

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 3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22770003

研究課題名（和文） ヒストンと多機能性転写因子による染色体現象の統合的制御機構

研究課題名（英文） Concerted regulation of chromosome-templated processes by histones and multi-functional transcription factors

研究代表者

山田貴富(YAMADA TAKATOMI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：30451850

研究成果の概要（和文）：

染色体 DNA は複製、転写、組換えなどの多彩な代謝現象の舞台となるが、私は、凝縮したクロマチン構造中で、いかにして適切な反応が適切な状況において起こるのか、という点に注目している。本研究では、分裂酵母を用い、相同組換えと転写の双方を活性化する Atf1-Pcr1 と染色体の主要構成成分のヒストンの二つの因子に注目して、これらの相同組換えと転写における役割を明らかにすることを試みた。その結果、主に次の3つの結果を得た。(1) Atf1 の転写活性化ドメインを同定し、これが、転写制御に関わることを見いだした。興味深いことにこのドメインは組換えにも関与していた。(2) Atf1-Pcr1 依存的に相同組換えが起こっている部位と、転写が起こっている部位とで、ヒストンの修飾パターンを調べたところ、前者ではヒストン H3 の9番目のリジンのアセチル化(H3K9ac)のみが、後者では、H3K9acに加えて、同ヒストンの14番目のリジンのアセチル化と4番目のリジンのトリメチル化(H3K4me3)が見られた。(3) H3K9ac は Atf1-Pcr1 の結合に関わらず、一般的に相同組換えに関与することがわかった。

研究成果の概要（英文）：

Chromosomal DNA is a dynamic molecule that is replicated, transcribed, and recombined, yet it is packaged into a highly condensed structure termed chromatin. We are interested in how, in chromatin environment, these processes are coordinated so that an appropriate reaction occur at an appropriate timing.

We used fission yeast as a model organism, and analyzed functions of Atf1-Pcr1 and histones in transcription and homologous recombination. The former is a complex of DNA-binding transcription factors, and the latter is the most abundant protein that constitutes chromatin. Our findings are summarized as follows.

(1) We have identified the transcriptional activation domain of Atf1. We also showed that this domain is involved not only in transcription, but also in recombination.

(2) We compared histone modification patterns at Atf1-Pcr1 dependent recombination sites and Atf1-Pcr1 dependent transcriptional start site. While recombination was associated with acetylation of histone H3 lysine9 (H3K9ac), transcription was associated with H3K9ac, acetylation of H3lysine14, and trimethylation of H3 lysine4.

(3) We also showed that H3K9ac is associated with and is important for recombination, regardless of Atf1-Pcr1 localization.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：生物学

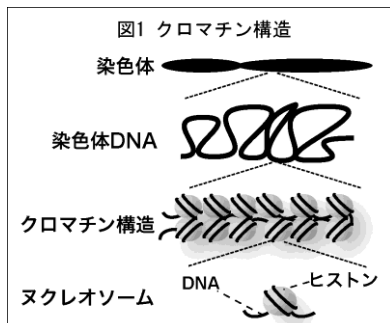
科研費の分科・細目：基礎生物学 遺伝・染色体動態

キーワード：ヒストン、多機能性転写因子、染色体

1. 研究開始当初の背景

染色体 DNA は複製、転写、組換えなどの多彩な代謝現象の舞台となる。これらの現象群は全て生命活動を根幹から支えており、適切な反応が適切な状況において起こるよう統合的に制御されていると思われる。

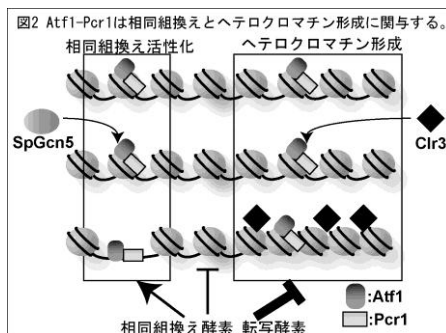
真核生物の染色体 DNA はほぼ全長にわたって塩基性タンパク質ヒストンに巻き付き、幾重にも折り畳まれて核内に収容されている。この高度に凝縮し



た構造体をクロマチン構造という(図1)。生体内での転写や組換え等のDNA代謝現象はクロマチン構造の影響を大きく受けており、一般的にはその凝縮性のため阻害されている。

しかしながら、クロマチン構造中での、染色体関連現象の分子機構及び現象間のクロストークについてはほとんど明らかにされていなかった。

この問題に答える手がかりを、私はそれまでの研究で得てきていた。私は、分裂酵母をモデル生物として用いて研究を行っており、その中で重要な因子としてヒストンとAtf1-Pcr1がある。



前者は、大部分のDNAと強固に結合して全てのDNA関連反応に関与するもので、ヒストンH3、H4など複数の種類が存在する。また、様々な翻訳後修飾を受けることでクロマチンの構造と機能を制御することが知られている。

例えばアセチル化はクロマチンの凝縮度を低下させ、転写や組換え等の活性化と関連する。

一方、後者は、ほぼ全ての真核生物で見られるATF/CREBファミリーに属する転写因子Atf1とPcr1からなるヘテロダイマーである。当初、転写因子として同定されたが、最近組換えやヘテロクロマチン形成等他の現象への関与も指摘されている。

私たちは、Atf1-Pcr1が(1)相同組換えを活性化する際には、ヒストンアセチル化酵素Gcn5を介して自身の結合部位近傍のヒストンH3、H4をアセチル化すること(Yamada et al. 2004 EMBO J.)、及び(2)ヘテロクロマチン領域中ではヒストン脱アセチル化酵素Clr3を自身の結合部位近傍に呼び込み、周辺のヒストンH3を脱アセチル化すること(Yamada et al. 2005 Mol. Cell)を示した(図2)。これらから「Atf1-Pcr1が、適切な因子を自身の局在部位に呼び込むことで周辺のヒストンが修飾され、最終的に適切な現象が起こる」という仮説が考えられる。ただし、「ヒストンとAtf1-Pcr1が複数の染色体現象を統合的に制御する機構」や、冒頭で掲げた「なぜそれぞれの現象が適切な状況においてのみ起こるのか」という点を理解するには「Atf1-Pcr1が適切な因子を選択する過程」、「詳細なヒストン修飾パターン」、「最終的に適切な現象が起こる過程」などの重要な問題が未解明であった。

2. 研究の目的

前述のように、複数あるDNA代謝反応の中から、適切な反応が適切な状況において起こるよう統合的に制御されていると思われる。私は、その制御がクロマチン構造中でのように行われているか、という点を明らかにすることを目指している。

この目的を達するため、本研究では、因子として分裂酵母のヒストンとAtf1-Pcr1を、現象として相同組換えと転写活性化を取り上げ、これら2つの現象におけるヒストンとAtf1-Pcr1の役割を解析することにした。

3. 研究の方法

「転写が活性化されている部位のヒストンとAtf1-Pcr1」、「相同組換えが活性化されている部位のヒストンとAtf1-Pcr1」のそれぞれの特徴を明らかにした上で比較する。具体

的には

(1) Atf1-Pcr1 分子の中で、転写と相同組換えを活性化するのに必要なドメインを同定し、比較した。方法として、酵母 One-Hybrid 法を用いた。

(2) Atf1-Pcr1 に依存して転写が起こる部位と組換えが起こる部位について、それらの現象に関連のあるヒストン修飾を調べた。方法として、修飾ヒストンに対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降を用いた。

(3) 特に、相同組換えの際に、興味深いヒストン修飾パターンが見られたため、この修飾が起らない変異体を作製し、相同組換えとヒストン修飾の関係を詳細に調べた。

4. 研究成果

(1)

Atf1 の転写活性化ドメイン(TAD)を同定した。このドメインを欠損した株(TADΔ)を作製し、解析したところ、酸化ストレス等の環境ストレスへの感受性がやや昂進すること及びストレス応答に際しての転写プログラムの調節に部分的な異常を示すことがわかった。

また、TADΔ株では、また、Atf1 依存的な減数分裂期相同組換えが部分的に低下することが明らかになった。

いずれの場合も、TADΔ株の異常が部分的であったことから、他の要素が関与もすることが想定される。また、TAD が複数の現象に機能することが考えられた。(以上、投稿準備中)

(2)

相同組換えを活性化する Atf1-Pcr1 のヒストン修飾への影響を調べた。そのため、Atf1-Pcr1 に依存して減数分裂期に相同組換えが活性化される部位(ホットスポット)周辺とその対照部位周辺のヒストン修飾を比較した。その結果、ヒストン H3 の 9 番目のリジンが特異的にアセチル化されている(H3K9ac)ことが明らかになった。

転写を活性化する Atf1-Pcr1 のヒストン修飾への影響を調べた。そのため、酸化ストレスに曝された細胞で、Atf1 依存的に転写が活性化される *ctt1* 遺伝子のプロモーター付近に注目した。その結果、H3K9ac のみならず、ヒストン H3 の 14 番目のリジンのアセチル化、4 番目のリジンのトリメチル化(H3K4me3)も昂進していることがわかった。従って、Atf1-Pcr1 が相同組換えを活性化する際と転写を活性化する際とで、ヒストン修飾パターンが異なっていることがわかった。

(3)

(2) で述べた H3K9ac の特異的な昂進は他生物での知見(出芽酵母とマウスのホットスポットでは H3K4me3 レベルが高い)との比

較から非常に興味深い。そこで、全てのホットスポットでの H3K9ac、H3K4me3 の修飾状態を調べた(H3K14ac も参考として調べた)。その結果、Atf1-Pcr1 の結合に関わらず、8割以上のホットスポットで H3K9ac は見られたが、他の二つの修飾は有意レベルでは見られなかった。また、この修飾の生理的意義を調べるため、H3K9 をアセチル化されないアラニンに変えた変異体を作製したところ、組換え(特にその開始段階において)に異常が見られた。従って、分裂酵母では、H3K9ac が減数分裂期相同組換えに重要であることが明らかになった。

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 3 件)

1) Shintaro Yamada, Kunihiro Ohta, and Takatomi Yamada,

Acetylated Histone H3K9 is associated with meiotic recombination hotspots, and plays a role in recombination redundantly with other factors including the H3K4 methylase Set1 in fission yeast

Nucleic Acids Research (2013) vol.41 pp. 3504-3517. 査読有り

DOI10.1093

2) Tomoichiro Miyoshi, Masaru Ito, Kazuto Kugou, Shintaro Yamada, Masaki Furuichi, Arisa Oda, Takatomi Yamada, Kouji Hirota, Hisao Masai, and Kunihiro Ohta

A central coupler for recombination initiation linking chromosome architecture to S-phase checkpoint

Molecular Cell (2012) vol.47 pp.722-733 査読あり

DOI10.1016

3) Tomohiko Morita, Takatomi Yamada, Shintaro Yamada, Kouji Matsumoto, and Kunihiro Ohta

Fission yeast ATF/CREB family protein Atf21 plays important roles in production of normal spores.

Genes to Cells (2011) vol.16 pp.217-230 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

1) 山田貴富 山田真太郎 藤田侑里香 久郷和人 太田邦史

ヒストンによる減数分裂期相同組換えの開始制御機構

第 35 回日本分子生物学会年会
2012 年 12 月
福岡

2) Shintaro Yamada, Kunihiro Ohta, and
Takatomi Yamada

Histone modifications around meiotic
recombination hotspot in fission yeast
第 34 回日本分子生物学会年会
2011 年 12 月
横浜

3) Takatomi Yamada, Shintaro Yamada, and
Kunihiro Ohta

Histone modifications around meiotic
recombination hotspots in fission yeast
The EMBO Conference on Meiosis (2nd)
2011 年 9 月
イタリア カパシオペストゥム

4) 山田真太郎 山田貴富 太田邦史
分裂酵母の減数分裂期組換えに関するヒ
ストン修飾
第 44 回酵母遺伝学フォーラム
2011 年 9 月
福岡

5) 山田貴富 森田智彦 小澤高嶺 山田真
太郎 松本幸次 太田邦史
分裂酵母の ATF/CREB ファミリータンパク質
Atf21 の機能と特徴
第 33 回日本分子生物学会 第 83 回日本生
化学会合同大会
2010 年 12 月
神戸

6) 山田貴富 森田智彦 山田真太郎 松本
幸次 太田邦史
分裂酵母 ATF/CREB ファミリー転写因子 Atf21
の機能解析
第 43 回酵母遺伝学フォーラム
2010 年 9 月
奈良

7) Takatomi Yamada, Shintaro Yamada, and
Kunihiro Ohta
Histone modification pattern around
ATF/CREB-dependent meiotic recombination
hotspots in fission yeast

FASEB Summer Research Conferences, Yeast
Chromosome Structure Replication &
Segregation

2010 年 8 月
アメリカ アリゾナ州

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 貴富 (YAMADA TAKATOMI)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号 30451850

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし