

平成 30 年 5 月 29 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26291072

研究課題名(和文)ヘテロクロマチン構造の確立と維持を制御する分子機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms underlying heterochromatin assembly

研究代表者

中山 潤一(Nakayama, Jun-ichi)

基礎生物学研究所・クロマチン制御研究部門・教授

研究者番号：60373338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では分裂酵母のヒストンメチル化酵素複合体CLR4に着目し、ヘテロクロマチンの形成とユビキチン化との関連を検討した。分裂酵母からアフィニティー精製したCLR4を用いたin vitroのユビキチン化アッセイによって、CLR4がヒストンH3に対するユビキチン化活性を有することが明らかになった。さらに、ユビキチン化されたヒストンH3が実際に分裂酵母のクロマチン上に存在していること、またユビキチン化修飾の存在がメチル化酵素の活性を促進することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on Clr4 methyltransferase complex (CLR4), and investigated a functional link between ubiquitin modifications and heterochromatin assembly. Affinity purified CLR4 was shown to ubiquitylate histone H3. We further demonstrated that H3 ubiquitylation was tightly associated with H3K9me-enriched chromatin and that H3 ubiquitylation promotes H3K9 methylation by Clr4.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子 発現制御 ヘテロクロマチン 分裂酵母 ユビキチン化

1. 研究開始当初の背景

真核細胞の染色体に存在するヘテロクロマチンは、染色体の機能やゲノムの恒常性維持に必須な構造であり、その基本的な構造は酵母からヒトまで広く保存されている。ヘテロクロマチンには特徴的なヒストンのメチル化修飾 (H3K9me) が存在し、この修飾を認識するヘテロクロマチンタンパク質 HP1 を中心に高次のクロマチン構造が形成されている。分裂酵母を用いた先駆的な研究によって、このヘテロクロマチン構造の形成に RNA サイレncing (RNAi) の機構が関与していることが明らかにされていた。また遺伝学的、生化学的な解析から、ヒストン H3K9 メチル化酵素である Clr4 が、Rik1、Cul4、Raf1、Raf2 とともに CLRC 複合体を形成することが明らかにされていた。Cul4 は進化的に保存された E3 ユビキチンリガーゼの一つであることから、Clr4 の活性にユビキチン化との機能的な関連が示唆されていたが、その詳細は不明であった。

2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母のヒストンメチル化酵素複合体 CLRC の生化学的解析を進め、ヒストンのメチル化修飾とユビキチン化修飾の関係を明らかにするとともに、ヘテロクロマチン構造の確立と維持に関わる普遍的な分子機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) CLRC の構成因子である Rik1 に TAP タグを付加した分裂酵母株を作成し、アフィニティー精製によって CLRC 複合体の精製を行った。アフィニティー精製した産物について、質量分析計を用いて CLRC 複合体の各構成要素が含まれているかどうか検討した。

(2) アフィニティー精製した CLRC 複合体を用いて *in vitro* のユビキチン化アッセイ系の構築を進めた。構築したアッセイ系を応用して、候補となる基質をアッセイ系に添加し、ユビキチン化されるかどうか検討した。

(3) CLRC 複合体によってユビキチン化される基質の候補が同定できたら、分裂酵母内で実際にその基質がユビキチン化されているかどうか、クロマチン免疫沈降法によって検討した。また、基質のユビキチン化部位に変異を導入して、分裂酵母のヘテロクロマチン領域のサイレンシングが変化するかどうか検討した。

(4) 大腸菌を使ってリコンビナントの Clr4 を発現、精製した。さらに化学合成によってユビキチン化修飾を導入した基質を用いて *in vitro* のメチル化アッセイをすることで、ユビキチン化の有無が Clr4 のヒストンメチル化活性にどのような影響を与えるか検討した。

4. 研究成果

(1) PCR 断片を分裂酵母に導入し薬剤耐性マーカーを用いたスクリーニングをすることで、TAP タグを付加した Rik1 を発現する酵母株を単離した。得られた酵母株を大量培養し、タンDEMアフィニティー精製をすることで酵母細胞内から CLRC 複合体を精製した。精製したサンプルを電気泳動し、質量分析を行うことで、Cul4、Clr4、Rik1、Raf1、Raf2 の各構成因子の存在が確認されたことから、きちんと CLRC 複合体が精製できたと結論づけた。次に Rik1 を除く他の因子を欠損させた酵母株と同様に CLRC 複合体を精製したところ、Raf1、Raf2 の欠損株では Rik1 以外の因子がほとんど解離してしまったのに対して、Clr4 の欠損株では Clr4 以外の構成要素が存在していた。以上の結果より、Raf1 と Raf2 が CLRC 複合体の形成に重要な役割を果たし、Clr4 は CLRC コア複合体に弱く相互作用している構成要素であることが示唆された。

(2) 上記項目 (1) でアフィニティー精製した CLRC 複合体を使って、*in vitro* ユビキチン化アッセイ系の構築を試みた。過去の報告に従って E1、E2、ユビキチンを用意し、CLRC 複合体の有無でユビキチン化活性が認められるか調べたところ、実際にポリユビキチン化のシグナルが確認されたことから、精製した CLRC がユビキチン化活性を持つことが分かった。次に候補となる基質を使って CLRC の基質になり得るか検討したところ、ヒストン H3 が効率の良い基質になることを見出した (図 1)。質量分析によってユビキチン化されたヒストン H3 を調べることで、H3 の N 末端の複数の標的リジン残基を同定した。さらに、候補となるリジン残基に変異を入れた基質を用いてユビキチン化アッセイを行ったところ、14 番目のリジンに変異を導入した場合に、CLRC のユビキチン化活性が顕著に減少することを見出した。

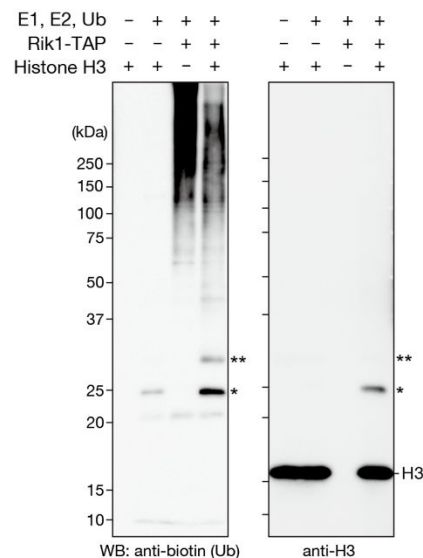


図 1. *in vitro* ユビキチン化アッセイの結果

(3) 分裂酵母の細胞内のユビキチン化状態を解析するため、ユークロマチンのマーク (H3K4me2) とヘテロクロマチンのマーク (H3K9me2) を認識する抗体を用いてクロマチンを免疫沈降し、そのサンプルを質量分析によって解析することで H3 のユビキチン化修飾の有無を解析した。その結果、H3K9me2 に対する抗体で沈降したクロマチンに、H3K14 のユビキチン化が特異的に検出されることを見出した。

ヒストン H3 をコードする *hht1+* に 3xFLAG タグを付加するための配列を導入し、FLAG タグを付加した H3 を発現する分裂酵母株を構築した。この株を用いて、抗 FLAG 抗体を用いてウェスタンブロットを行ったところ、H3 自身のシグナルに加えて泳動度の遅い 2 本のバンドが検出され、これらの泳動度はモノユビキチン化、ジユビキチン化された H3 の泳動度に相当することが分かった。さらにプラスミドを導入して GST ユビキチンを過剰発現させると、これらのバンドの移動度が変化したことから、これらのバンドがユビキチン化された H3 であると結論づけた。

この株を用いて CLRC の構成要素をコードする遺伝子の破壊株を組み合わせ、ユビキチン化 H3 に相当するバンドの変化を調べたところ、CLRC の構成要素の欠損によって、ユビキチン化 H3 に相当するバンドのシグナルが減少することが明らかになった。以上の結果より、CLRC が分裂酵母の細胞内で H3 のユビキチン化を制御していることが強く示唆された。

さらに *hht1+* に K14A 変異を導入して酵母内で発現させたところ、K14A の変異によってヘテロクロマチン領域のサイレンシング異常が観察されたことから、H3K14 がヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった (図 2)。

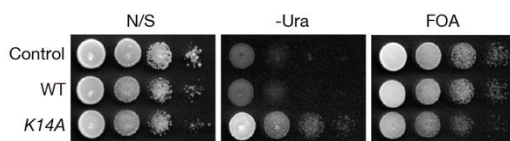


図 2 . サイレncingアッセイの結果

(4) CLRC 複合体によってユビキチン化された H3N-GST、また人工的に合成した K14 ユビキチン化 H3 を基質にして *in vitro* でメチル化アッセイを行った。その結果、ユビキチン化修飾の存在によって Clr4 のメチル化活性が促進されることを見出した。一方、H3K9me3 の存在は CLRC のユビキチン化活性にほとんど影響を与えないことが明らかになった。以上の結果から、H3K14 のユビキチン化が先に起こり、その後で H3K9 のメチル化が導入されるという段階的な分子機構の存在が示唆された (図 3)。

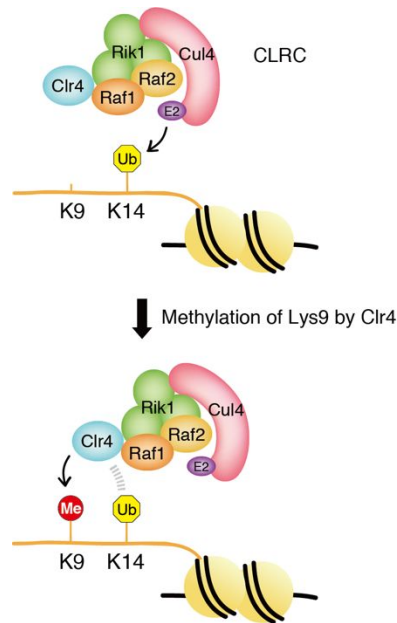


図 3 . ヒストンのメチル化とユビキチン化のクロストーク

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2件)

- (1) Atsuko Shirai, Takayuki Kawaguchi, Hideaki Shimojo, Daisuke Muramatsu, Mayumi Ishida-Yonetani, Yoshifumi Nishimura, Hiroshi Kimura, Jun-ichi Nakayama, Yoichi Shinkai, 「Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly」, *Elife*, 査読有、6、2017、e25317、DOI: 10.7554/eLife.25317
- (2) Masatoshi Mutazono, Misato Morita, Chihiro Tsukahara, Madoka Chinen, Shiori Nishioka, Tatsuhiro Yumikake, Kohei Dohke, Misuzu Sakamoto, Takashi Ideue, Jun-ichi Nakayama, Kojiro Ishii, Tokio Tani, 「The intron in centromeric noncoding RNA facilitates RNAi-mediated formation of heterochromatin」, *PLoS Genetics*, 査読有、13、2017、e1006606、DOI: 10.1371/journal.pgen.1006606

[学会発表](計12件)

- (1) Jun-ichi Nakayama, Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 on its heterochromatin assembly、12th Asian Epigenomics Meeting 2017 (招待講演)(国際学会) 2017年9月12日、グランドホテルニュー王子(苫小牧市)
- (2) 大屋恵梨子、田中万葉、西淵剛平、中

川れい子、町田晋一、胡桃坂仁志、田上英明、中山潤二、「高次クロマチン構造形成におけるヒストン修飾のクロストーク」、第39回日本分子生物学会年会(招待講演)、2016年12月2日、パシフィコ横浜(横浜市)

(3) 中山潤二、「分裂酵母におけるヘテロクロマチン構造形成の分子機構」、第89回日本生化学会大会(招待講演)、2016年9月27日、東北大学(仙台市)

(4) 大屋恵梨子、田中万葉、西淵剛平、中川れい子、町田晋一、胡桃坂仁志、田上英明、中山潤二、「分裂酵母のヘテロクロマチン形成におけるCLRC複合体の役割」、酵母遺伝学フォーラム第49回研究報告会、2016年9月11日、舞子ピラ(神戸市)

(5) Jun-ichi Nakayama、「Crosstalk between histone modifications during heterochromatin assembly」、Kick-Off Symposium in Nagoya City University 2016 "Regulatory Mechanisms of Epigenetic Information and Their Clinical Applications"(招待講演)(国際学会)、2016年2月29日、名古屋市立大学(名古屋市)

(6) 中山潤二、「ヒストンのメチル化修飾を維持する分子機構」、第3回ヒストンバリアント研究会(招待講演)、2016年2月28日、早稲田大学(新宿区)

(7) 大屋恵梨子、西淵剛平、中川れい子、田中万葉、町田晋一、胡桃坂仁志、田上英明、中山潤二、「ヘテロクロマチン構造形成におけるCLRC複合体の役割」、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13日、松島一の坊(宮城郡松島町)

(8) Jun-ichi Nakayama、「Crosstalk between histone modifications during heterochromatin assembly」、第38回日本分子生物学会年会、第88回日本生化学会大会合同大会(招待講演)、2015年12月4日、神戸ポートアイランド(神戸市)

(9) Jun-ichi Nakayama、「Crosstalk between histone modifications during heterochromatin assembly」、Forefront of Chromosome Biology(招待講演)、2015年8月10日、京都大学(京都市)

(10) Eriko Oya、Mayo Tanaka、Gohei Nishibuchi、Reiko Nakagawa、Shinichi Machida、Hitoshi Kurumizaka、Hedeaki Tagami、Jun-ichi Nakayama、「Crosstalk between histone modifications during heterochromatin assembly」、The 8th International Fission Yeast Meeting、2015年6月22日、生田神社(神戸市)

(11) 中山潤二、「高次クロマチン構造の形成と維持の分子機構」、2014年度 遺伝研研究会(単細胞の増殖メカニズムの先端的研究)(招待講演)、2015年3月24日、国立遺伝学研究所(三島市)

(12) 中山潤二、「分裂酵母における高次クロマチン構造の形成と維持の分子機構」、

2014年度 遺伝研研究会(クロマチンによるゲノムDNAの機能発現メカニズム)(招待講演)、2014年10月30日、国立遺伝学研究所(三島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 潤一 (NAKAYAMA JUN-ICHI)

基礎生物学研究所・クロマチン制御研究部門・教授

研究者番号：60373338