

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25350969

研究課題名(和文) 転写活性欠失型ヒストン転写因子がもつ分子特性の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of zinc finger motif deletion mutant of histone transcription factor

研究代表者

高山 優子 (TAKAYAMA, Yuko)

帝京大学・理工学部・講師

研究者番号：90461467

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分裂酵母ヒストン転写因子Ams2のZinc finger motifは、ヒストンプロモーター結合に必須であり、Zinc finger変異型Ams2はCENP-A機能阻害を起こした。これは、N末端どうして正常型Ams2と結合してプロモーター結合を阻害することにより、ヒストン転写を抑制していることが原因であった。このN末端を介したホモ複合体は、ヒストン遺伝子の両方向性転写活性化に寄与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Ams2 is required for activation of core histone genes transcription in fission yeast. The Ams2 contains zinc finger motif, which is known as a DNA binding motif. The zinc finger motif of Ams2 is essential for bind to the histone gene promoter region. Importantly, overexpressed the zinc finger motif mutated Ams2 in CENP-A ts cells resulted in decreased cell viability. The growth defect was cause by interaction between wild-type Ams2 and zinc finger mutated Ams2. This homo-interacted Ams2 could not bind to the histone promoter, and then transcriptions of core histone genes were repressed. The homo-interacted Ams2 may contribute to bidirectional transcription of the core histone genes.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ヒストン 分裂酵母 zinc finger

1. 研究開始当初の背景

染色体の基本構造であるヌクレオソームは、染色体腕部ではヒストン H2A, H2B, H3, H4 から成るが、セントロメアではヒストン H3 の代わりに進化上高度に保存された CENP-A に置き換わり、特殊なヌクレオソームを形成している。染色体を正確に娘細胞へと分配するためには、CENP-A ヌクレオソームがセントロメアに局在することが必須である。

申請者はこれまで、分裂酵母 CENP-A のセントロメア局在機構について研究を進めてきた。分裂酵母 CENP-A は細胞周期の S 期と G2 期にセントロメアに局在化することを報告した (Takayama et al, 2008)。この S 期に起こる CENP-A のセントロメア局在化には、ヒストン転写活性化因子である Ams2 の存在が必須であることを報告した (Takayama & Takahashi, 2007)。これは、CENP-A ヌクレオソームのセントロメア局在化を促進するために Ams2 の S 期ヒストン転写活性化が必要であることを示している。そこで、Ams2 のヒストン転写作用機序について解析したところ、Ams2 タンパク質の存在時期がプロテアソーム経路を介して厳密に調節されていることを明らかにした (Takayama et al, 2010)。このタンパク質分解経路が破たんすると、Ams2 タンパク質が安定化してヒストン転写を活性化し続け、染色体の異常分配頻度が上昇することがわかった。この結果は、ヒストンの S 期転写制御は染色体安定維持に重要なシステムであることを示している。

このように Ams2 タンパク質分解は、ヒストンの S 期特異的転写を保証するだけでなく、CENP-A ヌクレオソーム形成・染色体維持にも影響を与える。よって、Ams2 分解制御を理解することは、ヌクレオソームを基本構造とする染色体構築維持の理解につながる。

そこで、Ams2 の特徴的なモチーフに変異を導入して、各変異型タンパク質の安定性と機能を調べることを本研究の目的とした。

2. 研究の目的

Ams2 の特徴的なモチーフの 1 つである Zinc finger motif に点変異を導入すると、タンパク質が安定化する。予備的実験から、Zinc finger 変異タンパク質の過剰発現は、CENP-A の機能を減弱させるような結果を得た。このことから、ヒストンの S 期特異的転写を保証する Ams2 の分解は、CENP-A の機能を維持するためにも重要な現象である可能性が出てきた。そこで本研究では、Zinc finger 変異型 Ams2 の分子特性解析を中心に、Ams2 分解とヒストンプロモーター結合の連携を調べることで新たなヒストン転写制御を見つけ出し、ヒストン転写を介さない Ams2 と CENP-A の分子関連解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) Ams2 の Zinc finger motif の存在とタンパク質分解の関連

Zinc finger 変異型 Ams2 に他のタンパク質の Zinc finger を入れ替えたキメラ Ams2Z タンパク質を作製し、タンパク質の安定性評価を行う。Ams2 zinc finger 変異タンパク質がタンパク質分解のどのステップまで機能しているのかを、分解に関わる因子の温度感受性変異株を用いて確認する。

(2) Zinc finger 変異型 Ams2 が CENP-A の機能阻害に至る分子メカニズムの解析

CENP-A 温度感受性変異株に Zinc finger 変異型 Ams2 を高発現させると許容温度条件下でも増殖阻害を示す。そこで、CENP-A 機能低下を引き起こす最少領域の絞り込みを行い、増殖阻害を引き起こす原因について CENP-A の転写量やタンパク質局在変化の解析を行う。

4. 研究成果

(1) Ams2 の Zinc finger motif の存在とタンパク質分解の関連

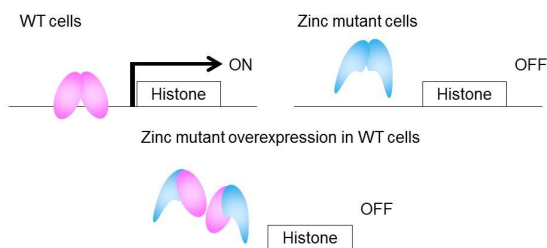
Ams2 はヒストンプロモーターに結合することが知られている。そこで、DNA 結合モチーフとして知られる Zinc finger 変異型 Ams2 のプロモーター結合活性について ChIP 解析で検討した。すると、コアヒストンプロモーターへの結合が確認できなかったため、Ams2 の Zinc finger motif はヒストンプロモーター結合に必須であることがわかった。さらに、分裂酵母 Fep1 は Ams2 同様 Zinc finger を持つ転写因子であり、結合する DNA 配列が同定されている。そこで、zinc finger 変異型 Ams2 に Fep1 の Zinc finger を付加したキメラタンパク質を、ヒストンプロモーターに Fep1 結合 DNA 配列を組み込んだ細胞株に発現させた。キメラタンパク質がヒストンプロモーター上の Fep1 結合 DNA 配列に結合するかどうかを (ChIP) 解析により確認したが、ポジティブな結果は得られなかった。Fep1 結合 DNA 配列を複数挿入してみたが、結合を確認することはできなかった。

Zinc finger 変異型 Ams2 がタンパク質分解抵抗性を示す原因を調べるために、タンパク質分解過程のどの段階で停止しているかを確認した。Ams2 はリン酸化されることによりタンパク質分解が始まることが知られている。始めに、Zinc finger 変異型 Ams2 がリン酸化されているかどうかをウエスタンブロットにより確認した。リン酸化された Ams2 は高分子側にバンドシフトが見られるが、Zinc finger 変異型 Ams2 ではそのようなバンドシフトが見られなかった。また、脱リン酸化反応を行ったが、反応の有無でバンドに変化がないことから、Zinc finger 変異型 Ams2 はリン酸化されていないことが示された。このことから、Zinc finger 変異型 Ams2 はリン酸化されないために、タンパク質が安定化していることがわかった。

(2) Zinc finger 変異型 Ams2 が CENP-A の機能阻害に至る分子メカニズムの解析

Zinc finger 変異型 Ams2 を CENP-A 温度感受性変異株に過剰発現すると、細胞増殖阻害を引き起こした。そこで、Zinc finger 変異型 Ams2 の deletion mutant を作製し、細胞増殖阻害を引き起こす領域の特定を行った。N 末端領域のみ (zinc finger motif を含まない) の過剰発現で増殖阻害を起こすことがわかった。この CENP-A の細胞増殖阻害を引き起こす、N 末端領域や Zinc finger 変異型 Ams2 を野生株で発現させると、コアヒストン遺伝子の転写量が減少することが RT-PCR により確認された。野生株では染色体上の Ams2 は正常に存在しているにもかかわらず、これらの変異型 Ams2 を過剰発現させるとヒストン転写量が減少することから、正常型 Ams2 のヒストンプロモーター結合を阻害している可能性が出てきた。そこで、正常型 Ams2 と変異型 Ams2 に異なるエピトープタグを導入し、各タグに対する抗体で ChIP 解析を行った。すると、変異型 Ams2 を過剰発現すると、正常型 Ams2 のヒストンプロモーター結合が激減することから、変異型 Ams2 により正常型 Ams2 のプロモーター結合が阻害されていることがわかった。さらに、正常型 Ams2 と変異型 Ams2 が N 末端領域でホモ複合体を形成することが yeast two hybrid および共免疫沈降解析により明らかとなった。

これらの結果から、Zinc finger 変異型 Ams2 の過剰発現により CENP-A 機能阻害を示す原因は、次のように考えられた。正常型 Ams2 は変異型 Ams2 と N 末端どうして結合し、ヒストンプロモーターから解離してしまうため、ヒストン転写が抑制される (下図参照)。これにより、CENP-A ヌクレオソーム形成のためのヒストン量が供給されないために、機能阻害を示すと考えられた。また、野生型細胞では正常型 Ams2 がホモ複



合体形成していると考えられる。ヒストン遺伝子は2つの遺伝子が head to head に存在し、中央のプロモーターから両方向に転写が進行する。二量体を形成できない Ams2 を野生株で発現させると、ヒストン転写の活性化は見られるものの、野生型で見られる最大活性を示すことができなかった。この結果は、Ams2 がホモ複合体を形成することによりヒストン遺伝子の両方向性の転写活性を効率よく行っていることを示唆している。

これらの結果を取りまとめ、論文発表した

(Takayama et al, 2016)。

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)

Takayama, Y., Shirai, M. and Masuda, F.

Characterisation of functional domains in fission yeast Ams2 that are required for core histone gene transcription. **Scientific reports** 6, 38111, 2016. (査読有) doi: 10.1038/srep38111.

[学会発表](計 15 件)

高山優子、白井均樹、増田史恵 分裂酵母ヒストン転写因子 Ams2 の分子解明 第 34 回染色体ワークショップ・第 15 回核ダイナミクス研究会 2017 年 1 月 11 日~1 月 13 日 かずさアカデミアホール(千葉県・木更津市)

中瀬由起子、高山優子、松本智裕 TSC シグナル伝達経路の室素源枯渇におけるレトロトランスポゾン *Tf2* 発現制御への役割 第 49 回酵母遺伝学フォーラム 2016 年 9 月 9 日~9 月 11 日 シーサイドホテル舞子ビラ神戸(兵庫県・神戸市)

白井均樹、高山優子 RNA 認識モチーフを持つセントロメア関連因子の機能解析 第 49 回酵母遺伝学フォーラム 2016 年 9 月 9 日~9 月 11 日 シーサイドホテル舞子ビラ神戸(兵庫県・神戸市)

高山優子、白井均樹、増田史恵 ヒストン転写を活性化させる分子機構の解明 第 33 回染色体ワークショップ・第 14 回核ダイナミクス研究会 2016 年 1 月 12 日~1 月 14 日 松島一ノ坊(宮城県・松島町)

高山優子、白井均樹、増田史恵 分裂酵母におけるヒストン転写制御の分子解明 第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 1 日~12 月 4 日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

白井均樹、高山優子 RNA 認識モチーフを持つセントロメア関連タンパク質の機能解析 第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月 1 日~12 月 4 日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

中瀬由起子、高山優子、松本智裕 室素源枯渇における TSC シグナル伝達経路のトランスポゾン発現制御への役割 第 48 回酵母遺伝学フォーラム 2015 年 8 月 31 日~9 月 2 日 広島大学東広島キャンパス(広島県・東広島市)

高山優子、白井均樹、増田史恵 分裂酵母ヒストン転写因子 Ams2 の分子解明 第 48 回酵母遺伝学フォーラム 2015 年 8 月 31 日～9 月 2 日 広島大学東広島キャンパス(広島県・東広島市)

(2)研究分担者
なし ()

研究者番号:

中瀬由起子、高山優子、松本智裕 Role of transposon expression control in TSC signaling pathway 第 8 回 International Fission Yeast Meeting 2015 年 6 月 21 日～6 月 26 日 生田神社(兵庫県・神戸市)

(3)連携研究者
なし ()

研究者番号:

高山優子、増田史恵 Homocomplex formation of Ams2 required for efficient core histone gene expression in fission yeast 第 8 回 International Fission Yeast Meeting 2015 年 6 月 21 日～6 月 26 日 生田神社(兵庫県・神戸市)

(4)研究協力者
なし ()

高山優子、増田史恵 DNA 結合欠失型ヒストン転写因子はヒストン転写を阻害する第 32 回染色体ワークショップ・第 13 回核ダイナミクス研究会 2014 年 12 月 15 日～12 月 17 日 安芸グランドホテル(広島県・廿日市市)

高山優子、増田史恵 DNA 結合欠失型ヒストン転写因子の分子特性 第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25 日～11 月 27 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

白井均樹、齋藤裕二、尾花悟志、釜谷優依、高山優子 *cnp1* 遺伝子プロモーター活性領域決定 第 37 回日本分子生物学会 2014 年 11 月 25 日～11 月 27 日 パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

高山優子、増田史恵 DNA 結合欠失型ヒストン転写因子の分子特性 第 47 回酵母遺伝学フォーラム 2014 年 9 月 1 日～9 月 3 日 東京大学農学部弥生キャンパス(東京都・文京区)

高山優子、増田史恵 DNA 結合欠失型ヒストン転写因子の分子特性 第 36 回日本分子生物学会 2013 年 12 月 3 日～12 月 6 日 神戸ポートアイランド(兵庫県・神戸市)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science_tech/bio_science/research.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

高山 優子 (TAKAYAMA, Yuko)

帝京大学・理工学部・講師

研究者番号: 9 0 4 6 1 4 6 7