

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710229

研究課題名(和文) 転写と共役したクロマチン制御機構の解明

研究課題名(英文) Investigation into the mechanism of transcription-coupled chromatin regulation

研究代表者

加藤 太陽 (Kato, Hiroaki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：40548418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「転写と共役したクロマチン制御」の分子機構の理解を目指して、以下の知見を得た。1) Spt6と直接相互作用する転写装置(RNAポリメラーゼII)の点変異はセントロメア周縁部のサイレンシングを「徐々に」脱抑制した。2) 同じくSpt6と直接相互作用するIws1タンパク質は、Spt6と同様に転写領域のヒストン量の維持に貢献し、転写と共役する「ヌクレオソームのずれ」を抑制する。本研究で得られた知見は、転写領域においてエピジェネティックな記憶を維持するためには、RNAポリメラーゼIIがSpt6やIws1と共に丁寧にヌクレオソームを鋳型とした転写を実施することが重要であることを示唆している。

研究成果の概要(英文)：In this study, aiming to understand the molecular mechanism of transcription-coupled chromatin regulation, we obtained following observations. 1) A point mutation of the Spt6-interacting transcription machinery RNA polymerase II gradually derepressed pericentromeric silencing that had been normal. 2) Another Spt6-interacting protein Iws1 contributes the maintenance of histone occupancy in the transcribed regions as in the case of Spt6, and represses transcription-coupled shifting of nucleosomes. These data suggest that, RNA polymerase, in conjunction with Spt6 and Iws1, need to transcribe nucleosome templates carefully, in order to maintain epigenetic memory in the transcribed region.

研究分野：総合生物

科研費の分科・細目：ゲノム科学、システムゲノム科学

キーワード：エピゲノム エピゲノム制御 転写 ヒストン ヌクレオソーム Spt6 Iws1 RNAポリメラーゼII

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物のゲノムは、ヒストンタンパク質 H2A, H2B, H3, H4 のそれぞれ 2 分子ずつで構成されるヒストン 8 量体に DNA が巻き付いたヌクレオソームと呼ばれる構造を基本単位として核内に収納されている。DNA 結合因子と DNA との相互作用はヌクレオソーム構造の有無によって制御されるため、転写等の核内イベントにおいてヌクレオソームの位置制御は極めて重要な役割を果たす。加えて、ヌクレオソーム中のヒストン分子は遺伝子座特異的な翻訳後修飾を受け、これがいわばエピジェネティックな記憶として、その遺伝子座の性質決定に寄与する。たとえば、ヒストン H3 の 9 番目のリジン (Lys-9) のメチル化はヘテロクロマチンの目印として転写抑制に貢献し、同じくヒストン H3 の 4 番目のリジン (Lys-4) のメチル化は転写活性の高い遺伝子で見られる。ヒストン H2A と H2B に比べると H3 と H4 の交換頻度は極めて低く保たれていることが知られており、ヒストン H3 と H4 は比較的長い期間、翻訳後修飾を保持するための媒体として適している。

原核生物における遺伝子の転写や、真核生物における tRNA や rRNA などの転写は、一般的にヌクレオソーム構造をとらない裸の DNA を鋳型とする。ヒストンを介したエピジェネティック制御を採用した真核生物にとっての重要な課題は、タンパク質をコードする遺伝子それ自体に翻訳後修飾を受けたヌクレオソームが存在していることである。その転写を担う RNA ポリメラーゼ II は、その記憶を喪失させることなく転写を実現しなければならない。重要なことに、RNA ポリメラーゼ II は試験管内においてヌクレオソームの位置をずらすことなく転写を実行できる。ただし、その際に H2A と H2B が解離するだけでなく、ヒストン H3 と H4 の保持も不完全であり、転写が頻繁に起きるとヒストンは DNA から解離する。このため、細胞内においては何らかの補助因子が RNA ポリメラーゼ II による転写を介添えし、ヒストンの解離を抑制すると考えられていた。

こういった背景のもと、本研究開始当初に我々が重要だと考えた因子は、RNA ポリメラーゼ II と直接的に相互作用するヒストンシャペロンである Spt6 であった。我々は、ヘテロクロマチンの維持に必須の因子として Spt6 を順遺伝学的に同定していた。本研究と並行して行われたその後の解析で、この因子がヘテロクロマチンのみならず染色体全体のヒストン修飾の維持に必須の役割を果たす事を見いだした。すなわち、*spt6* 遺伝子破壊株では、ヒストン H3 の Lys-4, Lys-9, および Lys-36 のメチル化修飾が検出できないレベルにまで低下する。部分的に活性が保たれた変異 (*spt6-K20*) をもつ細胞では、転

写レベルが高い遺伝子ほど Lys-4 のメチル化修飾が低下し、それに呼応して新規に配置されたヒストン H3 の目印である Lys-56 のアセチル化修飾が、やはり転写レベルが高いほど上昇していた。このため我々は、Spt6 は RNA ポリメラーゼ II による転写時にヒストンの脱落と交換を抑制し、それによって、遺伝子座固有のヒストン翻訳後修飾に必須の役割を果たすことを提唱している。

### 2. 研究の目的

本研究は、「転写と共役したクロマチン制御」に主要な役割を果たす Spt6 に着目しつつ、それと相互作用する因子を解析対象として機能解析を行うことで、Spt6 を中心とした制御の分子機構を理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

共免疫沈降実験によって Spt6 との相互作用が確認できた因子の中から、最も重要な因子として Rpb2 と Iws1 の 2 つを選び、細胞内におけるそれらの機能を解析した。

(1) Rpb2 は RNA ポリメラーゼ II を構成するサブユニットのひとつであり、かつて我々は、Rpb2 の点変異 (*rpb2-m203*) が RNAi 依存的なヘテロクロマチンの構築に破綻をもたらすことを報告していた。ただし、*rpb2-m203* の表現型は他のヘテロクロマチン関連変異と比べると特殊であり、その特殊性において類似した因子の順遺伝学的探索の結果として Spt6 を見つけた経緯がある。

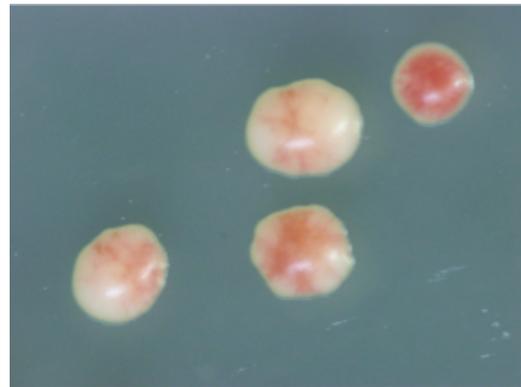


図 1. *rpb2-m203* の PEV の例

一般的なヘテロクロマチン変異の場合、野生株とのかけ合わせによって生じる子孫細胞の遺伝子型 (たとえば *clr4Δ*) と表現型 (サイレンシング脱抑制) は一致する。しかしながら *rpb2-m203* の場合、その変異をもつ子孫において必ずサイレンシングが脱抑制されるわけではなく、子孫の中には、最初からサイレンシングが脱抑制されたエピジェネティッククローンと、継代することでサイレンシングが脱抑制される、いわゆる PEV (Position effect variegation) の様相を示す

エピジェネティッククローンが存在する (図 1)。しかしながら、この 2 種が生じる仕組みは不明であった。

ここでは、RNA ポリメラーゼ II そのものが「転写と共役したクロマチン制御」に重要な役割を果たすならば、*Spt6* の失活で見られたような転写と共役して起こるクロマチン状態の変化が *rpb2-m203* 変異によっても見られるのではないかと考えた。これを遺伝学的に検証するため、野生型の *rpb2* 遺伝子 (*rpb2+*) をもつ細胞と *rpb2-m203* 細胞をかけ合わせ、子孫細胞におけるヘテロクロマチンの状態をモニタリングした。*rpb2* 遺伝子座とセントロメアヘテロクロマチンをあらかじめ固有の薬剤耐性遺伝子等でマーキングしておくことで、*rpb2* 遺伝子座の遺伝子型、およびセントロメアヘテロクロマチンの由来を把握できるようにし、ヘテロクロマチンの状態は挿入された *ade6+* 遺伝子の発現レベルで評価した (図 2)。

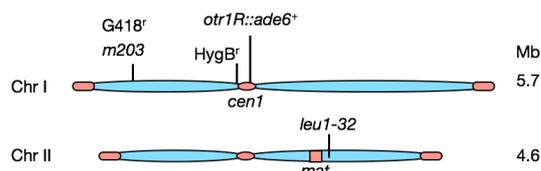


図 2. マーカー遺伝子による標識

(2) *Iws1* (Interacting with *Spt6*) は、その名前が示すとおり *Spt6* と複合体を形成するタンパク質である。この分子の機能については、どうやら細胞内で *Spt6* と共に働きたいこと、そして試験管内では *Spt6* とヒストンの相互作用を競合的に阻害する能力をもつことは知られていたが、細胞内での重要性について深く研究されていなかった。我々の調査では、ヒストン H3 の *Lys-9* の維持や siRNA 生産にある程度貢献するが、*Spt6* のように必須の役割を果たすわけではないことが判明していた。

本研究においては、*Iws1* の細胞内での機能を明らかにするために、まず、ヒストン H3 の *Lys-4* と *Lys-36* のメチル化修飾に特異的な抗体を用いたウェスタンブロッティングとクロマチン免疫沈降により、これらの翻訳後修飾の維持における *Iws1* の重要性を評価した。更に、クロマチン免疫沈降後の高速シーケンシング解析 (ChIP-seq) により、ヒストン H3 と RNA ポリメラーゼ II の分布における *Iws1* の不在による影響をゲノムワイドに調査した。ヒストン H3 の免疫沈降には Abcam 社のポリクローナル抗体を用い、RNA ポリメラーゼ II の免疫沈降にはモノクローナル抗体 4H8 を用いた。

ChIP-seq のデータ解析には、広く用いられているフリーウェアである BWA と MACS

を採用し、統計解析環境 R 上で先に構築していた解析系を更に発展させて用いた。具体的には、MACS が出力するパイルアップ形式のデータをサンプル間でノーマライズした上で、公共データベース Pombase から入手したアノテーションから各遺伝子の転写開始点と終結点を抽出し、RNA ポリメラーゼ II の結合量毎に遺伝子をグループ化した上で、転写開始点と終結点を中心としたタンパク質 (ヒストン H3 と RNA ポリメラーゼ II) の分布を調査した。また、隣り合う遺伝子の位置関係と方向性に着目して遺伝子をグループ化し、タンデムに並んだ 2 遺伝子のうち上流側の転写終結点や下流側の転写開始点、互いに逆方向に転写される 2 遺伝子の転写開始点、あるいは互いに向き合う 2 遺伝子の転写終結点を中心としたタンパク質の分布を調査した。

#### 4. 研究成果

(1) 上述の遺伝学的解析を行う上での前提として、*rpb2* 遺伝子座と野生株由来の「新しい」セントロメア (*new-cen1*) は遺伝学的にリンクしないことを確かめた (図 3)。その上で *rpb2-m203* による PEV とセントロメアの新旧の関係を調査した結果、PEV を示すエピジェネティッククローンは明らかに、*new-cen1* を保持する *rpb2-m203* 変異株であることが判明した (図 4)。

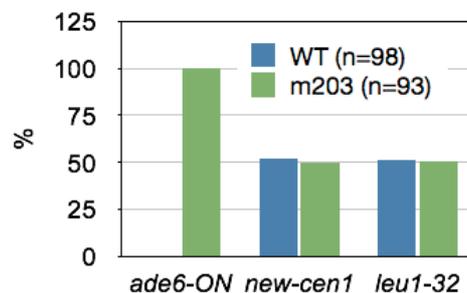


図 3. *rpb2* と *new-cen1* はリンクしない

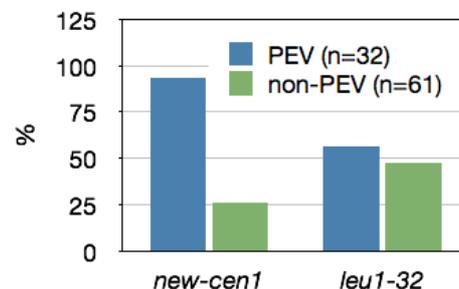


図 4. *new-cen1* と PEV はリンクする

以上の結果より、正常なヘテロクロマチンに与える *Rpb2* の点変異の影響は、その変異をもつようになってからの経過時間と関連する。サイレンシングの脱抑制は徐々に進み、一度脱抑制されると元に戻らないことから、この変異をもつことで転写と共役したクロ

マチン状態の維持が稀に失敗し、一度失われたエピジェネティックな記憶を復活させることは難しいと予想される。

(2) ウェスタンブロットイングおよびクロマチン免疫沈降による調査の結果、ヒストン H3 の Lys-4 と Lys-36 のメチル化の維持に Spt6 が必須であるのに対し、Iws1 はある程度貢献するものの必須でないことが判明した。哺乳類の Iws1 はヒストンメチル化酵素 Setd2 を転写領域にリクルートするために必要だが、どうやらその関係は分裂酵母に保存されていないらしい。哺乳類ではまた、Spt6 と Iws1 が転写産物のスプライシングに関与する報告があるが、我々の調べた範囲では、分裂酵母の Spt6 と Iws1 はスプライシングに関与しない。

ChIP-seq によるゲノムワイドなヒストン H3 の分布解析の結果、Iws1 は Spt6 と同様に、転写領域におけるヒストン量の維持に貢献することが判明した。iws1 遺伝子破壊によるヒストン H3 の減少の程度は転写レベルと相関した。重要なことに、Iws1 の貢献度は Spt6 より低く、これ故にヒストン H3 のメチル化の維持に必須ではないと考えられる。調査の過程で、iws1 の遺伝子破壊株においては遺伝子間のヌクレオソーム不在領域が曖昧になっていることを見いだした(図5:ヌクレオソーム不在領域は白)。転写開始点と転写終結点を分けて議論するため、隣り合う遺伝子の位置関係と方向性に着目して詳細な検討を行った。その結果、遺伝子間領域にお

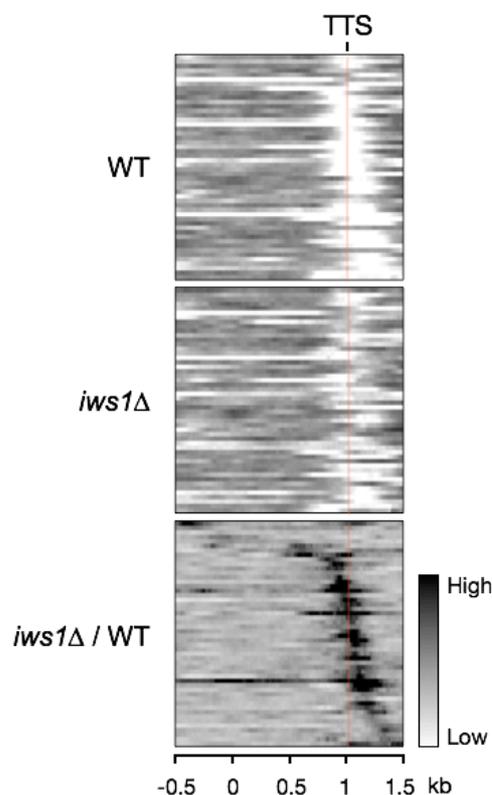


図5. 遺伝子間領域のヒストン H3 の量

けるヒストン量の増加は、タンデムに並んだ2遺伝子のうち上流側の転写終結点では見られるが下流側の転写開始点とは一致せず、互いに逆方向に転写される2遺伝子の転写開始点では見られず、互いに向き合う2遺伝子の転写終結点において観察された。個々の遺伝子について眺めた場合にもヒストン H3 の結合領域が転写終結点側に拡張していた。このことから、ヒストン H3 の結合領域は Iws1 の不在によって転写方向に向かってずれると言える。同様の結果は Spt6 の不在時にも観察された。それだけでなく、Spt6 については出芽酵母を用いた最近の研究で類似した観察結果が報告されている。このため、Spt6 は Iws1 と共に、転写時のヒストン脱落を抑制するだけでなく、ヌクレオソームを既存の場所に正確に留める役割を担っていると考えられる。以上の研究成果については、現在投稿準備中である。

つい最近、ヒトの一部のがん細胞において Spt6 タンパク質量が低下していることを示す報告があった。本研究は、我々のこれまでの研究とあわせて、転写と共役して起こるクロマチンの正常さの維持に Spt6 と Iws1 が貢献しており、それらの機能不全がゲノムワイドなエピゲノム異常を引き起こすことを示している。ゲノムのほぼすべての領域は潜在的に転写されることから、転写時にヒストンの脱落と交換を抑制することは真核生物にとって極めて重要な課題であり、分裂酵母等のモデル生物を利用した研究による「転写と共役したクロマチン制御」にかかわる各因子の本質的な役割の解明は、がん細胞で頻繁に観察されるエピゲノム異常の理解にも貢献すると期待される。

## 5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Oya E, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y and Murakami Y. Mediator directs co-transcriptional heterochromatin assembly by RNA interference-dependent and -independent pathways. *PLoS Genetics* vol.9 No.8 1003677 (2013). DOI: 10.1371/journal.pgen.1003677. (査読あり)
- ② Kato H, Okazaki K, Iida T, Nakayama J, Murakami Y and Urano T. Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3. *Scientific Reports* vol.3 2186 (2013). DOI: 10.1038/srep02186.

(査読あり)

- ③ Kato H, Okazaki K and Urano T. Spt6: Two fundamentally distinct functions in the regulation of histone modification. *Epigenetics* vol.8 No.12 1249-1253 (2013).

DOI: 10.4161/epi.26487.

(査読あり)

- ④ Kato H, Kira S and Kawamukai M. The transcription factors Atf1 and Pcr1 are essential for transcriptional induction of the extracellular maltase Agl1 in fission yeast. *PLoS One* vol.8 No.11 80572 (2013).

DOI: 10.1371/journal.pone.0080572.

(査読あり)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 加藤太陽. Spt6 は既存のヒストン H3 の転写と共役した消失を防ぎ遺伝子座特異的修飾を維持する. 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013 年 12 月 4 日, 神戸市・ポートピアホテル)

- ② Kato H. Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3. Message from Yeast to Epigenetics (2013 年 9 月 2 日, 福井県あわら市・グランディア芳泉)

[その他]

アウトリーチ活動:

出張講義講師, 第三回 理科クラブ (主催者: 飯南町教育委員会) ヒト培養細胞から抽出した DNA の観察, PCR で増幅した DNA の観察, および蛍光タンパク質 (GFP と mCherry) の観察 (2013 年 8 月 7 日, 島根県飯南町・飯南高校)

ホームページ:

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 太陽 (Kato Hiroaki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 40548418