学部百年講堂
- 15) 今村 優子、ミトコンドリア機能におけるクロマチンリモデリング因子 RSC の役割、酵母遺伝学フォーラム、2011 年 9 月 5 日、九州大学医学部百年講堂
- 16) 浅田 星太郎、減数分裂における出芽酵母 Rpd3/HDAC の機能解析、酵母遺伝学フォーラム、2011 年 9 月 5 日、九州大学医学部百年講堂
- 17) 湯川 格史、酵母 Rpd3/HDAC の減数分裂における制御機構、日本農芸化学学会 2011 年度大会、2011 年 3 月 26 日、京都女子大学
- 18) 浅田 星太郎、減数分裂における酵母 Rpd3/HDAC の機能解析、日本農芸化学学会

2011年度大会、2011年3月26日、
京都女子大学

19) 土屋 英子、(招待講演) 出芽酵母に見る真菌類の生き残り戦略—減数分裂・孢子形成におけるクロマチン構造制御、日本農芸化学学会2011年度大会、2011年3月28日、京都女子大学

20) 土屋英子、Dose the yeast chromatin remodeling complex RSC regulate mitochondrial function?, International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities、2011年1月25日、淡路夢舞台国際会議場

21) 三滝 勇、酵母Rpd3/HDACの減数分裂における機能解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月7日、神戸ポートアイランド

22) 釜谷和興、酵母Rpd3/HDACを介した減数分裂遺伝子群の転写タイミング調節、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月8日、神戸ポートアイランド

23) 湯川格史、微小管の安定性に関わる酵母SRL1遺伝子と細胞表層センサーとの遺伝的相互作用の解析、第33回日本分子生物学会年会、2010年12月10日、神戸ポートアイランド

24) 湯川格史、酵母Rpd3/HDACの減数分裂における機能解析、酵母遺伝学フォーラム、2010年9月10日、ならまちセンター

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土屋 英子 (TSUCHIYA EIKO)
広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授
研究者番号：90127671

(2) 研究分担者
()

研究者番号：

(3) 連携研究者
()

研究者番号：