

令和 2 年 5 月 29 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03713

研究課題名(和文) 高次クロマチン構造の確立と維持を制御する分子機構

研究課題名(英文) Mechanisms underlying the establishment and maintenance of higher-order chromatin structure

研究代表者

中山 潤一 (Nakayama, Jun-ichi)

基礎生物学研究所・クロマチン制御研究部門・教授

研究者番号：60373338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では分裂酵母のヒストンメチル化酵素複合体CLRCに着目し、ヘテロクロマチンの形成とユビキチン化との関連を検討した。先行する研究でCLRCがヒストンH3を特異的にユビキチン化すること、またユビキチン化によってClr4のメチル化活性が促進されることを見出していた。本研究では、それらの分子機構をさらに詳細に解析し、1) Clr4のN末端領域がユビキチン化されたH3の認識に重要なこと、2) N末端のクロモドメイン近傍領域を欠損させたClr4変異体ではヘテロクロマチンのサイレンシングが解除されること、3) CLRCとの相互作用にはClr4のC末端領域が重要なこと、をそれぞれ明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核細胞の染色体に存在するヘテロクロマチンは、染色体の機能やゲノム恒常性の維持、エピジェネティックな遺伝子発現に重要な役割を果たしている。ヒストンのメチル化修飾はヘテロクロマチンの重要なマークであり、そのメチル化修飾の制御機構を明らかにする研究は高次生命現象を理解する上で重要な課題である。本研究は、ヒストンのメチル化酵素の制御にユビキチン化が関わることを明らかにした画期的な成果である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we focused on Clr4 methyltransferase complex (CLRC) in fission yeast, and investigated a functional link between ubiquitin modification and heterochromatin assembly. In our previous studies, we demonstrated that CLRC possesses ubiquitylation activity on histone H3 and that H3 ubiquitylation promotes Clr4's methyltransferase activity. We further examined the molecular mechanisms underlying these events and specifically demonstrated that 1) Clr4 N-terminal regions recognize ubiquitylated H3, 2) CD-adjacent N-terminal region plays an important role in Clr4's function, 3) Clr4 interacts with the CLRC through its C-terminal region.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子 発現制御 ヘテロクロマチン 分裂酵母 ユビキチン化

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体に存在するヘテロクロマチンは、染色体の機能やゲノムの恒常性維持に必要な構造であり、その基本的な構造は酵母からヒトまで広く保存されている。ヘテロクロマチンには特徴的なヒストンのメチル化修飾 (H3K9me) が存在し、この修飾を認識するヘテロクロマチンタンパク質 HP1 を中心にして、高次のクロマチン構造が形成されている。分裂酵母は高等真核生物と良く似たクロマチン構造上の特徴を有し、ヘテロクロマチン構造を研究する上で優れたモデル生物である。分裂酵母のメチル化酵素である Clr4 は、遺伝学的、生化学的な解析から、Rik1, Cul4, Raf1, Raf2 と相互作用することが明らかにされ、この複合体は CLRC (Clr4 complex) と名付けられた。構成要素のひとつである Cul4 は、Cullin ファミリーに属する E3 ユビキチン化酵素であることから、Clr4 の活性にユビキチン化との機能的な関連が示唆されていたが、その詳細は不明だった。先行して実施した研究 (H26-29 基盤研究(B)) において、1) 分裂酵母からアフィニティー精製した CLRC が、ヒストン H3 の 14 番目のリジン (H3K14) を特異的にユビキチン化する活性を有すること、2) ユビキチン化されたヒストン H3 (H3K14ub) が実際に分裂酵母のヘテロクロマチン領域に存在すること、3) H3 のユビキチン化修飾が Clr4 の H3K9 メチル化活性を促進することをそれぞれ明らかにした。しかし、分裂酵母内の H3 ユビキチン化の動態や、Clr4 による H3 ユビキチン化の認識機構など、依然詳細な分子機構については不明な点が残されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、分裂酵母のヒストンメチル化酵素複合体 CLRC の生化学的解析を進め、ヒストンのメチル化修飾とユビキチン化修飾の関係を明らかにするとともに、ヘテロクロマチン構造の確立と維持に関わる普遍的な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) Clr4 によるユビキチン化 H3 の認識機構の解明

先行する研究によって、H3 のユビキチン化が Clr4 の H3K9 メチル化活性を促進することを明らかにした。Clr4 のどの領域がユビキチン化された基質の認識に必要なか検討するため、Clr4 の一部の領域を欠損させた種々のリコンビナントタンパク質を調製し、未修飾の H3、K14 がユビキチン化された H3 を基質にして *in vitro* でヒストンメチル化アッセイを行った。<sup>3</sup>H でラベルされた基質を電気泳動しオートラジオグラフィによって定量し、H3K14ub への嗜好性の有無を検討した。

### (2) ユビキチン化 H3 の認識と Clr4 の機能

上記研究で明らかになったユビキチン化 H3 の認識に必要な Clr4 の領域について、分裂酵母を用いてその領域の重要性を検証した。*clr4* 遺伝子を含むゲノム領域をクローニングし、ユビキチン化 H3 の認識に必要な Clr4 の領域をコードする部分を欠損させた後、*ura4+* 遺伝子と共に *clr4* 遺伝子座に導入した。その後 FOA 培地を用いて、相同組み換えで一方の *clr4* 遺伝子を失った株を単離することで、Clr4 の部分欠損変異体を発現する酵母株を作製した。この株とヘテロクロマチン領域にサイレンシングマーカーを持つ株を掛け合わせて、スポットアッセイによってヘテロクロマチン形成における Clr4 変異体の機能を調べた。

### (3) Clr4 と CLRC の関係の解析

Clr4 がどのように CLRC の構成要素と相互作用しているか明らかにするため、FLAG タグを付加した種々の Clr4 の部分欠損変異体を、Rik1-13myc を発現する株で発現し、それぞれの相互作用を免疫沈降、ウェスタンブロットング法で検討することで、CLRC との相互作用に必要な Clr4 のドメインを同定した。

### (4) H3K14ub 抗体の作製

先行する研究によって CLRC がヒストン H3K14 を優先的にユビキチン化することを明らかにした。実際に分裂酵母内での H3K14ub の動態を明らかにするため、H3K14ub に対する抗体の作製を試みた。ユビキチン化されたペプチドはリジンの側鎖にジグリシン (GG) を介して枝分かれした構造をしている。そこで H3K14 を含み K14 の部分に GG を付加した分岐ペプチドを合成し、この抗体に対するモノクローナル抗体を作成し、分裂酵母株から調製した細胞抽出液を用いてその反応性を検証した。

### (5) 細胞内の H3K14ub を検出する方法の開発

先行する研究において、H3K9me2 に対する抗体を用いたクロマチン免疫沈降法と質量分析法を組み合わせることで、細胞内の H3K14ub の存在を明らかにした。しかし、CLRC の構成要素を欠損するとヘテロクロマチン領域から H3K9me2 が消失してしまうため、同様な手法を用いてヘテロクロマチン領域に存在する H3K14ub を検出することができない。そこで細胞内の

H3K14ub の動態と CLRC との関連を明らかにすることを目的として、セントロメア近傍領域に lacO リピートが挿入され、lacI-GFP を発現している酵母株を利用し、抗 GFP 抗体による免疫沈降、その沈降画分を質量分析で解析することで H3K14ub の検出を試みた。

#### 4. 研究成果

##### (1) Clr4 によるユビキチン化 H3 の認識機構の解明

Clr4 の一部の領域を欠損させたりコンビナントタンパク質を調製し、未修飾の H3、K14 がユビキチン化された H3 を基質にして *in vitro* でヒストンメチル化アッセイを行った。その結果、N 末端のクロモドメインとその近傍領域を欠損させた Clr4 では、ユビキチン化 H3 に対する嗜好性が失われていることが明らかになった。この結果より、Clr4 の N 末端領域がユビキチン化 H3 の認識と Clr4 の活性制御に関与していることが強く示唆された。

##### (2) ユビキチン化 H3 の認識と Clr4 の機能

上記 *in vitro* の実験で、Clr4 の N 末端領域がユビキチン化 H3 の認識に重要なことが明らかになったので、次に分裂酵母を用いてその領域の重要性を検証した。N 末端領域を欠損させた変異 Clr4 を発現させた分裂酵母では、ヘテロクロマチン領域に挿入したマーカー遺伝子のサイレンシングが部分的に解除されていることが分かった。これは N 末端領域が Clr4 の機能に重要な役割を果たしていることを示唆する結果と考えられる。

##### (3) Clr4 と CLRC の関係の解析

Clr4 の部分欠損変異体を分裂酵母で発現させ、免疫沈降法で Rik1 との相互作用の有無を検討した。その結果、N 末端を欠損させた Clr4 では Rik1 との相互作用が検出できたが、SET ドメインを含む C 末端領域を欠損させた Clr4 では、Rik1 との相互作用が失われていることが明らかになった。さらに、Clr4 のメチル化酵素活性に必要な残基に変異を入れた Clr4 でも Rik1 との相互作用が維持されていたことから、Clr4 は C 末端領域を介して CLRC と相互作用すること、その相互作用に Clr4 のメチル化活性は不要ことが明らかになった。

##### (4) H3K14ub 抗体の作製

分岐ペプチドに特異的に反応するモノクローナル抗体を選別した。候補として得られた抗体を用いて、分裂酵母の抽出液に対してウエスタンブロットを行った結果、ユビキチン化 H3 に相当する位置にシグナルが検出されたが、これが K14 にユビキチンが付加された H3 を特異的に認識しているかどうかの最終的な確認はできなかつたため、継続して抗体の反応性を検証する必要があることが分かった。

##### (5) 細胞内の H3K14ub を検出する方法の開発

セントロメア近傍領域に lacO リピートが挿入され、lacI-GFP の局在が確認されている酵母株を利用して、まずは抗 GFP 抗体でクロマチン免疫沈降を行い、実際にセントロメア近傍領域が沈降されていることをリアルタイム PCR で確認した。次にクロマチン免疫沈降法のスケールを上げて、同様に抗 GFP 抗体を用いてクロマチンを免疫沈降し、沈降画分を用いて質量分析を行ったが、この方法ではユビキチン化された H3 を効率よく検出することはできなかつた。今後はヘテロクロマチン領域の H3 を濃縮するなど、別の手法を組み合わせる必要があることが分かった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Kosuke Okazaki, Hiroaki Kato, Tetsushi Iida, Kaori Shinmyozu, Jun-ichi Nakayama, Yota Murakami, Takeshi Urano	4. 巻 11
2. 論文標題 RNAi-dependent heterochromatin assembly in fission yeast <i>Schizosaccharomyces pombe</i> requires heat-shock molecular chaperones Hsp90 and Mas5.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 26
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13072-018-0199-8	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 -
1. 著者名 Vladimir Maksimov, Eriko Oya, Mayo Tanaka, Takayuki Kawaguchi, Aki Hachisuka, Karl Ekwall, Pernilla Bjerling, Jun-ichi Nakayama	4. 巻 13
2. 論文標題 The binding of Chp2's chromodomain to methylated H3K9 is essential for Chp2's role in heterochromatin assembly in fission yeast.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0201101
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0201101	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 該当する
1. 著者名 Jagadeeswara Rao Bommi, Hanumanthu Bala Durga Prasada Rao, Kiran Challa, Mika Higashide, Kaori Shinmyozu, Jun-ichi Nakayama, Miki Shinohara, Akira Shinohara	4. 巻 24
2. 論文標題 Meiosis-specific cohesin component, Rec8, promotes the localization of Mps3 SUN domain protein on the nuclear envelope.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 94-106
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/gtc.12653	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Shinichi Machida, Yoshimasa Takizawa, Masakazu Ishimaru, Yukihiko Sugita, Satoshi Sekine, Jun-ichi Nakayama, Matthias Wolf, Hitoshi Kurumizaka	4. 巻 69
2. 論文標題 Structural Basis of Heterochromatin Formation by Human HP1	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Cell	6. 最初と最後の頁 385-397
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.molcel.2017	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 -

1. 著者名 Eriko Oya, Reiko Nakagawa, Yuriko Yoshimura, Mayo Tanaka, Gohei Nishibuchi, Shinichi Machida, Atsuko Shirai, Karl Ekwall, Hitoshi Kurumizaka, Hideaki Tagami, Jun-ichi Nakayama	4. 巻 20
2. 論文標題 H3K14 ubiquitylation promotes H3K9 methylation for heterochromatin assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.201948111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Eriko Oya, Mickael Durand-Dubief, Adiel Cohen, Vladimir Maksimov, Catherine Schurra, Jun-ichi Nakayama, Ronit Weisman, Benoit Arcangioli, Karl Ekwall	4. 巻 12
2. 論文標題 Leo1 is essential for the dynamic regulation of heterochromatin and gene expression during cellular quiescence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Epigenetics & Chromatin	6. 最初と最後の頁 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13072-019-0292-7	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 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Jun-ichi Nakayama
2. 発表標題 Impact of nucleic acid and methylated H3K9 binding activities of Suv39h1 in heterochromatin assembly
3. 学会等名 Chromatin Meets Epigenetics: From Organization To Function KAUST (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山潤一
2. 発表標題 ヒストンのメチル化修飾による高次クロマチン形成の分子機構
3. 学会等名 ConBio2017 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 大屋恵梨子、中川れい子、吉村ゆり子、田中万葉、西淵剛平、町田晋一、胡桃坂仁志、田上英明、中山潤一
2. 発表標題 分裂酵母のヘテロクロマチンを制御するヒストン修飾のクロストーク
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 蜂須賀亜紀、沖昌也、中山潤一
2. 発表標題 ヘテロクロマチン構造形成に関わるヒストン修飾酵素複合体の機能解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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