

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 4日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657005

研究課題名（和文）分裂酵母を用いた条件的ヘテロクロマチン制御の解析

研究課題名（英文）Formation of facultative heterochromatin in fission yeast

研究代表者

石川 冬木 (ISHIKAWA FUYUKI)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：30184493

研究成果の概要（和文）：

分裂酵母を用いて条件的ヘテロクロマチンの確立に関する分子機構を明らかにした。分裂酵母は、セントロメアやテロメアなどの構成的ヘテロクロマチンの研究によく用いられていたが、細胞状態によって生じたり失われる条件的ヘテロクロマチンをもつか否かは不明であった。我々は、まず、*mei4* および *ssm4* における H3K9me が、細胞が栄養増殖をするときに存在し、減数分裂および孢子形成時には失われ、ふたたび栄養増殖を開始すると再確立することを示し、分裂酵母が条件的ヘテロクロマチンをもつことをはじめて明らかにした。次に、これらの条件的ヘテロクロマチンの確立に必要な因子の探索を行い、すでに、*mei4* および *ssm4* 遺伝子 mRNA の分解に必要であることが知られている蛋白質因子 Mmi1 と mRNA 上のシス配列 DSR が必要であることを示した。これらの結果から、mRNA 分解経路である DSR-Mmi1-Red1 が分裂酵母条件的ヘテロクロマチンの確立を行うことが結論された。

研究成果の概要（英文）：

We have studied the molecular mechanism of facultative heterochromatin formation in fission yeast. We first demonstrated that the fission yeast meiotic genes, *mei4* and *ssm4* loci are heterochromatinated, as evidenced by the presence of histone H3 methylated at lysine 9 (H3K9me), in vegetative growth. This heterochromatin marker disappears upon the entry of cells into meiotic cell cycle. We then revealed that the Mmi1-degradation machinery of *mei4* and *ssm4* mRNA transcript is required for the establishment of H3K9me when cells enters vegetative growth phase. Moreover, we found that DSRs, a set of mRNA regions included in *mei4* and *ssm4* transcripts, are required for the Mmi1-dependent heterochromatin establishment. These results shed an insight into our understanding of how heterochromatin is formed in eukaryotes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、遺伝・ゲノム動態

キーワード：遺伝学、ゲノム、発現制御、発生・分化、エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスとは、ゲノム DNA の存在様式を変化させることで遺伝子機能を制御することをさし、細胞が分化機能を記

憶する機構として注目されている。ヘテロクロマチンは、エピジェネティクスによって規定されるクロマチンの一形態で、そこに存在する遺伝子は転写が抑制され、ヒストン

H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9me) などに代表されるヘテロクロマチン特異的なヒストンや DNA の修飾が存在することが知られている。ヘテロクロマチンには、セントロメアやテロメアなど、全ての細胞において常にヘテロクロマチン状態にある構成的ヘテロクロマチンと、細胞の分化状態や環境変化によってヘテロクロマチン状態と非ヘテロクロマチン状態の間は可逆的に変化する条件的ヘテロクロマチンの 2 種類がある。多細胞生物において、細胞が分化するにつれて、その分化細胞が発現を必要としない遺伝子領域ではヘテロクロマチンが誘導され、準安定に遺伝子発現を抑制する。一方、分化細胞が初期発生や iPS 細胞化などにより未分化状態となる場合には、そのような分化特異的ヘテロクロマチンは消去される。このように、細胞が未分化状態から特定の細胞系譜に分化するにあたって、条件的ヘテロクロマチン形成は重要であるが、その誘導機構の詳細は明らかではない。その理由の一つとして、遺伝学的解析の容易さゆえに、クロマチン研究に大きな貢献をしてきた酵母において、条件的ヘテロクロマチン現象が十分に検討されてこなかった点にある。

2. 研究の目的

分裂酵母のヘテロクロマチン蛋白質の分布は、米国の Grewal らのグループによってゲノムワイドの詳細が報告されている。従来、分裂酵母は、テロメア、セントロメア、性決定遺伝子座に構成的なヘテロクロマチンを形成している一方、多細胞真核生物の条件的ヘテロクロマチンは存在しないと思われてきた。我々は、これまでに、減数分裂誘導の鍵となる遺伝子 *mei4* および *ssm4* は、栄養増殖下ではヘテロクロマチンを形成して、H3K9me をもち、その遺伝子発現抑制に寄与していると考えられるのに対して、減数分裂誘導刺激を受けた場合には H3K9me が失われてヘテロクロマチン構造が消去され、胞子の発芽に伴って栄養増殖を再開するとヘテロクロマチンを再構成する分裂酵母の条件的ヘテロクロマチンに相当することを見出してきた。本研究は、このような我々が独自に開発したモデル系を用いて、エピジェネティックスの消去機構について遺伝学的・生化学的な解析を行い、未分化性獲得の仕組みに迫ることを目的としている。

3. 研究の方法

分裂酵母は、*h* と *h*' の性をもち、栄養源が豊富な環境では、これらの半数体細胞が活発に栄養増殖を行うが、環境の変化がキューとなり、接合・減数分裂・胞子形成が誘導され、環境が改善されると胞子が発芽して栄養増殖を再開する。この胞子形成過程は、窒素源

枯渇などの減数分裂誘導刺激後、ほとんどの細胞において同期して進行するので、その間のクロマチンの変化を追跡して解析するには非常に適している。我々は、減数分裂誘導に関わる遺伝子が栄養増殖ではヘテロクロマチン構造をとる一方、減数分裂誘導時に急速にヘテロクロマチン構造を消去して遺伝子発現を活性化し、胞子が発芽する際に再びヘテロクロマチンを再確立することを世界にさがけて観察している。本研究では、このような我々が開発した分裂酵母の条件的ヘテロクロマチン実験系を用いて研究を行う。

4. 研究成果

まず、*mei4* および *ssm4* における H3K9me が、細胞が栄養増殖をするときに存在し、減数分裂および胞子形成時には失われ、ふたたび栄養増殖を開始すると再確立することを示し、分裂酵母が条件的ヘテロクロマチンをもつことをはじめて明らかにした。次に、これらの条件的ヘテロクロマチンの確立に必要な因子の探索を行い、すでに、*mei4* および *ssm4* 遺伝子 mRNA の分解に必要なことが知られている蛋白質因子 Mmi1 と mRNA 上のシス配列 DSR が必要であることを示した。さらに、近年、Mmi1 と相互作用をすることが報告された Red1 が H3K9 メチル化を行うメチル化酵素 Clr4 と相互作用をすることで H3K9me 生成に必要なことを見出した。以上の結果は、mRNA 分解経路である DSR-Mmi1-Red1 が分裂酵母条件的ヘテロクロマチンの確立を行うことを示しており、今後、同様の分子機構が高等真核生物で機能するか否かを明らかにすることで、高等真核生物の条件的ヘテロクロマチン制御の解明に資することができると考えられた。

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 10 件)

(1) Tashiro, S., Asano, T., Kanoh, J., and Ishikawa, F., Transcription-induced chromatin association of RNA surveillance factors mediates facultative heterochromatin formation in fission yeast. *Genes to Cells*, 査読有、18 巻、2013、327-339

ODI: 10.1111/gtc.12038

(2) Tanimura, N., Saito, M. Ebisuya, M., Nishida, E., and Ishikawa, F., Stemness-related Factor Sall4 Interacts with Transcription Factors Oct-3/4 and Sox2 and Occupies Oct-Sox Elements in Mouse Embryonic Stem Cells. *The Journal of*

Biological Chemistry, 査読有、288 巻、2013、5027-5038、
ODI:10.1074/jbc.M112.411173M112.411173
[pii]
(3) 中岡秀憲、石川冬木、新しいテロメア蛋白質複合体 CST、医学のあゆみ、査読無、241 巻、2012、846-851、
URL:http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=924111&AC=11601
(4) 鍋谷彰、石川冬木、テロメラーゼ非依存性テロメア維持機構と疾患、医学のあゆみ、査読無し、241 巻、2012、853-859、
URL:http://www.ishiyaku.co.jp/magazines/ayumi/AyumiArticleDetail.aspx?BC=924111&AC=11602
(5) Chujo, M. Tarumoto, Y. Miyatake, K. Nishida, E., and Ishikawa, F., HIRA, a conserved histone chaperone plays an essential role in low-dose stress response via transcriptional stimulation in fission yeast. The Journal of Biological Chemistry, 査読有、287 巻、2012、23440-23450、
ODI:M112.349944[pii]10.1074/jbc.M112.349944
(6) Hirai, Y., Masutomi, K., and Ishikawa, F., Kinetics of DNA replication and telomerase reaction at a single-seeded telomere in human cells. Genes to Cells, 査読有、17 巻、2012、186-204、
ODI: 10.1111/j.1365-2443.2012.01581.x
(7) Yamazaki, H., Tarumoto, Y., and Ishikawa, F., Tel1ATM and Rad3ATR phosphorylate the telomere protein Ccq1 to recruit telomerase and elongate telomeres in fission yeast., Genes & Development, 査読有、26 巻、2012、241-246、
ODI: 26/3/241[pii]10.1101/gad.177873.111
(8) Nakaoka, H., Nishiyama, A., Saito, M., and Ishikawa, F., Xenopus laevis Ctc1-Stn1-Ten1 (xCST) complex is involved in priming DNA synthesis on singlestranded DNA template in Xenopus egg extract. The Journal of Biological Chemistry, 査読有、287 巻、2012、619-627、
ODI:M111.263723[pii]10.1074/jbc.M111.263723
(9) Muraki, K., Nabetani, A., Nishiyama, A., and Ishikawa, F., Essential roles of Xenopus TRF2 in telomere end protection and replication. Genes to Cells, 査読有、16 巻、2011、728-739、
ODI: 0.1111/j.1365-2443.2011.01520.x

[学会発表] (計 22 件)

- (1) 石川冬木「老化分子機構の多義性」国際高等研究所第 2 回「老いを考える」研究会、2013 年 2 月 2 日 (京都府、国際高等研究所)
- (2) 石川冬木「テロメアと染色体組換え」平成 24 年度「がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動」公開シンポジウム、2013 年 1 月 30 日 (東京都、学術総合センター 一橋記念講堂)
- (3) 石川冬木「細胞老化における NF-kappaB 経路の役割」第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 12 月 13 日 (福岡県、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡)
- (4) Fuyuki Ishikawa「Chromosomal rearrangements in fission yeast with dysfunctional telomeres」日仏がんワークショップ、Nov 30, 2012 (徳島県、グランドエクシブ鳴門)
- (5) 石川冬木「高校生のためのがん研究入門」がん研究の現在・未来、2012 年 11 月 17 日 (石川県、金沢歌劇座)
- (6) 石川冬木「CST Complex in Telomere DNA Replication」Keystone Symposia Aging and Diseases of Aging (S2)、2012 年 10 月 25 日 (東京都、シェラトン都ホテル東京)
- (7) 石川冬木「テロメアと発癌」第 74 回日本血液学会学術集会、2012 年 10 月 19 日 (京都市、国立京都国際会館)
- (8) 石川冬木「がん細胞を標的にする」第 20 回日本癌学会市民公開講座「がん先端研究とがん治療の現在・将来」、2012 年 9 月 22 日 (北海道、札幌市民ホール)
- (9) Fuyuki Ishikawa「Telomere dysfunctions and chromosome instability」第 71 回日本癌学会学術総会、2012 年 9 月 20 日 (札幌市、ロイトン札幌)
- (10) 石川冬木「テロメアの複製と DNA 組換え」第 14 回生命科学研究所シンポジウム、2012 年 7 月 11 日 (京都市、京都大学芝蘭会館)
- (11) 石川冬木「テロメアの生化学：テロメアは DNA 損傷チェックポイント分子が好きか嫌いかわか？」生化学会北陸支部集会、5 月 26 日 (金沢市、金沢歌劇座)
- (12) 石川冬木「テロメラーゼによるテロメア DNA 伸長機構」第 49 回日本臨床分子医学会学術集会、2012 年 4 月 14 日 (京都市、みやこめっせ)
- (13) Sanki Tashiro, Tomohiro Asano, Junko Kanoh, and Fuyuki Ishikawa「mRNA elimination system directs the formation of facultative heterochromatin in fission yeast」The 6th International Fission Yeast Meeting、June 28, 2011、(Simmons Main Campus Building, USA)
- (14) Fuyuki Ishikawa「Conserved molecular architectures of telomere chromatin in

eukaryotes」第34回日本分子生物学会年会、2011年12月14日(横浜市、パシフィコ横浜)

(15) Fuyuki Ishikawa

「Molecular mechanisms of controlling telomerase reaction in fission yeast」日仏がんワークショップ、Nov 22, 2011 (Mercure Hotel, Montpellier, France)

(16) Fuyuki Ishikawa 「Highly conserved molecular architectures of telomeres in eukaryotes」日米がん研究協力事業ワークショップ、2011年10月25日(京都市、京都ホテルオークラ)

(17) Fuyuki Ishikawa

「Telomere Dysfunction and Genetic Instability」第70回日本癌学会学術総会、2011年10月4日(名古屋市、名古屋国際会議場)

(18) 石川冬木 「テロメアの維持機構とテロメア短小化症候群」第14回間質性肺炎細胞分子病態研究会、2011年8月20日(東京都、シェーンバウハ・サボール(砂防会館))

(19) 石川冬木 「ヒストン修飾 mRNA 分解」第13回生命科学研究所シンポジウム、2011年7月7日(京都市、京都大学芝蘭会館)

(20) Fuyuki Ishikawa 「How do telomeres sense their length?」第9回京都大学・国立台湾大学合同「分子細胞生物学シンポジウム」、2011年6月4日(京都市、京都大学吉田構内 総合人間学部棟)

(21) 石川冬木 「細胞老化：持続的炎症をもたらす生体防御反応」第11回日本抗加齢医学会総会、2011年5月27日(京都市、国立京都国際会館)

(22) Yugo Hirai, Michihito Wakai, Kenkichi Masutomi, and Fuyuki Ishikawa: The sequence of events at a single human telomere in S phase. *Telomeres and Telomerase*, May 3, 2011 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, USA)

[図書] (計1件)

(1) 石川冬木 (分担翻訳) 宮園浩平、石川冬木、間野博行監訳、*メディカル・サイエンス・インターナショナル*、*デヴィータがんの分子生物学*、2012、544

[その他]

ホームページ等

石川研究室ホームページ

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/labs/fish/>

京都大学大学院生命科学研究科

ホームページ

<http://www.lif.kyoto-u.ac.jp/j/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 冬木 (ISHIKAWA FUYUKI)

京都大学・大学院生命科学研究科・教授

研究者番号：30184493

(2) 研究分担者

樽本 雄介 (TARUMOTO YUSUKE)

京都大学・大学院生命科学研究科・助教

研究者番号：70551381