

平成 22 年 5 月 26 日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2005～2009

課題番号：17080012

研究課題名（和文） 高次クロマチン構造による染色体機能ドメイン構築機構の解明

研究課題名（英文） Elucidating the roles of higher-order chromatin structure in the formation of chromosomal domains

研究代表者

中山 潤一 (Nakayama Jun-ichi)

独立行政法人理化学研究所・クロマチン動態研究チーム・チームリーダー

研究者番号：60373338

研究成果の概要（和文）：本研究では、染色体の機能ドメインの構築に必須なヘテロクロマチンがどのように形成・維持されるのか、そのメカニズムの解明を目指した。そして、ヘテロクロマチンの確立を制御する分裂酵母の新規因子 ARC と Eri1 の同定に成功した。またヘテロクロマチン構造の中心的な因子である HP1 の機能が、量的バランスや翻訳後修飾によって制御されていることを明らかにした。さらに出芽酵母ヘテロクロマチンの境界領域を決定する、分子メカニズムの詳細を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：In this research program, we tried to gain a better understanding of the molecular mechanisms underlying the establishment and maintenance of higher-order chromatin structure, heterochromatin. We successfully identified ARC and Eri1 as novel regulatory factors of heterochromatin assembly in fission yeast. We also demonstrated that the HP1 function is regulated by dosage balance and posttranslational modifications. Furthermore, using budding yeast, we defined the molecular mechanisms to form heterochromatin boundaries.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	15,300,000	0	15,300,000
2006年度	15,300,000	0	15,300,000
2007年度	15,300,000	0	15,300,000
2008年度	15,300,000	0	15,300,000
2009年度	15,300,000	0	15,300,000
総計	76,500,000	0	76,500,000

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：遺伝子、発現制御、ヘテロクロマチン、RNA 干渉、分裂酵母、出芽酵母

## 1. 研究開始当初の背景

真核細胞の染色体には、高度に凝縮したヘ

テロクロマチンと呼ばれる構造が存在する。この高次のクロマチン構造は、セントロメアやテロメ

アなど、染色体の正確な分配やその機能の維持に必要な機能ドメインの構築に重要な役割を果たしている。これまでの申請者等の研究から、高次クロマチン構造形成には、特徴的なヒストンのメチル化修飾と、その修飾を認識して結合するヘテロクロマチンタンパク質 HP1 が、高次クロマチンの形成に重要な役割を果たしていることが明らかになった。しかし、何がヘテロクロマチン領域を規定しているのか、またどのような機構でこの高次の構造が確立・維持されているのか、その分子機構の詳細については不明であった。

## 2. 研究の目的

本計画研究では、染色体の機能ドメインの構築に必須な高次クロマチン構造について、その形成と維持の分子機構を明らかにすることを目指した。実際には、高次クロマチン構造研究の優れたモデル生物である分裂酵母と出芽酵母を研究材料に用いて：1) ヘテロクロマチン構造確立のメカニズムの解明、2) ヘテロクロマチン構造維持・動態メカニズムの解明、3) ヘテロクロマチン境界決定機構の解析、以上の3つの研究を統合して推進し、染色体機能ドメイン形成の分子機構を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

1) ヘテロクロマチン構造確立のメカニズムの解明：分裂酵母では、ヘテロクロマチン構造を確立する過程に、RNAiとよく似た機構の関与が報告されていたが、実際にどのようにこの機構が制御されているかについては不明であった。本研究では、まずRNAiの中心的な因子であるAgo1に着目し、生化学的手法によってAgo1と相互作用する因子の探索を試みた。また、進化的に保存された二本鎖RNA分解酵素であるEri1が、高次クロマチン構造形成とどのように関連するのか、その検討を行った。

2) ヘテロクロマチン構造維持・動態メカニズムの解明：HP1はヘテロクロマチン構造形成の中心的な因子であるが、複数存在するHP1アイソフォームがどのように構造形成に関与するのか、またどのように他のクロマチン制御因子をリクルートするのか不明であった。そこで本研究では、分裂酵母のHP1タンパク質であるSwi6とChp2に着目し、その機能分担について詳細な解析を行った。また、HP1が他のクロマチン制御因子をリクルートする仕組みの解明を目指して、ヘテロクロマチンと共局在する因子として同定されたカゼインキナーゼ2 (CK2) の機能に着目して研究を進めた。

3) ヘテロクロマチン境界決定機構の解析：高次クロマチン構造の境界がどのように形成されるのか、出芽酵母のHMR遺伝子座を

モデルとして、境界領域の詳細なマッピング解析を行った。また、ヘテロクロマチン領域伸長停止を指標にしたスクリーニングによって単離された新規因子の同定とその機能解析を行った。さらに出芽酵母のPEV現象を応用し、境界形成能をモニターできる新規実験系の構築を試みた。

## 4. 研究成果

1) ヘテロクロマチン構造確立のメカニズムの解明：我々はAgo1と相互作用する因子の解析から、Ago1がArb1, Arb2という因子とともに新規の複合体 (ARC複合体) を形成している事を見出した。詳細な生化学的解析から、ARCは二本鎖RNAを一本鎖RNAに変換し、エフェクター因子であるRITSに受け渡す段階に重要な役割を果たしていることを明らかにした。また、二本鎖RNA分解酵素であるEri1について解析を進め、Eri1が細胞内の二本鎖RNAの量を調節し、RNAi機構を介したヘテロクロマチン構造形成を負に制御していることを明らかにした。

2) ヘテロクロマチン構造維持・動態メカニズムの解明：分裂酵母のHP1 相同タンパク質であるSwi6とChp2の機能分担に着目し、その機能について詳細な生化学的、遺伝学的解析を行った。その結果、これらのタンパク質が独自の機能を果たし、その量的なバランスが高次クロマチン構造形成に重要な役割を果たしていることを見出した。また、ヘテロクロマチンと共局在を示す因子としてCK2に着目し、実際にSwi6がCK2によってリン酸化され、このリン酸化が転写抑制因子であるSHREC複合体のリクルートに必要であることを明らかにした。このリン酸化の有無はヘテロクロマチンの染色体分配の機能には影響を与えず、HP1/Swi6の多面的な機能の一端を担う修飾と考えられる。さらに、Swi6と相互作用してSHRECとは逆の転写活性化に寄与するEpe1が、姉妹染色体接着を行うコヒーシンのヘテロクロマチン局在に関与することを明らかにした。

3) ヘテロクロマチン境界決定機構の解析：出芽酵母のヘテロクロマチン領域であるHMR遺伝子座に着目して、ヘテロクロマチン構成要素のSir3の局在解析から、境界領域にLTR型のトランスポゾンが存在することを明らかにした。また、ヘテロクロマチン伸長停止スクリーニングによって、SASヒストンアセチル化複合体、SETヒストンメチル化複合体、ADA複合体が境界領域の決定に関与していることを明らかにするとともに、機能未知の境界決定因子の遺伝子同定に成功した。さらに、細胞内での境界形成をモニターする系の構築に成功し、境界領域の形成が細胞老化と関与していることを見出した。

## 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 24 件)

- ① Hayakawa, T., Zhang, F., Hayakawa, N., Ohtani, Y., Shinmyozu, K., Nakayama, J., and Andressen, P.R. MRG15 directly binds to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks. *J. Cell Sci.* 123: 1124-1130 (2010) 査読:有
- ② Shimada, A. and Murakami, Y. Dynamic regulation of heterochromatin via phosphorylation of HP1-family proteins. *Epigenetics* 5, 30-33 (2010) 査読:無
- ③ Okada, S., Nagabuchi, M., Takamura, Y., Nakagawa, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., and Tanaka, K. Reconstitution of Arabidopsis thaliana SUMO pathways in E. coli: functional evaluation of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol.* 50, 1049-1061 (2009) 査読:有
- ④ Shimada, A., Dohke, K., Sadaie, M., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Urano, T., and Murakami, Y. Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. *Genes Dev.* 23, 18-23 (2009) 査読:有
- ⑤ Hayashi, M.T., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Nakayama, J., and Masukata, H. The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at pericentromeres and silent mating-type locus. *Nat. Cell Biol.* 11, 357-362 (2009) 査読:有
- ⑥ Sadaie, M., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Arisaka, F., Tanaka, K., Shirahige, K., and Nakayama, J. Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol. Cell Biol.* 28, 6973-6988 (2008) 査読:有
- ⑦ Iida, T., Nakayama, J., and Moazed, D. siRNA-mediated heterochromatin establishment requires HP1 and is associated with antisense transcription. *Mol. Cell* 31, 178-189 (2008) 査読:有
- ⑧ Sadaie, M., Shinmyozu, K., and Nakayama, J. A conserved SET-domain methyltransferase, Set11, modifies ribosomal protein Rpl12 in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 283, 7185-7195 (2008) 査読:有
- ⑨ Chikashige, Y., Nakayama, J. (8人中5番目), and Hiraoka, Y. Gene expression and distribution of Swi6 in partial aneuploids of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Struct. Funct.* 32, 149-161 (2008) 査読:有
- ⑩ Kato, H., Matsunaga, F., Miyazaki, S., Yin, L., D'Urso, G., Tanaka, K., and Murakami, Y. *Schizosaccharomyces pombe* Orc5 plays multiple roles in the maintenance of genome stability throughout the cell cycle. *Cell Cycle* 7, 1085-1096 (2008) 査読:有
- ⑪ Dohke, K., Miyazaki, S., Tanaka, K., Urano, T., Grewal, S.I., and Murakami, Y. Fission yeast chromatin assembly factor 1 assists in the replication-coupled maintenance of heterochromatin. *Genes Cells.* 13 1027-43 (2008) 査読:有
- ⑫ Hayakawa, T., Ohtani, Y., Hayakawa, N., Shinmyozu, K., Saito, M., Ishikawa, F., and Nakayama, J. RBP2 is an MRG15 complex component and downregulates intragenic histone H3 lysine 4 methylation. *Genes Cells* 12, 811-826 (2007) 査読:有
- ⑬ Buker, S.M., Iida, T., Buhler, M., Villen, J., Gygi, S.P., Nakayama, J., and Moazed, D. Two different Argonaute complexes are required for siRNA generation and heterochromatin assembly in fission yeast. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 200-207 (2007) 査読:有
- ⑭ Kohzaki, H., and Murakami, Y. Faster and easier chromatin immunoprecipitation assay with high sensitivity. *Proteomics* 7, 10-14 (2007) 査読:有
- ⑮ Murakami, Y., Chen, L.F., Sanechika, N., Kohzaki, H., and Ito, Y. Transcription factor Runx1 recruits the polyomavirus replication origin to replication factories. *J. Cell Biochem.* 100, 1313-1323 (2007) 査読:有
- ⑯ Yokoyama, M., Inoue, H., Ishii, C., and Murakami, Y. The novel gene mus7(+) is involved in the repair of replication-associated DNA damage in fission yeast. *DNA Repair (Amst)* 6, 770-780 (2007) 査読:有
- ⑰ Oki, M. (9名中1番目), and Nishimoto T. Identification of novel suppressors for Mog1 implies its involvement in RNA metabolism, lipid metabolism and signal transduction. *Gene* 400, 114-121 (2007) 査読:有
- ⑱ Oki, M., Aihara, H., and Ito, T. Role of histone phosphorylation in chromatin dynamics and its implications in diseases. *Subcell. Biochem.* 41, 319-336 (2007) 査読:有
- ⑲ Hayashi, N., Oki, M. (10名中5番目), and Nishimoto T. Temperature-sensitive defects of the GSP1 gene, yeast Ran homologue, activate the Tel1-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 353, 330-336 (2007) 査読:有
- ⑳ Iida, T., Kawaguchi, R., and Nakayama, J.

Cytoplasmic siRNA-degrading ribonuclease, Eri1, negatively regulates heterochromatin assembly in fission yeast. *Curr. Biol.* 16, 1459-1464 (2006) 査読:有

- ⑳ Tsumura, A., Nakayama, J. (11 名中 10 番目), and Okano, M. Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells* 11, 805-814. (2006) 査読:有
- ㉑ Nishijima, H., Nakayama, J., Yoshioka, T., Kusano, A., Nishitani, H., Shibahara, K., and Nishimoto, T. Nuclear RanGAP is required for the heterochromatin assembly and reciprocally regulated by histones and Clr4 histone methyltransferase in *S. pombe*. *Mol. Biol. Cell* 17, 2524-2536. (2006) 査読:有
- ㉒ Locovei, AM., Spiga, MG., Tanaka, K., Murakami, Y., and D'Urso, G. The CENP-B homolog, Abp1, interacts with the initiation protein Cdc23 (MCM10) and is required for efficient DNA replication in fission yeast. *Cell Div.* 1, 27 (2006) 査読:有
- ㉓ Valencia-Burton, M., Oki, M., Johnson, J., Seier, TA., Kamakaka, R., Haber, JE. Different mating-type-regulated genes affect the DNA repair defects of *Saccharomyces* RAD51, RAD52 and RAD55 mutants. *Genetics* 174, 41-55 (2006) 査読:有

[学会発表] (計 20 件)

- ① 中山潤一, 「Chromodomain Protein and RNAi-mediated Heterochromatin Assembly」第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日, 横浜市
- ② 中山潤一, 「Distinct Roles of Chromodomain Proteins in the Formation of Higher-Order Chromatin Structure」The Fifth International Fission Yeast Meeting, 2009 年 10 月 29 日, 東京都
- ③ 中山潤一, 「分裂酵母の SET ドメインタンパク質はリボソームタンパク質のメチル化修飾してリボソーム機能を制御する」, 第 11 回 RNA ミーティング, 2009 年 7 月 29 日, 新潟市
- ④ 村上洋太, 「Dynamic Regulation of heterochromatin structure/function in the cell cycle」, 第 32 回日本分子生物学会年会, 2009 年 12 月 9 日-12 日, 横浜市
- ⑤ 村上洋太, 「Dynamic Regulation of Heterochromatin」, The Fifth

International Fission Yeast Meeting, 2009 年 10 月 29 日, 東京都

- ⑥ 村上洋太, 「トランスポゼース由来の分裂酵母 CENP-B ホモログはキネトコアとヘテロクロマチンの境界で機能する」, 第 82 回日本生化学会大会, 2009 年 10 月 21 日-24 日, 神戸市
- ⑦ 村上洋太, 「Dynamic Regulation of Heterochromatin」, 第 24 回 内藤カンファレンス “Nuclear Dynamics and RNA [II]”, 2009 年 6 月 23 日-26 日, 札幌市
- ⑧ 沖昌也, 「エピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解析」, 第 27 回 染色体ワークショップ, 2010 年 1 月 20 日, 御殿場市
- ⑨ 沖昌也, 「Analysis of the heredity change of the boundary」, UNIA Current Trends in Biomedical Workshop 2009 on: Chromatin domains and Insulators, 2009 年 11 月 9 日, Baeza, Spain
- ⑩ 沖昌也, 「Analysis of the heredity change of the gene expression in the single cell」, FASEB Summer Research Conference, 2009 年 7 月 13 日, Colorado, USA
- ⑪ 沖昌也, 「単一細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解析」, 第 8 回核ダイナミクス研究会, 2009 年 6 月 19 日, 伊豆市
- ⑫ 中山潤一, 「哺乳類 HP1 のリン酸化修飾の同定とその機能の解析」, 第 26 回染色体ワークショップ, 2009 年 1 月 27 日, 姫路市
- ⑬ 沖昌也, 「生体内におけるサイレンシング領域伸長停止メカニズムの解析」, 第 26 回染色体ワークショップ, 2009 年 1 月 27 日, 姫路市
- ⑭ 沖昌也, 「ヘテロクロマチン領域伸長停止と Ty 因子の関与」, 第 31 回日本分子生物学会, 2008 年 12 月 11 日, 神戸市
- ⑮ 中山潤一, 「分裂酵母 SET ドメインタンパク質の機能解析」, 酵母遺伝学フォーラム第 41 回研究報告会, 2008 年 9 月 10 日, 札幌市
- ⑯ 沖昌也, 「HMR left boundary の機能解明」, 酵母遺伝学フォーラム第 41 回研究報告会, 2008 年 9 月 11 日, 札幌市
- ⑰ 沖昌也, 「生体内におけるヘテロクロマチン領域伸長停止メカニズムの解析」第 80 回日本遺伝学会, 2008 年 9 月 5 日, 名古屋市
- ⑱ 中山潤一, 「Distinct roles of chromodomain proteins in the formation of higher-order chromatin structure」, The 21th NAITO Conference, 2008 年 6 月 26 日, 北杜市
- ⑲ 中山潤一, 「Balance between distinct HP1 proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast」, International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise, 2008, 2008 年 5 月 28 日, 志摩市
- ⑳ 中山潤一, 「高次クロマチン構造形成と RNA 代謝ネットワーク」, 第 2 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2008 年 5 月 10 日, 三島市

〔図書〕（計 2 件）

- ① 中山潤一，染色体サイクルのクロマチン制御：概論，蛋白質核酸酵素増刊「染色体サイクル」（正井久雄、升方久夫、釣本敏樹、仁木宏典、篠原彰編），54 巻，485-487，2009（共立出版）
- ② 飯田哲史・中山潤一，RNAi によるヘテロクロマチン制御機構，実験医学増刊「染色体サイクル」（正井久雄・渡辺良典編），25 巻，186-190，2007（羊土社）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

中山 潤一 (Nakayama Jun-ichi)  
独立行政法人理化学研究所・クロマチン動態研究チーム・チームリーダー  
研究者番号：60373338

### (2) 研究分担者

村上 洋太 (Murakami Yota)  
北海道大学・先端生命科学研究院・教授  
研究者番号：20260622

沖 昌也 (Oki Masaya)  
福井大学・工学研究科・准教授  
研究者番号：60420626