

平成 29 年 5 月 17 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26440001

研究課題名(和文)クロマチン高次構造を制御するヒストンシャペロン

研究課題名(英文)Histone chaperone regulates higher order chromatin structure

研究代表者

高畑 信也(Takahata, Shinya)

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：50381588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本課題ではヒストンシャペロンの中でもFACTによるクロマチン制御機構の解明を掲げた。プロテオミクス解析からFACTをクロマチン上にリクルートする因子Pdr1、HP1、Fip1を同定してFACTとの共役によって起きるクロマチン構造変化を解析した。Pdr1は薬剤排出系を活性化する転写因子だがこのPdr1はFACTを介してプロモータークロマチンを一過的に緩締することが明らかとなった。HP1はヘテロクロマチン形成因子として知られるがFACTを通じてヌクレオソームの安定化を行うことが明らかとなった。Fip1はCnpA/H3の境界付近でヘテロクロマチン依存的サイレンシングに関わる事が明らかとなった。

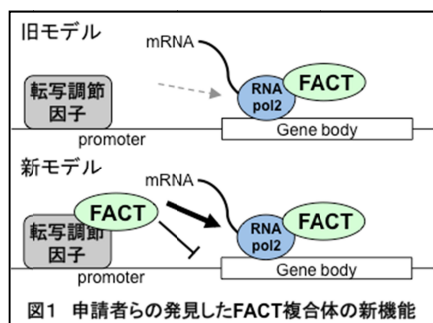
研究成果の概要(英文)：Histone chaperones cooperatively function for chromatin structure regulation. In this project, we have clarified the mechanism of chromatin regulation by FACT complex. From proteomics analysis, Pdr1, HP1, and Fip1 were identified as FACT associating factors, and chromatin structural changes caused by conjugation with FACT were analyzed. As Pdr1 is a transcription factor that activates the xenobiotics elimination system, it became clear that this activator for the efflux pump system transiently evicts the nucleosome from the promoter chromatin, and reorganizes chromatin structure via FACT. HP1 (Heterochromatin Protein 1) is known as a platform of heterochromatin forming factors. Our analysis revealed that it stabilizes the nucleosome octamer through the physical interaction with FACT complex at histone H3K9 methylated loci. Fip1 analysis is currently underway. Our data related to chromatin silencing was obtained near the boundary of CnpA / H3 at the pericentromeric heterochromatin.

研究分野：エピゲノム

キーワード：Pdr1 FACT HP1 Spt16 Pob3 Swi6 Histone H3K9me

### 1. 研究開始当初の背景

真核生物にとって DNA の介在する生命現象には必ずクロマチン制御が関わる。近年の目覚ましい研究進展で数多くのクロマチン制御因子が同定されその機能解析がなされているが多くの場合、クロマチン因子はクロマチンを抑制する機能と活性化する機能の両方を併せ持っており解析は容易ではない。申請者はクロマチン因子の中でも強力なヒストンシャペロン活性を持ちクロマチンリモデリングを行う因子、FACT (Facilitate Chromatin Transcription) 複合体の機能について解析を行って来た。HeLa 細胞から FACT 複合体が単離された当初(Orphanides et al, Cell 1998)、この複合体は RNA polymerase II に結合して効率的に転写伸長を行う為に必要な因子であると考えられていたが(図1)、申請者らはFACT複合体がRNA polymerase II の存在していない遺伝子プロモーター領域にも結合する事を発見し、特定の転写調節因子とFACTとの物理的な相互作用機構を解明し、細胞周期に依存して発現調節される遺伝子プロモーターとFACTの共役機構を解明した(Takahata S. et al, Mol Cell 2009)。



申請者らが明らかにしたFACT結合活性を持つ転写調節因子の1つは細胞周期 G1/S のチェックポイントで機能するE2Fの出芽酵母ホモログ SBF/MBF でありFACT複合体に依存した細胞周期制御メカニズムは大きな驚きを持って迎えられた(Takahata S. et al, EMBO J 2009, F1000 Selected)。

出芽酵母や分裂酵母は単細胞一倍体の生物であるが高等真核生物に近いクロマチン制御機構を有しており酵母を用いた研究はクロマチン研究分野の先駆けとなってきた。特に分裂酵母のヘテロクロマチンはRNAiに依存したヘテロクロマチン高次構造を持ちこれは高等真核生物にも保存されている。このような理由で酵母はエピジェネティックな遺伝学的解析に極めて有効であり、本研究課題においてもモデル生物として出芽酵母と分裂酵母を適宜使い分ける。

### 核内レセプター様転写制御因子 Pdr1 による薬剤排出機構

核内レセプターは生体反応に重要な役割を果たすがその機構系は複雑でクロマチン制御レベルでの解明は急務である。我々が出芽酵母の核内レセプター様転写因子 Pdr1 がリ

ガンド結合時に活性型に変化して Mediator (Thakur et al, Nature 2008)、および FACT と強く相互作用する事を Anders Naar 博士との共同研究で発見した。これはヒトの抗がん剤排出機構と非常に似ており、酵母の場合 ABC(ATP-Binding Cassette)輸送体型の薬剤排出ポンプをコードする遺伝子群は Pdr1 の制御下にあり排出反応は極めて迅速である。本研究課題ではこの迅速な薬剤排出反応における FACT の役割の全容解明を目指す。

### ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 によるヌクレオソーム安定化機構

ヘテロクロマチンは極めて強力に遺伝子を発現抑制するクロマチン高次構造体でありヒストン H3 の9番目のリジン (H3K9) のメチル化とそれに結合するヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) に依存して形成される。我々の分裂酵母を用いた先行研究から FACT と HP1 の結合が生体内、試験管内の両方において確認されている。また我々の遺伝学的解析結果はFACTがヘテロクロマチン依存的なサイレンシングに大きな役割を果たす事を示唆しており、その分子機構全容の解明を目指す。

### 転写制御因子 Fip1 によるヒストン遺伝子転写制御機構

我々はFACT結合因子精製から数十の候補因子を同定した (unpublished data)。中でも非常に強く結合する Fip1 (FACT interacting protein) はヒストン遺伝子の転写調節因子として働く事が報告されている。真核生物のヒストン遺伝子の G1 後期 / S 期にかかる発現は極めて厳密に制御されるがその発現・抑制機構に関しては不明である。本課題ではヒストン遺伝子プロモーター上での Fip1 と FACT の細胞周期依存的クロマチン制御機構の全容解明を目指す。

### 2. 研究の目的

本研究課題では3つの独立した研究テーマを設定するがそのすべてはFACT複合体によるクロマチン構造 ON/OFF 切替え分子機構に関連する計画である。特に弛緩型から抑制型にクロマチン構造を変えるFACT複合体の活性については現時点で解析がほとんど手つかずとなっており、ここには国際的に見ても際立った学術的特色・独創性があると言える。申請者らが行った ChIP-sequencing 結果からFACTは染色体をグローバルに制御する因子であることが明らかとなっている。これは我々が2009年に予測したRNA polymerase II に依存しない形でのFACT複合体作動モデルと合致している。FACTは種を超えて広く保存されたクロマチン制御因子であり本課題を推進することで種を通じた普遍的クロマチン制御機構の解明に繋がる事が予測される。

### (1) 核内レセプター様転写制御因子 Pdr1 による薬剤排出機構

本研究では出芽酵母をモデル生物として用いる。細胞への薬剤取込み前から転写因子 Pdr1 (pleiotropic drug resistance) は薬剤排出ポンプ遺伝子のプロモーター上に結合している。ここに薬剤分子がリガンドとして結合し Pdr1 が活性型に変化すると転写に必須な Mediator と FACT が結合し転写が活性化され薬剤の排出が起こる。特筆すべきは核内の薬剤排出に伴って迅速に転写が抑制される事であり、この現象を利用すると FACT が転写のシャットオフに果たす役割をクロマチンレベルで解析する事ができる。

加えて FACT 変異がクロマチン除去・再構築機構に及ぼす影響解析を行う。Pdr1 制御下にある遺伝子は薬剤添加後 5 分程で転写が活性化され十数分後には転写が抑制され始める。この迅速な反応は Galactose 代謝における GAL 遺伝子クラスタのものと同レベルであり生体内でのクロマチン高次構造の迅速な変動が起きていることが予測される。この反応はクロマチン制御因子 FACT 変異株では転写活性化と低下のタイミングがともに大きく遅れる。この時のクロマチン状況を ChIP-qPCR 法にてモニターして FACT によるクロマチン制御機構を解明する。

### (2) ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 によるヌクレオソーム安定化機構

ヘテロクロマチンは極めて強力に遺伝子を発現抑制するクロマチン高次構造体でありヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) のメチル化とそれに結合するヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) に依存して形成される。我々の分裂酵母を用いた先行研究から FACT と HP1 の結合が生体内、試験管内の両方において確認されている。また我々の遺伝学的解析結果は FACT がヘテロクロマチン依存的なサイレンシングに大きな役割を果たす事を示唆しており、その分子機構全容の解明を目指す。加えて FACT に依存して形成されるヘテロクロマチンと核内「場」の関係を蛍光顕微鏡観察で解析する。

### (3) 転写制御因子 Fip1 によるヒストン遺伝子転写制御機構

我々は分裂酵母を用いた FACT 結合因子精製実験から数十の候補因子を同定した。中でも非常に強く結合する Fip1 (FACT interacting protein 1) は HIV ウィルスに由来する強力な転写因子 Tat の酵母アナログであり、出芽酵母ではヒストン遺伝子の転写調節因子として働く事が報告されている。真核生物のヒストン遺伝子の G1 後期 / S 期にかかる発現は極めて厳密に制御されるがその発現・抑制機構に関しては不明である。本課題ではヒストン遺伝子プロモーター上での Fip1 と FACT の細胞周期依存的クロマチン制御機構の全容解明を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 核内レセプター様転写制御因子 Pdr1 による薬剤排出機構

細胞への薬剤取込み前から Pdr1 (pleiotropic drug resistance) は薬剤排出ポンプ遺伝子のプロモーター上に結合している。ここに薬剤分子がリガンドとして結合し Pdr1 が活性型に変化すると転写に必須な Mediator と FACT が結合し転写が活性化され薬剤の排出が起こる。特筆すべきは核内の薬剤排出に伴って迅速に転写が抑制される事であり、この現象を利用すると FACT が転写のシャットオフに果たす役割をクロマチンレベルで解析する事ができる。

Pdr1 と FACT の結合様式の解明：Pdr1 と FACT がリガンドとなる薬剤依存的に結合するが、それぞれの結合表面に関しては不明である。これを生化学的に決定して互いの結合を切る変異体を得る事を目指す。

FACT 変異がクロマチン除去・再構築機構に及ぼす影響解析：Pdr1 制御下にある遺伝子は薬剤添加後 5 分で活性化され十数分後には転写が抑制され始める。FACT 変異株では転写活性化と低下のタイミングがともに大きく遅れる。この時のクロマチン状況を ChIP-qPCR 法にてモニターして FACT によるクロマチン制御機構を解明する。

PDR 制御遺伝子の核内ポジショニング解析：PDR 制御遺伝子のように一過的な転写上昇が極めて重要な遺伝子はその核内の配置もまた厳密な制御を受ける。Pdr1 制御遺伝子プロモーター上に LacI-GFP テサリングを行い、蛍光顕微鏡下で薬剤処理時の動態観察を試みる。このとき FACT 変異でも動態観察を行い、クロマチン動態制御と核内ポジショニングの関係性を調べる。

### (2) ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 によるヌクレオソーム安定化機構

分裂酵母のヘテロクロマチンは高等真確生物同様に RNAi に依存して形成されその形成・維持ステップは極めて複雑である。またヘテロクロマチン形成・維持には多彩なタンパク質群が含まれそれらの機能的相互作用の解明はクロマチン制御研究分野にとって急務となっている。本課題で特筆すべきはヘテロクロマチン維持に既存のメカニズムとは全く違った形で FACT が関わっている点にあり、その分子メカニズムはクロマチン研究の新基軸に成長しうると予測される。

HP1 と FACT の結合様式の解明：ショウジョウバエの HP1 と FACT の相互作用が報告されているが (Kwon et al, Genes Dev 2010)、我々はそれとは全く異なる形式での HP1 と FACT の相互作用を分裂酵母で発見したが、それぞれの結合表面に関しての詳細は不明である。これをイーストツーハイブリッド法にて決定し、最終的に点変異を導入して互いの結合を切る変異体を単離する事を目指す。

FACT 変異でヘテロクロマチンが崩壊する分子メカニズムの解明：我々はヘテロクロマチン内でレポーター遺伝子が強力にサイレンシングされる系を用いて遺伝学的解析を進めている。その系を用いた解析でヘテロクロマチン依存的サイレンシングが脱抑制する FACT 変異株を単離している。非常に興味深い事にこの FACT 変異株ではヒストン H3K9 のメチル化レベル HP1 の結合レベル共に野生型と変わらない。この事実はヘテロクロマチン依存的サイレンシング機構に未だ知られていない未知の機構が存在している事を示唆している。FACT はヒストン H2A/H2B シャペロンである事から FACT 変異株におけるヒストン H2A/H2B のダイナミクス解析を ChIP-qPCR 法にて行い、この未知のサイレンシング機構を分子レベルで解明する。

#### (3) 転写制御因子 Fip1 によるヒストン遺伝子転写制御機構

FACT 複合体相互作用因子の精製実験から我々は Fip1 を単離した。Fip1 は HIV ウィルスに由来する強力な転写因子 Tat の酵母アナログで、酵母内ではヒストン遺伝子のプロモーターに結合して細胞周期依存的な転写制御 (ON/OFF 切換え) を行う事が報告されている。本計画では Fip1 と FACT の共役的な転写制御機構をクロマチンレベルで解明する事を目指す。

*fip1* 遺伝子破壊株の作成と FACT 変異株とのエピスタシス解析：分裂酵母の *fip1* 遺伝子を破壊して表現型解析を行う。特にヒストン遺伝子プロモーターへの結合が報告されている事から細胞周期に関連する表現型 (温度感受性、HU 感受性、TBZ 感受性等) を重点的に調べ、手持ちの FACT 変異とのエピスタシス解析を行う。

Fip1 と FACT の結合様式の解明：1-①のケースと同様に Fip1 と FACT はともに転写活性可能を有する為にイーストツーハイブリッド法による相互作用解析に不向きである。故にリコンビナントタンパク質を発現させて Fip1 と FACT のデリーションアルレルを作成して生化学的に結合表面を決定し、両者の相互作用を切る変異体を作成する。またこの変異を細胞内に導入して遺伝学的解析から FACT の機能を探る。

ChIP-sequencing によるヒストン遺伝子プロモーター以外への Fip1 結合領域の検索：Fip1 はヒストン遺伝子のプロモーター上に結合して FACT と共役して転写制御 (ON/OFF 切換え) に関わっている事が報告されている。加えてその他のヒストンシャペロン因子との結合も報告されておりクロマチン境界線形成に重要な役割を果たす事が予測されている (Fillingham et al, Mol Cell 2009)。染色体上でヒストン遺伝子プロモーター以外にもクロマチン境界線は数多く存在しており、その領域への Fip1 局在を網羅的に解析する

為に Fip1 の ChIP-sequencing を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 核内レセプター様転写制御因子 Pdr1 による薬剤排出機構

外因性化学物質としてステロール生合成経路を阻害する Ketokonazole を含んだ培地上で出芽酵母を生育させた時に PDR1 遺伝子欠損株、FACT 変異株、メディエーター変異株が強い生育阻害を示すことを見出した。転写活性化因子 Pdr1 は薬剤排出ポンプを活性化させるために必要な最上流因子であることから FACT とメディエーターが同一経路で働いていることを想定して Pdr1 のプロテオミクス解析を行い、Pdr1 に FACT とメディエーターが直接結合することを見出した。Pdr1 制御下にある PDR5 遺伝子の詳細なプロモーター解析を行ったところ TATA ボックス周辺のクロマチン構造の緩みは FACT 非依存的、メディエーター依存的に起きるが再構成は FACT 依存的、メディエーター非依存的に起きることが明らかとなった。以上の結果は転写の ON/OFF を行うときにメディエーターと FACT を使い分けていることを示唆している。

##### (2) ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 によるヌクレオソーム安定化機構

分裂酵母を用いて FACT のプロテオミクス解析を行ったところ分裂酵母ヘテロクロマチンタンパク質として知られる Swi6 を同定した。生化学的解析を行いどのような分子モードによって Swi6 と FACT が結合しているかを解析したところ FACT 構成因子の Spt16 と Swi6 のクロモシャドウメインが静電的に相互作用していることが明らかとなった。FACT はかなりグローバルにクロマチン上で働くが特に H3K9me 依存的に形成されるヘテロクロマチン上でサイレンシングを行っている因子であることが明らかとなった。FACT と Swi6 の染色体上への局在を ChIP-seq で解析したところ、H3K9me 化が顕著なヘテロクロマチン領域に加えて遺伝子の転写終結点近傍に H3K9me 非依存的な Swi6 と FACT の局在が観察された。HP1 ホモログである Swi6 はクロモドメインを介して H3K9me を認識すると考えられているが我々の研究結果は未知のメカニズムによって HP1 が染色体上に結合する可能性があることを示唆している。

##### (3) 転写制御因子 Fip1 によるヒストン遺伝子転写制御機構

分裂酵母を用いて FACT のプロテオミクス解析を行ったところ AAA-タイプの ATPase として知られるタンパク質を同定し Fip1 と名付けた。分裂酵母株の *fip1+* 遺伝子破壊株を作成して表現型解析を行ったところ弱いヘテロクロマチン弛緩様表現型を観察した。データベースを調べたところ Fip1 には相同性の高いタンパク質 Fip2 が存在することが明らか

となりヘテロクロマチン上で重複して機能している可能性が示唆された。fip1 遺伝子と fip2 遺伝子の二重変異体の単離と遺伝学的解析は今後の課題となる。

#### 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 5 件)

Shota Suzuki, Yota Murakami, Shinya Takahata, H3K36 methylation state and associated silencing mechanism. *Transcription*, 査読有, Vol.8, 2017, 36-31  
DOI:10.1080/21541264.2016.1246076.

Yoshie Tange, Yuji Chikashige, Shinya Takahata, Kei Kawakami, Masato Higashi, Chie Mori, Tomoko Kojidani, Yasuhiro Hirano, Haruhiko Asakawa, Yota Murakami, Tokuko Haraguchi, Yasushi Hiraoka, Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. *Genes Cells*, 査読有, Vol.21, 2016, 812-832  
DOI:10.1111/gtc.12385.

Shota Suzuki, Hiroaki Kato, Yutaka Suzuki, Yuji Chikashige, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Kimura, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Shinya Takahata, Yota Murakami, Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. *Nucleic Acids Res.*, 査読有, Vol.44, 2016, 4147-4162  
DOI:10.1093/nar/gkw008.

Shota Suzuki, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Yota Murakami, Shinya Takahata, A novel method for purification of the endogenously expressed fission yeast Set2 complex. *Protein Expr Purif.*, 査読有, Vol.97, 2014, 44-49  
DOI: 10.1016/j.pep

Warren P. Voth, Shinya Takahata, Joy L. Nishikawa, Benjamin M. Metcalfe, Anders M. Näär, David J. Stillman, A Role for FACT in Repopulation of Nucleosomes at Inducible Genes. *PLoS One*, 査読有, Vol.9, 2014, e84092  
DOI: 10.1371/journal.pone.0084092.

〔学会発表〕(計 8 件)

Shinya Takahata, Shota Suzuki, Aoi Ohnuma, Saori Chida, Yota Murakami, HP1 and FACT cooperatively regulate global gene expression. The International Conference on Transcription Cycle 2016、東京大学理学部小柴ホール、東京都文京区、12/3、2016

高畑信也、鈴木詔大、村上洋太、H3K9me 非依存的に働く HP1/Swi6 の解析、転写サイ

クル班会議 2016、松島一の坊、宮城県宮城郡松島町、9/5-6、2016

鈴木詔大、加藤太陽、高畑信也、村上洋太、分裂酵母における H3K36 メチル化酵素 Set2 依存的サイレンシング機構に関する研究、転写サイクル班会議 2016、松島一の坊、宮城県宮城郡松島町、9/5-6、2016

高畑信也、大沼葵、村上洋太、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 と結合する FACT の相互作用領域の解析、第 38 回日本分子生物学会、ポートアイランド、兵庫県神戸市、12/1-4、2015

Shinya Takahata, Saori Chida, Yota Murakami, Roles of FACT for heterochromatic silencing in fission yeast、The 40<sup>th</sup> Naito Conference Epigenetics、シャトレーゼガトーキングダム、北海道札幌市、9/15-18、2015

Shinya Takahata, Saori Chida, Yota Murakami, Roles of FACT for heterochromatin regulation in fission yeast、The 8<sup>th</sup> International Fission Yeast Meeting、生田神社、兵庫県神戸市、6/21-26、2015

高畑信也、千田早織、村上洋太、FACT 複合体によるクロマチンサイレンシングの分子機構、転写サイクル冬の若手ワークショップ、伊香保温泉松本楼、群馬県渋川市、2/5-7、2015

高畑信也、千田早織、村上洋太、FACT 複合体によるクロマチンサイレンシングの分子機構、第 32 回染色体ワークショップ、第 13 回書くダイナミクス研究会合同開催、安芸グランドホテル、広島県廿日市市、12/15-17、2014

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~bo/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

高畑 信也 (TAKAHATA, Shinya)  
北海道大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号：50381588

(2) 研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
なし