

## 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20日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780093

研究課題名（和文）出芽酵母の減数分裂に必須なヒストン脱アセチル化酵素の機能解析

研究課題名（英文）Analysis of histone deacetylase function in yeast meiosis and sporulation.

## 研究代表者

湯川 格史（YUKAWA MASASHI）

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教

研究者番号：50403605

## 研究成果の概要（和文）：

減数分裂におけるヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の役割を明らかにするため、出芽酵母の減数分裂・胞子形成過程に必須な Rpd3/HDAC の機能について調査した。その結果、Rpd3 は減数分裂中期遺伝子群のプロモーター領域に作用し、転写を誘導するために転写抑制因子をプロモーターから排除することを見出した。また、Rpd3 は減数分裂中期遺伝子群の転写制御に以外にも減数分裂・胞子形成過程の複数の作用点で働く可能性を見出した。

## 研究成果の概要（英文）：

To understand the role of histone deacetylase (HDAC) during meiosis, this study analyzed the biological and molecular function of Rpd3/HDAC, which is essential for progression of meiosis and sporulation in budding yeast. The results have revealed that Rpd3 regulates the nucleosome positioning at the promoter of the middle meiotic genes and it is required for the timely removal of the transcriptional repressor Sum1 to induce their transcription. In addition to this function, the data from this study suggest the possibility that Rpd3 functions at multiple steps during meiosis and sporulation.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物学

キーワード：発生・分化、減数分裂、クロマチン、発現制御、ヒストン脱アセチル化酵素

## 1. 研究開始当初の背景

ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) とヒストンアセチル化酵素 (HAT) によって触媒される可逆的なヒストン蛋白質のアセチル化修飾はクロマチン再編の原動力の一つであり、体細胞分裂時において遺伝子の転写や修復など DNA 代謝反応制御に極めて重要な役割

を果たすことが知られていた。しかし、減数分裂時におけるヒストンアセチル化修飾の意義については不明な点が多く、これらの修飾酵素の役割や調節機構を明らかにすることは減数分裂機構を理解する上で極めて重要であると考えられた。実際にヒトやマウスではヒストン脱アセチル化が減数分裂の進

行に非常に重要であることが報告されていたが、減数分裂時の HDAC の詳細な機能については不明であった。出芽酵母で同定されている 10 種の HDAC のうち、ヒト HDAC1 ホモログである Rpd3 は体細胞分裂時において減数分裂初期遺伝子群の転写抑制に働く一方、減数分裂の進行に必須であることが報告されていた。*rpd3* 欠損株は第一減数分裂への進行に必須な *NDT80* 遺伝子をはじめとする減数分裂中期遺伝子群の転写誘導に異常を持つことが明らかにされていたが、中期遺伝子群の転写量低下と孢子形成不能の表現型の因果関係については不明であった。以前に申請者らは減数分裂初期遺伝子群の転写制御に関する研究において新たな Rpd3 の調節機構を見出していたが、さらに、Rpd3 の減数分裂進行に必須な役割に興味を持ち、*rpd3* 破壊株が減数分裂・孢子形成できない原因について明らかにしたいと考え、本研究を開始するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では、出芽酵母の *rpd3* 欠損株において減数分裂中期遺伝子群の転写が誘導されない原因や孢子形成不能の要因について詳しく調査し、減数分裂過程の進行に必須な HDAC の分子機能について新たな知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) Rpd3 による減数分裂中期遺伝子群の転写活性化機構に関する解析

*NDT80* 遺伝子をはじめとする減数分裂中期遺伝子群の転写はプロモーター領域に存在する MSE 配列によって厳格に制御されている。これら遺伝子群の転写が活性化されるためには、まず、MSE 配列を介して転写抑制に働いている Sum1 がリン酸化されて MSE 配列から解離し、抑制が解除される必要がある。さらに、Ndt80 はリン酸化されて MSE 配列に作用し、自分自身の転写をポジティブフィードバック機構によって活性化する。*rpd3* 欠損株では MSE 配列を介した転写抑制から活性化への切り換えに異常が生じている可能性が考えられたため、*sum1rpd3* 二重欠損株における減数分裂中期遺伝子群の転写を Northern 法により詳細に調べた。また、この二重欠損株の減数分裂の進行状況を核観察によって調べた。さらに、Sum1 の MSE 配列上における局在を ChIP 法によって検出し、MSE 配列から解離するタイミングを野生株と *rpd3* 欠損株で比較した。Rpd3 が MSE 配列周辺のコロマチン制御に働く可能性について検証するため、*NDT80* 遺伝子のプロモーター領域におけるヌクレオソーム構造を MNase 法により調べ、野生株と *rpd3* 欠損株で比較した。

(2) 減数分裂過程における Rpd3 の新たな作用

点に関する検証

Rpd3 が減数分裂中期遺伝子群の転写制御以外にも減数分裂・孢子形成過程の進行に必要なかどうかについて検証するため、*NDT80* を *rpd3* 欠損下で強制発現させた場合の減数分裂・孢子形成の進行について調べた。この目的のために減数分裂初期遺伝子のプロモーターを利用して *NDT80* 遺伝子を強制発現させることが可能なプラスミドを構築し、このプラスミドを *rpd3* 単独欠損株および *rpd3sum1* 二重欠損株に導入して調べた。減数分裂の進行状況は核観察により行った。

(3) 減数分裂過程における Rpd3 機能関連因子の探索

減数分裂過程において Rpd3 と遺伝学的に協調して働く因子を探索するため、*rpd3* 欠損株の孢子形成不能の表現型を過剰発現によって抑圧する因子の探索を試みた。孢子の有無をより効率的に検出するため、予め一倍体選択マーカー遺伝子 (MFA1pr-*URA3*) を導入した *rpd3* 破壊株を親株として用い、この株に酵母由来の過剰発現型遺伝子ライブラリーを導入して孢子形成条件で培養した。親株の孢子形成不能が抑圧された場合、孢子形成培地移行後の細胞をウラシル欠損培地で培養すると孢子由来の一倍体が生育することが期待される。生育した一倍体からライブラリー遺伝子を回収し、目的遺伝子の取得を試みた。

## 4. 研究成果

(1) 研究の主な成果・インパクト

まず、*sum1rpd3* 二重欠損株における中期遺伝子群の転写を詳細に調べた結果、この二重欠損株では Sum1 による転写抑制が解除されたレベルまで *NDT80* の転写量は回復したが、Ndt80 依存的な転写誘導がほとんど起こらず、*NDT80* 以外の MSE 配列を持つ中期遺伝子群の転写誘導も同様にほとんど観察されなかった。また、この二重欠損株では第一減数分裂へ進行している細胞の割合が少し増えたが、孢子形成には至らなかった。さらに、*rpd3* 欠損株では Sum1 の MSE 配列からの解離が野生株に比べて非常に遅れていることがわかった。従って、*rpd3* 欠損株では、少なくとも MSE 配列における Sum1 依存的な転写抑制の解除に異常が生じている可能性が考えられた。実際に *NDT80* プロモーター領域のヌクレオソーム構造を調べた結果、野生株では MSE 配列および TATA 配列周辺のヌクレオソームの配置が栄養増殖期 (転写抑制時) から減数分裂前中期 (転写誘導時) にかけて変化することを見出した。一方、*rpd3* 欠損株ではこのヌクレオソームの配置が既に栄養増殖期から野生株と異なること、さらに減数分裂中期の配置も野生株と異なることがわかった。従って、*NDT80* の転写誘導には減数分裂特異的なプロ

モーター領域のクロマチン再編が必要であり、Rpd3はこの再編に直接関わっているか、あるいは、この再編を保証するために予め栄養増殖期にヌクレオソームを正しく配置させている可能性が示唆された。以上の結果から、一般的に転写抑制に関わるケースが多いRpd3/HDACが、減数分裂中期遺伝子群の転写制御においてはプロモーター領域のクロマチン制御によって転写抑制因子をプロモーターから排除し、転写誘導に導くという新たな分子制御モデルを提唱することができた。

次に、*MDT80*を強制発現させることが可能なプラスミドを *rpd3sum1* 二重欠損株に導入し、この株の減数分裂・胞子形成の進行状況を調べた。その結果、このプラスミドを *rpd3* 単独欠損株に導入した場合と同様、胞子形成不能を示し、二核および四核を持つ細胞や胞子膜および胞子壁の形成が不完全な未成熟胞子の割合が以前より多く観察された。従って、Rpd3は減数分裂中期遺伝子群の転写制御以外にも減数分裂・胞子形成過程の複数の作用点で働いている可能性が高いと考えられた。

## (2)今後の展望

本研究により HDAC による新たな転写制御の一端を見出すことができたが、Rpd3 がどのように転写抑制因子を減数分裂特異的にプロモーターから排除しているのかその詳しい分子制御機構については今後の課題である。また、Rpd3 が中期遺伝子群の転写制御以外にも減数分裂・胞子形成過程において複数の作用点で働くという可能性についても更なる検証が必要であると考えられる。このため、*MDT80* 遺伝子を強制発現させた株を胞子形成条件に移した場合の減数分裂中後期遺伝子群の発現解析ならびに細胞形態観察をより詳細に行う必要があると考えられる。本研究では HDAC の減数分裂過程における機能に焦点を絞って研究を行ったが、HAT の機能についても不明な点が多いため、これらの酵素群の減数分裂特異的な働きについて今後明らかにされ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)

〔雑誌論文〕(計1件)

(1) 南部智子, 湯川格史, 土屋英子, 上野勝 (他 6 名, 8 番目), Fission yeast RecQ helicase Rqh1 is required for the maintenance of circular chromosomes., Molecular and Cellular Biology, 33 巻, 1175-1187 頁, 2013 年, 査読有, DOI: 10.1128/MCB.01713-12

〔学会発表〕(計20件)

- (1) 佐藤雅弘, 出芽酵母の経時寿命制御における Rpd3/HDAC における機能解析, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013 年 3 月 25 日, 仙台市
- (2) 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, 福岡市
- (3) 寺本勘二, 出芽酵母の経時寿命制御における Rpd3/HDAC の機能解析, 第 30 回イーストワークショップ, 2012 年 11 月 16 日, 山口市
- (4) 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第 45 回研究報告会, 2012 年 9 月 5 日, 宇治市
- (5) 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第 45 回研究報告会, 2012 年 9 月 5 日, 宇治市
- (6) 湯川格史, 出芽酵母の飢餓応答とエピソードエネティクス制御, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 25 日, 京都市
- (7) 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, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012 年 3 月 23 日, 京都市
- (8) 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, 横浜市
- (9) 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, 横浜市
- (10) 門前宏陽, 経時寿命における出芽酵母 Rpd3/HDAC の機能解析, 第 29 回イーストワークショップ, 2011 年 11 月 11 日, さぬき市
- (11) 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第 44 回研究報告会, 2011 年 9 月 6 日, 福岡市
- (12) 河村 浩, Rpd3/HDAC を介した減数分裂遺伝子 *MDT80* の転写調節機構, 酵母遺伝学フォーラム第 44 回研究報告会, 2011 年 9 月 5 日, 福岡市
- (13) 土屋英子, 出芽酵母に見る真菌類の生き残り戦略-減数分裂・胞子形成におけるクロマチン構造制御-, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 28 日, 京都市
- (14) 浅田星太郎, 減数分裂における出芽酵母 Rpd3/HDAC の機能解析, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 26 日, 京都市
- (15) 湯川格史, 酵母 Rpd3/HDAC の減数分裂における制御機構, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011 年 3 月 26 日, 京都市

(16) 三瀧 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, 神戸市

(17) 浅田星太郎, 減数分裂における出芽酵母 Rpd3/HDAC の機能解析, 第28回イーストワークショップ, 2010年11月12日, 福山市

(18) 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第43回研究報告会, 2010年9月10日, 奈良市

(19) 河村 浩, 酵母 Rpd3/HDAC の減数分裂における機能解析, 日本農芸化学会中四国支部第27回講演会, 2010年6月5日, 東広島市

(20) 三瀧 勇, 酵母 Rpd3/HDAC の減数分裂における制御機構, 日本農芸化学会中四国支部第27回講演会, 2010年6月5日, 東広島市

[その他]

ホームページ等

[http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/tsuchiya\\_lab/Top.html](http://home.hiroshima-u.ac.jp/mbiotech/tsuchiya_lab/Top.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

湯川 格史 (YUKAWA MASASHI)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・助教  
研究者番号：50403605

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：