

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658281

研究課題名(和文) エタノール発酵責任遺伝子群の新規エピジェネティック制御機構の解明と応用展開

研究課題名(英文) Study on epigenetic regulation of genes responsible for ethanol fermentation

研究代表者

原田 昌彦 (Harata, Masahiko)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70218642

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：出芽酵母のアクチン関連タンパク質(Arp)であるARP6遺伝子を欠損させ、エタノール発酵関連遺伝子の遺伝子発現変化と、遺伝子の空間配置の変化を解析した。また、Arp6を人為的に結合したクロマチンが核膜孔複合体に結合すること、ヒストンバリエントH2A.Zを人為的に結合したクロマチンが核膜タンパク質Mps3に結合することを明らかにし、これらの核膜タンパク質が遺伝子の細胞核内の空間配置に関与することを示した。

研究成果の概要(英文)：We deleted the budding yeast ARP6 gene and analyzed the expression of genes responsible for ethanol fermentation and spacial localization of genes in the nucleus. We also analyzed the spacial localization of a chromatin regions to which Arp6 or a histone variant H2A.Z was artificially bound. Using chromatin immunoprecipitation assay, it was shown that Arp6-bound chromatin bond to nuclear pore complex and that H2A.Z-bound chromatin bonds also to Mps3, a nuclear membrane protein. These observations suggests that these nuclear membrane proteins have roles in the spatial arrangement of genes, including ones for ethanol fermentation.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：エピジェネティック クロマチン 転写

## 1. 研究開始当初の背景

出芽酵母のゲノムはヒストンと共にクロマチンを形成し、さらに細胞核内の適切な空間に配置されている。このようなクロマチン構造と遺伝子の核内空間配置によって、遺伝子はエピジェネティック制御を受けている。例えば、酵母遺伝子の適切な活性化あるいは不活性化に、遺伝子の核膜近傍への配置が必要であることが知られている。出芽酵母のエタノール発酵には解糖系や TCA 回路/呼吸系の多くの遺伝子が関与しているが、これらはグルコース濃度環境によって厳密に制御され、それが酵母のエタノール発酵能を決定する。すなわち高グルコース環境では、解糖系遺伝子が高発現し、一方で TCA 回路・呼吸系遺伝子が抑制されて、グルコースからエタノールが効率よく生産される。しかし、低グルコース環境では、遺伝子発現パターンが逆転し、エタノールが分解・代謝される。これらの遺伝子の発現変化はダイオキシシフトと呼ばれ、これにはエピジェネティック制御が深く関与することが予想されているが、その詳細は不明である。申請者は、アクチンの進化的なファミリーであるアクチン関連タンパク質(actin-related protein; ARP)の一つである Arp6 が、遺伝子を核膜近傍に配置することで、遺伝子の活性化や不活性化を制御することを明らかにした(*PLoS Genet.*, 2010)。マイクロアレイ解析により、arp6 変異株では低グルコース環境でのダイオキシシフトが抑制されていることが示唆された。すなわち、arp6 変異株では低グルコース環境でも発酵が続き、エタノール分解が抑制されている可能性が示された。

## 2. 研究の目的

以上に述べた発見に基づき、本研究では、arp6 変異株におけるエタノール発酵能を詳細に解析すると共に、Arp6 を介した遺伝子の核内空間配置によって、発酵責任遺伝子群がどのように制御されているかについて解析を行った。

エタノール発酵に関する遺伝子のエピジェネティック制御の知見は非常に限られているが、本研究により、それに関する新規な機構の解明が可能となる。その結果は、発酵産業やバイオエタノール生産などに重要な知見を与え、産業的に応用できる可能性も非常に高い。

出芽酵母のエタノール発酵に関わる遺伝子群の発現を人為的に制御し、発酵能を改変することができれば、発酵産業やバイオエタノール生産における有用性は極めて大きい。

我々は、アクチンファミリーのメンバーであるアクチン関連タンパク質(actin-related protein; 以下 Arp と略称)を研究し、Arp のいくつかの分子種が、細胞核に局在してエピジェネティック制御機構に関与していること

を世界に先駆けて明らかにしてきた(*PNAS*, 1994; *Mol Biol Cell*, 1995, 1999; *Nucl Acids Res*, 2002, 2004, 2007, 2010; *Curr Biol*, 2008 など)。最近の申請者の解析により、そのうちの一つ Arp6 の機能を失った酵母株では、低グルコース環境下でもダイオキシシフトが抑制されていることが示唆された。注目すべきは、解糖系・TCA 回路・呼吸系の遺伝子のほとんどが arp6 変異によって影響を受けていることであり、これは、転写因子の発現の変化だけでは説明がつかず、これらの遺伝子を包括的に制御するエピジェネティック制御機構が変化したことを示唆している。これまで、エタノール発酵能のエピジェネティック制御の解析に適した実験系少なかったが、arp6 変異株を用いた実験系によってその解明が可能となる。これより、多数の遺伝子を同時に制御するエピジェネティック制御機構が明らかにできる。また、その知見は酵母の産業利用においても非常に重要である。

最近の研究から、遺伝子の発現制御におけるエピジェネティック機構の重要性が明らかになっている。細胞核内での遺伝子の空間配置はエピジェネティクスの分子基盤の一つであり、この機構は多数の遺伝子を同時に制御する上で好都合である。ダイオキシシフトでは、解糖系、TCA 回路、呼吸系などを含む多数の遺伝子が一斉に制御され、これまでの結果から、Arp6 を介したエピジェネティック制御がダイオキシシフトに関与する可能性が高い。この機構が解明されることは、エタノール発酵だけでなく、製薬、食品、栄養などの分野において、異種タンパクを酵母で生産する際にも、重要な基盤知見となると考えた。

## 3. 研究の方法

Arp6 による遺伝子の核内空間配置がエタノール発酵に及ぼす影響とその機構を解明し、その応用展開を図るために、以下の方法により計画により研究を遂行した。

### (1) arp6 変異株のエタノール発酵能・グルコース分解能の詳細な解析

低グルコース環境においても、arp6 変異株では、TCA 回路/呼吸系のほとんどの遺伝子が野生株に比べて抑制され、逆に解糖系遺伝子は活性化していることがマイクロアレイの結果によって示されている。また予備的な実験から、標準培地で arp6 変異株を長期に培養した際にエタノール濃度の変化が観察されている。そこで、グルコース濃度、エタノール濃度、温度などを変化させた様々な環境下で arp6 変異株を培養し、経時的にエタノール濃度、グルコース濃度を測定する。特に低グルコース濃度でのエタノール発酵に注目して解析を行った。

### (2) 発酵責任遺伝子の細胞内空間配置とその

## 変化の解析

申請者のこれまでの解析から、遺伝子の核膜近傍への空間配置に Arp6 が関与することが明らかになった(*PLoS Genet*, 2010)。したがって、マイクロアレイで検出された *arp6* 変異株での発酵責任遺伝子の発現変化には、これらの遺伝子の核内空間配置の変化が寄与している可能性がある。そこで、lac リプレッサー/オペレーターシステムを利用して、これらの遺伝子を可視化して観察することにより、グルコース濃度に依存したこれらの遺伝子の空間配置の変化や、*arp6* 変異に伴う変化を解析した。lac リプレッサー/オペレーターのシステムについては、海外共同研究者である Susan Gasser より技術的な支援を受けた。また、このシステムに対して抗 GFP 抗体を用いた免疫電顕法によっても、遺伝子の核内配置を解析する。特にこの方法では、核膜に存在する核膜抗複合体と遺伝子の位置関係についても注意して観察を行った。これについては、海外共同研究者の Pavel Hozak とともに解析を行った。

### (3) Arp6 の発酵責任遺伝子への結合の解析

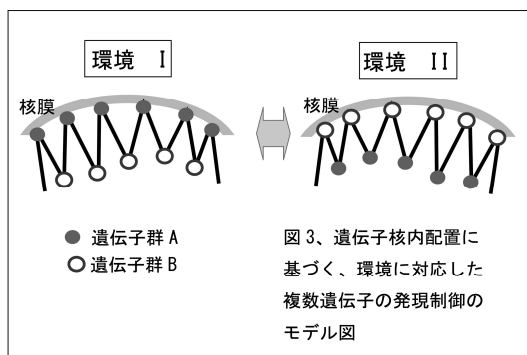
これまでの予備的な実験により、Arp6 がいくつかの発酵責任遺伝子に結合していることを既に示している。そこで、クロマチン免疫沈降(chromatin immunoprecipitation; ChIP)を用いて、さらに詳細に、Arp6 のこれらの遺伝子への結合と、グルコース濃度による変化を観察した。Arp6 がこれらの遺伝子に結合する機構や、その結合が変化する機構を明らかにする目的で、すでに作成している抗 Arp6 抗体を用いて Arp6 複合体を精製し、質量分析によって複合体の構成因子の同定を試みた。

この実験は当研究室の大学院生と共に遂行され、さらに海外共同研究者として、スイスの Susan Gasser およびチェコの Pavel Hozak を加えた研究体制を組織して研究を遂行した。

## 4. 研究成果

### (1) 発酵関連遺伝子の細胞内空間配置とその変化の解析

これまでの解析によって、Arp6 が核膜近傍への遺伝子の空間配置に必要であることが示されている(下図)。



これを受けてマイクロアレイを行い、発酵関連遺伝子の発現変化を確認した。さらに遺伝子の空間配置の変化が寄与する可能性について検証した。そのために、クロマチン免疫沈降や、遺伝子の可視化などにより、グルコース濃度に依存したこれらの遺伝子の空間配置の変化を解析した。また、*arp6* 変異に伴うこれらの遺伝子の空間配置の変化を解析した。その結果、グルコース濃度、および *arp6* 変異によって、核内空間配置が変化する可能性のある遺伝子を複数同定することに成功した。また、lac0 システムを用いて、核膜に局在する核膜孔複合体と遺伝子の位置が一致するかどうかについて解析を行った。その結果、部分的な一致が観察され、これらの遺伝子の核膜上でのターゲットの一つが核膜孔複合体であることが示された。

### (2) Arp6 の発酵関連遺伝子領域への結合の解析

以前の研究代表者の実験により、Arp6 がいくつかの発酵関連遺伝子に結合することが明らかにされていた。そこで、クロマチン免疫沈降 (chromatin immunoprecipitation; ChIP) 法を用いて、さらにこの結合についてその詳細やメカニズムについて解析を行った。その結果、解析した遺伝子の多くで、Arp6 がヒストンバリエント H2A.Z と共に結合していることが示された。H2A.Z をクロマチンに人為的に結合させて、このクロマチンの核内の空間配置を可視化して解析した。その結果、H2A.Z の結合したクロマチンが、核膜孔複合体に結合して核膜近傍に配置されることに加えて、核膜タンパク質の一つ、Mps3 に対しても結合していることが観察された。この結果は、クロマチンに結合した Arp6 が H2A.Z と協調することによって、核膜孔複合体だけでなく Mps3 をもターゲットとしてクロマチンの核内配置に影響を与えることを示している。また、H2A.Z の変異によっても発酵関連遺伝子の発現に変化が観察された。これらの結果から、Arp6 が H2A.Z と協調することによってこれらの遺伝子の空間配置を核膜近傍に変化させ、これがこれらの遺伝子の協調的な制御に関わることが示唆された。

## 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 8 件)

Konishi, T. and Harata, M. Improvement of the transformation efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* by altering carbon sources in pre-culture. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* (in press) (査読有り)  
doi:未定

Ui A, Ogiwara H, Nakajima S, Kanno S, Watanabe R, Harata M, Okayama H, Harris CC, Yokota J, Yasui A, Kohno T. Possible involvement of LKB1-AMPK signaling in non-homologous end joining. *Oncogene* 33, 1640-1648 (2014)(査読有り)  
doi: 10.1038/onc.2013.125.

Maruyama, E.O., Hori, T., Tanabe, H., Kitamura, H., Matsuda, R., Tone, S., Hozak, P., Habermann, F.A., von Hase, J., Cremer, C., Fukagawa, T., Harata, M. The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei. *J Cell Sci* 125, 3739-3743 (2012) (査読有り)  
doi: 10.1242/jcs.103903

北村大志、原田昌彦「高次エピゲノムと核骨格」細胞工学 31, 894-900 (2012) (査読無し)  
doi: なし

Oma, Y., Harata, M. Actin-related proteins localized in the nucleus: from discovery to novel roles in nuclear organization. *Nucleus* 2, 38-46 (2011) (査読有り)  
doi: 10.4161/nucl.2.1.14510.

〔学会発表〕(計 36 件)

原田昌彦「細胞核内構造体の構築原理と高次生命機能」アクチンファミリーによる細胞核・クロマチンの機能構造形成、第86回日本生化学会大会シンポジウム、2013年9月11日(横浜)(招待講演)

Masahiko Hatata “Actin family proteins involved in the functional organization of the nucleus” 23th Wilhelm Bernhard Workshop on the cell nucleus, August 19-23, 2013, Debrecen, Hungary (招待講演)

原田昌彦「アクチン・ヒストン両ファミリーによる核・クロマチン機能制御」平成25年度遺伝研研究会「クロマチンによる遺伝情報のエピジェネティック制御機構」2013年10月17日-18日(三島)(招待講演)

原田昌彦「ヒトINO80クロマチンリモデリング複合体による遺伝子発現の酸化ストレス応答制御」第36回分子生物学会年会 2013年12月3日(神戸)

Hiroshi Kitamura, Eri Ohfuchi, Chikashi Obuse, Hideyuki Tanabe, Tetsuya Hori, Tatsuo Fukagawa, Pavel Hozak, Masahiko Harata “Interaction between the actin-related protein Arp6 and nuclear

myosin I and their contribution to the nuclear organization” Wenner-Gren Foundations International Symposium “Actin and actin-associated proteins from gene to polysomes” September 7-10, 2011, Stockholm, Sweden (招待講演)

〔図書〕(計 2 件)

原田昌彦、染色体と細胞核のダイナミクス。(平岡泰、原口徳子編) 第7章「核タンパク質と核骨格」、化学同人、印刷中 (2013) p169-183

豊水正昭、牧野周、原田昌彦、金山喜則、遠藤宣成、中嶋正道 (編集) 農学生命科学を学ぶための入門生物学、東北大学出版会 (2011) p289-324

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.harata-lab.org/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田昌彦 (HARATA MASAHIKO)

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：70218642