

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2021

課題番号：16K07302

研究課題名(和文) DNA複製異常が引き起こすヒストン転写抑制システムの分子解明

研究課題名(英文) Molecular analysis of coupling mechanisms of histone transcription and DNA replication

研究代表者

高山 優子 (TAKAYAMA, Yuko)

帝京大学・理工学部・准教授

研究者番号：90461467

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)：ヒストン転写はDNA複製が停止すると速やかに抑制されるが、その分子メカニズムは不明であった。これまで分裂酵母ヒストン転写因子Ams2を解析してきた知見を基に、Ams2と相互作用する因子の探索を行ったところ、DNA複製チェックポイントCds1を同定した。Cds1遺伝子破壊株では、Ams2のヒストンプロモーター結合が不安定となり遊離しやすくなっており、そのためにヒストン転写量が減少することが分った。Cds1はヒストンプロモーター領域への結合は見られないことから、ヒストン転写制御に間接的に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複製されたDNAと共役してS期限定に転写制御されているヒストン遺伝子は、その転写タイミングが変化すると染色体構造の異常や細胞死を引き起こすことが知られている。そのため、ヒストン転写とDNA複製制御の関連解明は重要である。本研究のDNA複製チェックポイント因子であるCds1がヒストン転写へ関与しているとの知見は、生物学的意義が大きい。そのため、今回明らかにできなかったCds1の制御ポイントの解析を今後進めていきたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：Histone transcription is rapidly repressed on arrest of DNA replication, but the molecular mechanism of this coupling has not been elucidated. I previously reported that histone gene transcription is regulated by the transcription factor Ams2 in fission yeast. Therefore, I screened for factors that interact with Ams2 and identified a Cds1, which is DNA damage checkpoint factor. The interaction between Ams2 and Cds1 was confirmed by yeast two-hybrid analysis and co-immunoprecipitation assay. In Cds1 deletion mutant cells, the amounts of histone transcription were reduced and binding of Ams2 to the histone promoter region was unstable under DNA damage reagent. In contrast, Cds1 did not bind to the histone promoter, I hypothesized that Cds1 is indirectly involved in the regulation of histone transcription. These results are new finding suggesting that DNA replication checkpoint factor is involved in the regulation of histone transcription.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヒストン チェックポイント 分裂酵母

## 1. 研究開始当初の背景

染色体の基本構造であるヌクレオソームは、遺伝情報を担う DNA がヒストン八量体に巻きついて形成される。複製によって倍加した DNA を速やかにヌクレオソーム形成できるように、S 期には大量のヒストンが必要とされる。そのため、ヒストン遺伝子は S 期に転写活性化される。一方、S 期以外の時期にヒストン遺伝子の転写が起こると細胞が致死になることが古くから知られている。このため、ヒストン遺伝子は S 期限定に転写されるよう、厳密に制御されていると考えられている。

申請者はこれまで、ヒストン転写が S 期限定に起こる仕組みについて研究を進めてきた。分裂酵母 Ams2 は、自身を持つ Zinc finger motif の DNA 結合能によりヒストンプロモーターに結合してヒストン遺伝子の転写を活性化していることを見出した (Takayama and Takahashi, 2007)。さらに、Ams2 タンパク質は G1-S 期に存在し、S 期進行に伴いリン酸化を受けた後、ユビキチン・プロテアソーム経路によって分解されることが分った。この分解システムにより Ams2 のタンパク質発現が G1-S 期に限定されることが、ヒストンの S 期限定発現を規定している事が分った。さらに、Ams2 を人工的に恒常発現させて S 期以外でもヒストン転写を起こさせたところ、染色体分配に必須なセントロメア領域のヌクレオソームが異常となり、細胞死を引き起こすことを明らかにした (Takayama et al. 2010)。これらの結果は、ヒストンの S 期転写制御は、染色体構築だけでなく細胞生育において重要なシステムであることを示している。

## 2. 研究の目的

ヒストンの S 期転写制御の一つに DNA 複製との共役関係が知られており、DNA 複製が停止したときにヒストン転写が速やかに抑制される (Gunjyan et al. 2005)。このため、DNA 複製進行とヒストン転写はお互いモニターしていると考えられているが、現在までこのイベント進行をモニターする分子機構は明らかになっていない。申請者は、ヒストンの S 期転写制御の一環として、この 2 つのイベントをモニターする分子同定を試みた。モニター分子が情報を伝達するためには、ヒストン転写因子 Ams2 と物理的に相互作用すると考え、Ams2 と相互作用する因子を Yeast Two Hybrid 法で検索したところ、Cds1 を得た。Cds1 は DNA 複製異常を検知するチェックポイント因子であることから、DNA 複製異常を感知した Cds1 が Ams2 に結合する事でヒストン転写の抑制をしているのではないかと考えた。

そこで本研究では、ヒストン転写における Cds1 の役割について検証し、DNA 複製異常時にヒストン転写を抑制する分子メカニズムの解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Ams2 と Cds1 の相互作用領域の同定

Ams2 や Cds1 の各断片領域を用いた Yeast Two Hybrid 法により、両者の相互作用領域を同定する。また、共免疫沈降実験により in vivo での相互作用を確認する。また、これらの相互作用が DNA 複製停止からの時間的経過と共にどのように変化するかについても調べることで、DNA 複製停止からヒストン転写抑制までのステップを明らかにする。

### (2) Ams2 や Cds1 の相互作用破綻によるヒストン転写への影響

Ams2 と Cds1 の結合とヒストン転写抑制の関連を調べるために、Cds1 と相互作用できない Ams2 変異株や Cds1 欠失株を複製停止条件下においた時のヒストン転写量の変化を、RT-PCR により定量する。

### (3) DNA 複製停止時における Ams2 タンパク質の変動

DNA 複製停止時にヒストン転写が抑制されるには、Ams2 がヒストンプロモーターから外れる、または結合したままで転写が阻害されることが考えられる。そこで、DNA 複製停止を引き起こした時の Ams2 のヒストンプロモーター結合の有無を ChIP (クロマチン免疫沈降) 法により確認する。Ams2 が遊離していた場合には、Cds1 遺伝子欠失株でも同様の実験を行い、Cds1 依存的に Ams2 が遊離するのかを確かめる。一方、Ams2 が結合している場合には、Cds1 が転写阻害因子として働いている可能性があるため、Cds1 がヒストンプロモーターへ結合しているかどうかを ChIP 法により明らかにする。

### (4) DNA 複製に関連したゲノム不安定性の検定

DNA 複製の遅延がゲノム不安定性を引き起こすことが報告された。そこで、ゲノム不安定化を定量できる系を確立し、Ams2 遺伝子破壊株や Cds1 遺伝子破壊株で、ゲノムの不安定性が増加するかを計測する。

#### 4. 研究成果

##### (1) Ams2 と Cds1 の相互作用領域の同定

Yeast Two Hybrid 法により、Ams2 全長や変異型と Cds1 部分断片との相互作用の検討を行ったところ、Ams2 の DNA 結合部位近傍と相互作用することが分った ( 図 1 )。

さらに、in vivo 相互作用を確かめるために、Ams2 の C 末端側に HA を Cds1 の C 末端側に Myc タグを導入した細胞株を作成した。DNA 複製停止を引き起こすためにヒドロキシ尿素 ( HU ) 処理した細胞を用いて共免疫沈降実験を行った。Myc 抗体による免疫沈降により Ams2-HA が共沈降することが確認できたが、HA 抗体による免疫沈降産物内に Cds1-Myc を検出できなかった。この理由は、Cds1 のタンパク質量が少ないために検出できなかった可能性がある。これらの結果から、Cds1 は Ams2 と結合している可能性が高まった。

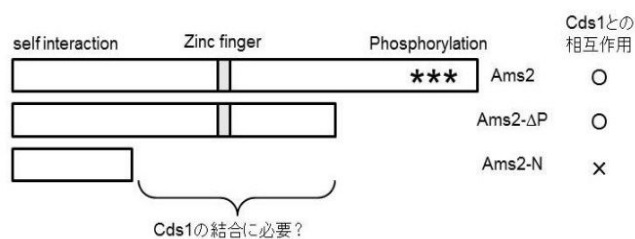


図 1 Ams2 と Cds1 の結合領域 模式図

##### (2) Ams2 や Cds1 の相互作用破綻によるヒストン転写への影響

Ams2 と Cds1 の相互作用によりヒストン転写が制御されているのであれば、Cds1 遺伝子欠失株では DNA 複製停止時にヒストン転写の抑制ができないと考えられる。そこで、HU 処理により複製停止を引き起こした時のヒストン転写量を RT-PCR により確認した。野生株は、HU 処理により S 期停止を引き起こすが、Cds1 遺伝子欠損株は細胞周期を進行させてしまう。そこで、cdc25-22 温度感受性変異を導入し、細胞周期が S 期に進入したところで HU 処理を行った。転写量の定量にはタグ付加による影響を取り除くために、タグ付加無しの細胞株を使用して RT-PCR によるヒストン転写量の測定を行った。Cds1 遺伝子の有無で、ヒストン転写量に大きな違いは無かった。しかし、HU 処理した細胞では、ヒストン転写量に変化が見られた。さらに、Cds1 遺伝子破壊株において細胞観察を行ったところ、Ams2 の核局在が変化することが分った。これらのことから、ヒストン転写制御に Cds1 が関与していることが明らかとなった。

##### (3) DNA 複製停止時における Ams2 タンパク質の変動

DNA 複製停止時に Ams2 タンパク質がプロモーター領域に結合しているかどうかを、ChIP 法で解析した。cdc25-22 による細胞同調後、細胞周期を進行させて時間経過と共に細胞を回収した。HU 処理時において、Cds1 の有無に関わらず Ams2 のヒストンプロモーター結合は確認できたが、Cds1 欠損株で HU 処理をした細胞では、Ams2 のプロモーターの結合時間が短いことが分った。同じサンプルを用いてヒストン転写量を RT-PCR で測定したところ、(2) の結果と同様 Cds1 遺伝子欠損株においては、ヒストン転写量が減少していることが確認できた。また、このヒストン転写量の減少が RNA の安定性の変化によるものかを確認するため、RNA 合成阻害剤の添加実験を行ったが、HU と RNA 合成阻害剤添加と細胞周期同調がうまくいかず、時間切れとなってしまった。これらの結果から、現時点では Cds1 遺伝子破壊株では Ams2 のプロモーター結合時間が短縮され、相対的にヒストン転写量の減少を引き起こすと考えられる。また Ams2 のヒストン遺伝子プロモーターへの結合維持に Cds1 が直接的に関与しているかどうか確認するため、Cds1 のヒストンプロモーター結合の有無を ChIP 法により解析した。細胞周期同調し時間経過と共に Cds1 の ChIP 解析を行ったが、ヒストンプロモーターに結合している結果は得られなかった。よって、DNA 複製異常時に Cds1 は間接的にヒストン転写に関与している可能性が高いと考えている。

##### (4) DNA 複製に関連したゲノム不安定性の検定

研究を進めている間に DNA 複製遅延がゲノム不安定性を引き起こすことが報告された。Ams2 遺伝子破壊株はこれまでの経験上、ゲノムの不安定性が高い傾向にあることから、どのようなゲノム変化が優位に起こっているのかを定量解析するために、解析系を確立した。すでにゲノム変化を頻発させることが知られている遺伝子変異を導入してこの解析系の評価をし、有効であることを確認した。この系を用いてゲノム不安定性を確認したところ、Ams2 遺伝子破壊株ではわずかにゲノム不安定性が高くなっていった。一方で、ヒストン遺伝子単独破壊株では不安定性は認められなかった。さらに、ヒストン遺伝子多重破壊株や Cds1・Ams2 二重遺伝子破壊株でも解析を行ったが、株の生存率が低いために正確な定量ができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takayama Yuko, Shirai Masaki, Masuda Fumie	4. 巻 6
2. 論文標題 Characterisation of functional domains in fission yeast Ams2 that are required for core histone gene transcription	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 38111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/srep38111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白井均樹、高山優子
2. 発表標題 RNA認識モチーフを持つセントロメア関連因子の機能解析
3. 学会等名 酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高山優子
2. 発表標題 油脂生産酵母の分子生物学的手法開発の試み
3. 学会等名 第39回日本分子生物学会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 高山優子、白井均樹、増田史恵
2. 発表標題 分裂酵母ヒストン転写因Ams2の分子解明
3. 学会等名 第34回染色体ワークショップ・第15回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

帝京大学 教員紹介 高山優子  
[https://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/2000/32research\\_map](https://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/2000/32research_map)  
<https://researchmap.jp/takayama-yuko>  
帝京大学理工学部 教員紹介  
<https://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/2000/32>  
帝京大学理工学部バイオサイエンス学科教員紹介  
<https://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/2000/32>  
バイオサイエンス学科の研究活動  
[http://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science\\_tech/bio\\_science/research.html](http://www.teikyo-u.ac.jp/faculties/undergraduate/science_tech/bio_science/research.html)  
帝京大学理工学部教員紹介  
<https://www.e-campus.gr.jp/staffinfo/public/staff/detail/2000/32>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------