

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07496

研究課題名(和文)ヘテロクロマチンタンパク質HP1のヒストンH3K9me非依存的機能の解明

研究課題名(英文)H3K9me independent role of heterochromatin protein 1 (HP1)

研究代表者

高畑 信也 (Takahata, Shinya)

北海道大学・理学研究院・助教

研究者番号：50381588

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)：本研究計画ではヒストンH3K9meに起因して形成されるヘテロクロマチン領域以外で機能するヘテロクロマチンタンパク質HP1の役割に関してプロテオミクスの側面から解析した結合因子の探索、H3K9me非依存的に転写集結点に集積する分子基盤、その時の生物学的意義についての解析を行った。結合因子に関してSap1、Hmo1、Rvb1/Rvb2を同定した事に加えHP1ホモダイマー形成機構を解析する実験システムを新たに構築することに成功した。転写集結点に集積するHP1の分子基盤と意義に関しては共役して働く repressorが存在していることを示唆するデータを得ており、今後の詳細な解析につながると推測される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年のRNA-seqを中心とするトランスクリプトームは生体内の多様なRNA解析を可能にし細胞種ごとに異なる選択的スプライシングやポリアデニル化がおこることが明らかになった。本研究では現在でもまだ明らかになっていない多彩なクロマチン構造制御機構と転写終結の関係の一端を解き明かす発見を得た。特に遺伝子発現においてどのように転写終結が起きるのかは現在においても不明瞭な点が多々あり、その分子機構は複雑である。ある種の遺伝子においてHP1がその転写抑制活性を利用してDNA配列特異的に働く転写抑制因子と共役して転写終結に関わるのは生命の根源に関わる極めて興味深い現象である。

研究成果の概要(英文)：In this research project, three aims are settled for histone H3K9me independently working heterochromatin protein1 (HP1). First we searched for HP1 binding effector proteins by a proteomic analysis using LC-MS/ms. Second, on the role of the heterochromatin protein HP1 that functions outside the heterochromatin forming region, a transcriptional repressor was suggested to cooperatively repress the chromatin structure at the transcriptional termination site (TTS) in an H3K9me-independent manner. The molecular basis and the biological significance at euchromatic TTS were analyzed and discussed. Regarding the molecular basis and biological significance of HP1, we have obtained data suggesting that there is a function as a transcriptional repressor that works at TTS, and it is expected that this may lead to further detailed analysis of euchromatic HP1.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ヘテロクロマチン HP1 転写 転写終結 TTS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

分裂酵母 HP1/Swi6 と FACT の共役を見出したことから swi6 変異体と FACT 変異体のトランスクリプトーム解析を行い、グローバルな転写産物の影響をコーディング遺伝子とノンコーディング遺伝子で分けて解析した所、swi6 変異株と FACT 変異株で変動する遺伝子群が両者ともに極めて似ている事を見出した。他にも ChIP-qPCR 解析から FACT が Swi6 と共役してヘテロクロマチンのみならず、H3K9me 非依存的にユークロマチン上の遺伝子発現をも制御する事を示すデータを得た。トランスクリプトーム解析結果を理解する為、申請者は HP1/Swi6 の ChIP-seq 解析を行ないゲノムワイドな分布を調べた。分裂酵母のデータベースより全転写ユニットの平均を取って HP1/Swi6 の分布を調べた所、驚くべき事に HP1/Swi6 がヒストン H3K9me 非依存的に転写終結点に濃縮する事が明らかとなったが(図1)このような HP1 の結合パターンは現在までに報告されていない。予備実験として行なった結合実験では非修飾ヒストン H3 と HP1/Swi6 の結合という驚くべき結果も観察しており、HP1/Swi6 が転写終結点付近へ濃縮される分子メカニズムと濃縮された HP1/Swi6 の持つ生物学的意義解明を FACT や他の結合因子との共役という観点から研究計画の要とする。

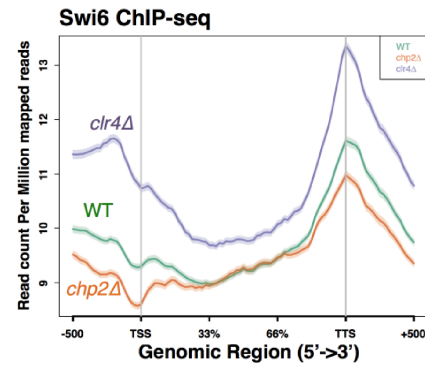


図1 HP1/Swi6はヒストンH3K9メチル化酵素Clr4非依存的に転写終結点近傍に結合している。

2. 研究の目的

(1)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 と結合する因子の探索

ヘテロクロマチンマークの H3K9 メチル化酵素 *clr4+* 遺伝子存在株と *clr4+* 遺伝子破壊株 (*clr4Δ* 株) を用いて分裂酵母 Swi6 のプロテオミクス解析を行ない、それぞれの結合因子を比較する。最終的に *clr4Δ* 株でも Swi6 と結合するタンパク質群を決定して得られた因子の遺伝子破壊を行い、分裂酵母の表現型解析からその役割を考察する。

(2)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 が転写終結点に結合する分子基盤の解明

現在までに報告されている Swi6 の生化学的特徴に加えて、いまだ未知の性質を探る。解析には大腸菌で作成したリコンビナント Swi6 と分裂酵母から抽出したネイティブの Swi6 を適宜使いわける。特に Swi6 はヒストン H3K9me を認識するクロモドメイン、ホモダイマーを形成しエフェクター因子群と結合するクロモシャドウドメインがよく解析されているが、申請者はこの両者を繋ぐヒンジ領域の活性にも着目しており、詳細な解析を進める。

(3)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 が転写終結点に結合する生物学的意義の解明

申請者は先行研究としてすでに Swi6 の ChIP-seq 解析に着手しており、個々の遺伝子に関しても Swi6 が転写終結点に強く結合するものと、弱く結合するものの分類分けを試みている。のちの解析を容易にするため、Swi6 が強力に結合する転写終結点を持つ遺伝子をモデルとして、既存の Swi6 変異体を上手く活用しながら転写終結点で Swi6 が一体何をなっているのかを解明する。

3. 研究の方法

(1)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 と結合する因子の探索

野生型分裂酵母株と *clr4Δ* 株から結合因子を網羅的に解析する為、マイルドなバッファー条件下で Swi6 タンパク質を大量に精製して LC-MS/ms 解析を行った。野生株と *clr4Δ* 株で得られた結

合因子を比較して *clr4Δ*株においても有意に結合を示した因子である Sap1 と Hmo1 に着目して遺伝子破壊を行い、遺伝学的解析からユークロマチンとヘテロクロマチンで両者の果たす役割を調べた。

(2)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 が転写終結点に結合する分子基盤の解明
Swi6 ChIP-seq 結果を基にしてユークロマチン上で機能している Swi6 について、特に転写終結点近傍へ集積するメカニズムを解析した。リコンビナント HP1/Swi6 の発現精製系を確立させて、まずはどのようなヒストンテイルを識別するのかわ修飾型合成ペプチドとのペプチドプルダウンによって解析を進めた。この解析で特異的結合を示した H3K9me 以外の修飾を同定して、それが生体内でどのような分布を示しているのかわ修飾ヒストンテイルを認識する抗体を用いた ChIP-qPCR で評価した。

(3)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 が転写終結点に結合する生物学的意義の解明
転写終結点近傍で濃縮する HP1/Swi6 について Swi6 変異体とその結合因子変異体を作成した時に転写産物の長さの変化とアンチセンス鎖からの転写産物の発現量を RNA-seq と RT-qPCR で解析した。またこの転写終結点近傍への集積メカニズムについてモデルとした遺伝子のセンス/アンチセンス切り替えメカニズムの存在を発見し、切り替えに関わる転写抑制因子と HP1/Swi6 の共役について今後の研究の方向性を新しく見出した。

4. 研究成果

(1)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 と結合する因子の探索
ヒストン H3K9me 非依存的にも結合する因子として同定した Sap1 と Hmo1 について遺伝子破壊を行わずにヘテロクロマチンへ及ぼす影響を確認したところ、Sap1 は DNA 複製と共役してヘテロクロマチン形成領域内へ強く結合していることが明らかになった。またユークロマチン場への結合は Swi6 に部分的に依存しているものもあるが、多くはヒストン H4 のアセチル化と相関している結果を得た。Hmo1 に関しても同様の解析を行い、ヘテロクロマチン形成領域内に局在することが明らかになった。特に興味深いことに Hmo1 はヘテロクロマチン形成領域内で転写を促進する活性があることを見出した。これは RNAi を活性化して転写後サイレンシングへ関与している可能性を示している。また Hmo1 のユークロマチン上への結合を調べたところ転写終結点への局在が明らかとなった。現在までの報告では Hmo1 は rDNA 転写ユニット場でアクティブに転写されているユニット内の転写マークとして機能することが報告されているが本解析から新たにユークロマチン上でも機能していることが明らかになった。

(2)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 が転写終結点に結合する分子基盤の解明
分裂酵母 HP1 ホモログの Swi6、Chp2 をリコンビナントで発現精製してヒストンペプチドとの結合実験を行なって非修飾 H3 テイルへの結合活性と H3K4me に強力な結合阻害効果を見出した。K4 近傍は HP1 のクロモドメイン認識から外れた部位であり、今後はこの原因を構造化学的に解明する必要がある。Swi6 の集積を観察した転写終結点近傍では非修飾型 H3 の濃縮と H3K4me の排除が起きており、生化学的な解析結果をサポートする結果となっている。

(3)ヒストン H3K9me 非依存的に HP1/Swi6 が転写終結点に結合する生物学的意義の解明
転写終結点近傍で濃縮する HP1/Swi6 について強力に転写されている *adh1* 遺伝子をモデル遺伝子として Swi6 変異体とその結合因子変異体を作成した時に転写産物の長さの変化とアンチセンス鎖からの転写産物の発現量を RNA-seq と RT-qPCR で解析した所、センス鎖側の転写産物には顕著な変化は見受けられなかった。一方でアンチセンス鎖の転写産物は *swi6* 変異体や結合因子変異体で転写量の増幅を確認した。*adh1* のアンチセンス鎖の転写制御システムを詳細に調べたところ、このアンチセンス鎖は培地中の亜鉛濃度に依存して強力な抑制を受けていることを突き止めた(図2)。細胞内の亜鉛イオンは細胞の恒常性に大きな影響を与える重要な意味を持ち、亜鉛の欠乏に対応するシステムに遺伝子発現抑制機構が備わっていることは極めて興味深い。現在までの報告でこの抑制に Loz1 が関わるということが報告されており、Loz1 と HP1/Swi6 の共役による *adh1* アンチセンス鎖の転写抑制機構が予想される。

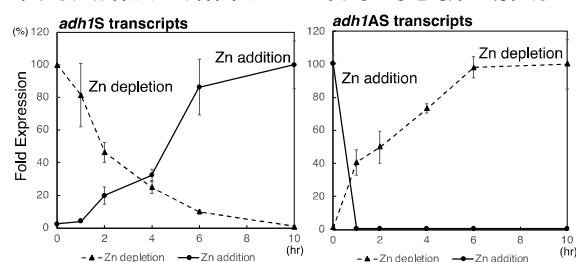


図2 *adh1* 遺伝子の転写産物は培地中の亜鉛の有無に応じて抑制メカニズムが働きセンス(*adh1S*)とアンチセンス(*adh1AS*)が切り替わる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 0件）

1. 著者名 Kasahara K, Takahata S, Kokubo T.	4. 巻 94
2. 論文標題 Transcriptional activation is weakened when Taf1p N-terminal domain 1 is substituted with its Drosophila counterpart in yeast TFIID.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes Genet Syst.	6. 最初と最後の頁 51-59
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1266/ggs.19-00001	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 Sorida M, Hirauchi T, Ishizaki H, Kaito W, Shimada A, Mori C, Chikashige Y, Hiraoka Y, Suzuki Y, Ohkawa Y, Kato H, Takahata S, Murakami Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Regulation of Ectopic Heterochromatin-Mediated Epigenetic Diversification by the JmjC Family Protein Epe1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS Genet .	6. 最初と最後の頁 e1008129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1008129	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高畑信也、鈴木詔大、大沼葵、千田早織、村上洋太
2. 発表標題 ヒストンH3K9me非依存的に働く分裂酵母HP1/Swi6の機能解析
3. 学会等名 第11回日本エピジェネティクス研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 高畑信也、村上洋太
2. 発表標題 ヘテロクロマチン維持に必須なFACTの解析
3. 学会等名 第91回日本遺伝学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高畑信也、村上洋太
2. 発表標題 HP1/Swi6-CSDのサイレンシングエフェクター識別機構
3. 学会等名 第37回染色体ワークショップ・第18回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高畑信也、村上洋太
2. 発表標題 ヘテロクロマチン維持に必要なFACTの解析
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会
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
---------------------------	-----------------------	----