

平成 21 年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19580107

研究課題名 (和文) 出芽酵母ヒストン脱アセチル化酵素の活性制御機構

研究課題名 (英文) Studies on the regulation mechanism of histone deacetylase in *Saccharomyces cerevisiae*

研究代表者

土屋 英子 (TSUCHIYA EIKO)

広島大学・大学院先端物質科学研究科・教授

研究者番号：90127671

研究成果の概要：

ヒストンの脱アセチル化酵素 (HDAC) が細胞内での活性制御機構の解明は、生物学的に重要な問題であると同時に有効な HDAC 阻害剤開発にも必要である。我々は、ヒト HDAC1 と相同性の高い出芽酵母の Rpd3 が標的遺伝子の活性化時に広く阻害を受けることを見出した。酵母ゲノムライブラリーからこの阻害に働く遺伝子をスクリーニングし、2 種の遺伝子がこの活性を持つことを明らかにできた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・応用生物化学

キーワード：細胞応答

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体は、ヒストン 8 量体に DNA が約 2 回巻きついたヌクレオソームを基本として、高度に折りたたまれた構造を持つ。従って遺伝子の転写制御にはヒストン分子の修飾や、クロマチン構造再編因子による染色体構造の変換が重要な意味を持つ。近年の研究により、プロモーター領域での、ヒストン分子アミノ末端リジン残基の高アセチル化状態が転写活性化に、逆に低アセチル化状

態が転写抑圧に強く関与していることが明らかになっている。前者の状態はヒストンアセチル化酵素、後者はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) の作用によって形成される。現在までにこれら酵素 (多くは多数のタンパク質からなる複合体として存在する) の細胞増殖や分化における転写制御へのかかわりや、酵素複合体の構造と機能に関する研究は精力的に行われ、多くの知見が得られている。しかし、細胞内でこれらの酵素がどのように調

節されているのかについての知見は極めて少なく、特にHDACについては、実際にその酵素活性の調節に基づいた転写制御系が存在するかということも分かっていない。我々はお芽酵母の減数分裂開始を支配する遺伝子の1つ、*IME2* の転写活性化においてプロモーターに局在したHDAC (Rpd3-Sin3複合体) の酵素活性の阻害が、HDACが結合するヌクレオソームのヒストンアセチル化の上昇を引き起こし、これにより転写因子Ime1とクロマチン再編因子RSCが呼び込まれてTATA領域のクロマチン構造が開いた状態となり、転写を開始することを見出した(Mol.Cell. Biol., 2007)。我々の今回の発見は、HDACの活性制御に基づくこれまでに例のない新しい転写制御機構の存在を示唆するものであり、どのような機構でHDAC活性の阻害が起こるのかという問題の解明は、真核細胞の転写制御を理解する上で極めて興味深い研究課題であるといえる。ヒトにおいて無秩序なHDACの活性発現が細胞のガン化と強く関連することが明らかになっており、現在HDAC阻害剤は極めて有効な制癌剤として開発が進められている。しかし現在知られているHDAC阻害剤は、真核細胞内に存在する多数種のHDACに対して基の質特異性が低く、化学療法剤として使用するうえで問題が残されている。基質特異性の高い阻害剤の開発のためには、細胞内でのHDACの活性調節機構を知ることが必要と考えられる。したがって、本研究で得られる知見は、細胞内でのHDAC活性調節機構の解明という学術的意義に加え、特異性の高いHDAC活性抑制のための手法開発へ向けて大きな手がかりを与えると期待される。

## 2. 研究の目的

減数分裂初期遺伝子 *IME2* は減数分裂期のみ発現し、体細胞分裂期にはプロモーター上の *URS1* と呼ばれる配列に結合した Rpd3-Sin3 複合体の HDAC 活性により転写が抑制されている。前述のように我々はこの *URS1* 配列上に転写活性化時にも Rpd3-Sin3 複合体が結合しており、本遺伝子の発現に必須なヒストンのアセチル化上昇が HDAC 存在下に起こることを見出した。URS1 配列は

*IME2* のような減数分裂初期遺伝子だけでなく、*INO1* などの代謝系の遺伝子にも存在する。そこで本研究では、

(1) 減数分裂初期遺伝子以外の *URS1* を持つ遺伝子でも転写活性化時において HDAC の局在下にヒストンアセチル化が起こるのかをまず明らかにし、

(2) この HDAC 阻害に働く細胞内因子の同定のためのスクリーニング系確立、スクリーニングの実施と因子の同定を目的とした。

## 3. 研究の方法

お芽酵母 W303 株を用い、本菌で常用されている分子遺伝学的手法を用いて行った。

## 4. 研究成果

(1) 転写活性化時における HDAC 活性制御の普遍性の検証

*URS1* は減数分裂遺伝子以外の遺伝子上流にも存在する。*IME2*—*URS1* のヒストン H3 アセチル化上昇は酢酸を炭素源とする培地中 (YPA) で起こるため、網羅遺伝子発現解析のデータベースから HDAC に依存した転写抑制を受け YPA で転写が活性化される 8 種の遺伝子を選抜し、これらについて YPD および YPA 培地で培養した細胞を用いて *URS1* 近傍の H3 アセチル化と HDAC の局在を調べた。この結果、すべての遺伝子で HDAC 存在下に H3 アセチル化が起こっていることを見出した。一方、ヒストンアセチル化酵素 *Gcn5* のこれら遺伝子の *URS1* への安定な局在化は観察されなかった。したがってこれらの結果は、*URS1* に結合した HDAC の活性が転写活性化時に抑制されヒストンアセチル化が上昇する現象は、減数分裂初期遺伝子だけでなく、*URS1* を持つ遺伝子で普遍的に起こっていることを示唆していた。そこで HDAC を免疫沈降で回収し、YPD から YPA さらには胞子形成培地への移行に伴う HDAC 活性の経時的変化について検討した。現在 Rpd3-Sin3 複合体には他の構成因子が異なる 2 つの複合体、RPD3L と RPD3S が存在することが知られており、このうちプロモーターでの転写調節に働くのは RPD3L であることが分かっている。このため RPD3L 複体に特異的なサブユニットの Sds3 に

FLAG タグを付加し、抗 FLAG 抗体による免疫沈降で RPD3L 複合体を精製し比活性が変化するかを調べた。この結果、RPD3L 複合体の比活性が YPA と孢子形成培地移行初期に低下することが分かった。さらに興味深いことに Sds3 のリン酸化がこの時期に起こることを見出した。現在、Sds3 のリン酸化と HDAC 活性の変化との関連について調べている。

次にこのような HDAC のプロモーター上での恒常的局在は遺伝子発現の再抑制に重要である可能性が考えられたため、*INO1* 遺伝子をモデルとして検討を加えた。YPA 培地で発現誘導した細胞にグルコースを加え、経時的な *INO1* 発現量ならびに ORF への RNA ポリメラーゼ II の結合量の変化を野生型株と *rpd3* 破壊株で比較した結果、いずれの量の減少も両株で変化は観察されず、HDAC は転写再抑制には寄与しないことが分かった。しかし *rpd3* 破壊株では *INO1* 発現誘導時に野生型株の約 2 倍量 RNA ポリメラーゼ II が ORF に結合しており、mRNA の発現は野生型株の約 18 倍に達していた。このことは、HDAC 複合体が転写抑制だけでなく適切な発現量の調節にも働いている可能性を示唆していた。以上の結果は Biosci. Biotech. Biochem. 誌に公表した (発表論文 (1))。

(2) HDAC 活性調節にかかわる細胞内因子の同定

*IME2* のプロモーターの下流に *HIS3* 遺伝子を挿入したレポーター遺伝子は HDAC の作用によって発現が抑制されるため、この遺伝子をどう持つ *his3* 株はヒスチジンを欠く最小培地 (-His 培地) では生育できない。しかし遺伝子量の増加により HDAC 阻害因子を多量に発現させれば生育可能になることが期待される。そこでこのレポーター遺伝子を作製し、*RPD3 his3* 株と *rpd3Δ his3* 株に導入し検討したが、後者の形質転換体の -His 培地での生育が極めて悪く、スクリーニングには適切でないと判断された。そこで、(1) の研究で *IME2* と同様の HDAC の挙動が確認された *INO1* プロモーターでレポーター遺伝子を作製し検討した結果、*RPD3* の欠損に依存し

た形質転換体の -His 培地での生育が確認できた。そこでこの株に多コピー遺伝子ライブラリーを形質転換して得られた、約 30 万の形質転換株から 19 の候補遺伝子を選抜した。これらの候補遺伝子について *RPD3* に依存したものであるかをさらに詳細に検討を加えた結果、最終的に 2 種の候補が得られた。配列解析と遺伝子切り詰め実験の結果これらは *RAD53*、および *STT4* 遺伝子であることを明らかにした。現在、これらが直接的に HDAC 阻害に働くかについて検討を加えている。

## 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 3 件)

(1) Rpd3/HDAC complex is present at the URS1 cis-element with hyperacetylated histone H3. M. Yukawa; K. Yo; H. Hasegawa; M. Ueno, and Eiko Tsuchiya, Biosci. Biotech. Biochem., 73, 378-384 (2009) (査読有).

(2) A bisaborane sesquiterpenoid endoperoxidase, 3,6-epidioxy-1,10-bisaboladiene isolated from *Cacalia delphiniflora* possesses anti-tumore activity with the induction of apoptosis, K. Nishikawa, N. Aburai, K. Yamada, H. Koshino, E. Tsuchiya and K. Kimura, Biosci. Biotech. Biochem., 72, 2463-2466 (2008) (査読有).

(3) Interplay between chromatin and trans-acting factors on the *IME2* promoter upon induction of the gene at the onset of meiosis. T. Inai, M. Yukawa and E. Tsuchiya, Mol. Cell. Biol., 27, 1254-1263 (2007) (査読有).

[学会発表] (計 12 件)

(1) 釜谷和興、ヒストン脱アセチル化酵素制御因子の探索、日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、福岡市

(2) 湯川格史、出芽酵母のヒストン脱アセチル化酵素複合体による新たな転写タイミング調節機構、日本農芸化学会大会、2009 年 3 月 29 日、福岡市

(3) 土屋英子、出芽酵母の転写制御における HDAC の新たな機能、第 26 回染色体ワークショップ、2009 年 1 月 28 日、姫路市

(4) 楊一幸、出芽酵母における HDAC を介した転写調節機構、日本分子生物学会年会・2008 年 12 月 9 日、神戸市

(5) 小林義史、出芽酵母のヒストン脱アセチル化酵素複合体による新たな転写調節機構の解析、日本分子生物学会年会・2008 年 12 月 9 日、神戸市

(6) 長谷川裕章、出芽酵母の減数分裂開始時における HDAC の活性制御に関する研究、日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 28 日、名古屋

(7) 湯川格史、出芽酵母の HAT/HDAC を介した転写切り替え機構の解析、日本農芸化学会大会、2008 年 3 月 28 日、名古屋市

(8) 土屋英子、出芽酵母の数分裂開始時における HDAC の活性制御、第 25 回染色体ワークショップ、2008 年 1 月 31 日、熱海市

(9) 湯川格史、出芽酵母のヒストン脱アセチル化酵素複合体による新たな転写タイミング調節機構、日本分子生物学会年会・2007 年 12 月 9 日、2007 年 12 月 12 日、横浜市

(10) 楊一幸、HAT/HDAC を介した転写切り替えの分子機構、日本分子生物学会年会、2007 年 12 月 12 日、横浜市

(11) 長谷川裕章、出芽酵母の減数分裂開始時における HDAC の活性制御に関する研究、日本分子生物学会年会、2007 年 12 月 12 日、横浜市

(12) 湯川格史、Regulation of the transcriptional activation of the IME2 gene, 第 23 回 Yeast Genetics and Molecular Biology 国際学会、2007 年 7 月 3 日、オーストラリア メルボルン市

〔図書〕(計 2 件)

(1) 微生物増殖学の現在・未来 (福井作蔵・秦野琢之編) 地人書館 pp149-157 総ページ数 478 頁 (2008 年 10 月) (分担執筆)

(2) 酵母のすべて (大隅良典、下田親編) シュプリンガー・ジャパン pp.42-49 総ページ数 348 頁 (2007 年 9 月) (分担執筆)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

土屋 英子 (TSUCHIYA EIKO)  
広島大学大学院先端物質科学研究科・教授  
研究者番号：90127671

### (2) 研究分担者

### (3) 連携研究者