

平成22年 5月24日現在

研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19370072  
 研究課題名（和文） 染色体維持・伝達におけるヘテロクロマチンを構成する3種類のHP1の役割分担  
 研究課題名（英文） The distinct function of three subtypes of HP1 in mechanisms of genetic inheritance  
 研究代表者  
 小布施 力史（Obuse Chikashi）  
 北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授  
 研究者番号：00273855

## 研究成果の概要（和文）：

遺伝情報を担う染色体上の重要な構造として DNA が密に折りたたまれて凝縮しているヘテロクロマチンが知られています。このヘテロクロマチンの構成タンパク質である HP1 にはよく似た3種類（a、b、g）があり、それぞれ異なる機能を発揮しています。本研究によりそれぞれの HP1 に結合するタンパク質を同定したところ、1）多くのタンパク質が同じ様式で HP1 に結合している事、2）HP1 と結合タンパク質との働きを制御する POGZ というタンパク質が存在すること、3）全ての HP1 に結合するタンパク質、それぞれの HP1 にのみ結合するタンパク質が存在する事、を明らかにしました。

## 研究成果の概要（英文）：

Heterochromatin protein 1 (HP1) plays a critical role in heterochromatin formation and mitotic progression through interaction with various proteins. In this study, we tried to identify binding proteins of HP1 subtypes,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , by proteomic approach. We revealed that 1) all subtypes binds many kinds of protein through a similar way, 2) a protein newly identified as HP1 binding, POGZ, binds to HP1 and regulates HP1 binding of other protein, 3) there are several proteins those can bind to a specific subtype of HP1, those may provide specific characterization of each HP1 subtype.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2008年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：染色体・ヘテロクロマチン・HP1・定量プロテオミクス・質量分析・インフォマティクス・クロマチン・細胞周期

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体は細胞周期に依存して凝縮と脱凝縮を繰り返している。すなわち、分裂期に先駆けて凝縮し、分配された後に速やかに脱凝縮される。その中で、ヘテロクロマチンは細胞周期をとおして常に凝縮している特殊な染色体領域として 1920 年代に発見された。凝縮が遺伝子発現に及ぼす影響は、ショウジョウバエの眼の斑入りの現象として報告され、位置効果として知られている。HP1 は、位置効果を促進、あるいは抑圧する 100 種類以上の変異遺伝子のひとつとして同定され、テロメアやセントロメアなどの繰り返し配列上に形成されるヘテロクロマチン領域に局在し、ヘテロクロマチン化と遺伝子発現抑制能を持つことが示されている。

分化プログラムにおける発現制御において、ヘテロクロマチンの形成制御は重要な役割を果たしている。その制御には、染色体の間期での核内配置や複製時期が重要な意味を持つことが示唆されている。従って、細胞周期の基本的なイベントである染色体複製が、ヘテロクロマチンを介した分化プログラムに連動していると考えられる。一方で、ヘテロクロマチンは、セントロメア、テロメア領域などの反復配列上に形成されており、遺伝子発現の制御のみならず、染色体の維持、伝達に重要な役割をしている。

近年 HP1 は、RNA 干渉による発現制御の最終的なターゲットとして注目を浴びている。また、HP1 のあるサブタイプはヘテロクロマチンではなく、ユークロマチン領域にも局在すること、また、配列特異的な転写因子と相互作用することにより、プロモーター領域に誘導され、特異的な遺伝子の発現制御に関与していることが示唆されている。このように、HP1 が染色体上に如何にローディングされるかについて、近年、多くの知見が得られてきたが、HP1 が如何にヘテロクロマチンの特性に寄与するのか、如何に遺伝子の機能発現の制御に関わっているかについては、その分子的な説明はほとんどない。

## 2. 研究の目的

染色体の複製、分配、末端維持、情報発現において、ヘテロクロマチンが、どのような働きをしているかについて理解を深めることを大きな目的とした。また、HP1 には HP1  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  というサブタイプが存在し、細胞内での局在やリン酸化の違いが指摘されている。しかしながら、分子的な機能分担に関する明確な説明はない。

本研究課題では、HP1 と結合するタンパク質を質量分析を用いたプロテオミクスによる網羅的な同定、定量により、それぞれのサブタイプについて、どのような因子とどのように結合しているのかを明らかにすることを目的とした。これを 3 種類のサブタイプの間で比べることにより、その役割分担を解明することができると期待した。また、これらの解析をとおして、染色体の維持・伝達における HP1 の役割、HP1  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の役割分担が分子の観点から明らかになるものと考えた。さらに、RNA 干渉法などを用いた遺伝学的な手法を用いて、機能との関わり、HP1 との上流、下流の関係、他の染色体機能領域構築因子との関係を明らかにすることを旨とした。

## 3. 研究の方法

(1) Flag-tag を付加した HP1 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  を発現するヒト培養細胞 (HeLa 細胞および 293 細胞) を樹立した。また、HP1 $\alpha$  については、クロモドメインのみ持つもの、クロモシャドウドメインのみ持つもの、ダイマーをつくらぬ点変異、PxXxL モチーフと結合しない点変異などを持つ変異 HP1 $\alpha$  にそれぞれ Flag-tag を付加したものを発現する 293 細胞を樹立した。

(2) それぞれの HP1 発現細胞株の核抽出液から Flag-tag に対する抗体を用いて免疫沈降を行った。それぞれの免疫沈降産物を質量分析により解析し、それぞれの HP1 に由来するタンパク質に結合する因子を同定した。免疫沈降は三回行い、質量分析による測定は 2 回行った。

(3) HP1 $\alpha$  の免疫沈降産物から 1000 種類のタンパク質を同定した。1) HP1 タンパク質と有為に結合しているもの、2) 再現性よく結合しているもの、という 2 つの指標により、82 種類を HP1 結合タンパク質とした。また、それぞれの HP1 $\alpha$  由来タンパク質に対する親和性のパターンにより、インフォマティクスによりクラスタリングした。

(4) HP1 結合タンパク質として同定された機能未知因子について、1) 2 ハイブリッド法による HP1 との相互作用様式の解析、2) RNA 干渉法による機能阻害時の表現型の解析、3) 変異タンパク質などの強発現によるドミナントネガティブ表現型の解析、4) HP1 結合因子についての更なる相互作用因子の探索、などを行い、HP1 結合因子としての機能の解析を行った。

(5) HP1 $\beta$ 、 $\gamma$  の結合因子の探索を HP1 $\alpha$  と同様にを行い、それぞれのサブタイプに結合する因子を同定した。

#### 4. 研究成果

(1) HP1a 由来タンパク質の免疫沈降産物をプロテオミクスを用いて解析したところ、Mis12、CAF1、KAP1 に加えて、Aurora B、Borealin など CPC 複合体の構成因子や POGZ など新規 HP1 結合因子を含む 82 種類のタンパク質を同定した。同定した全ての HP1 結合因子は HP1 のクロモシヤドドメイン (CSD) に結合し、HP1 のダイマー形成が必要であることが示唆された。CAF1 や KAP1 などの多くの因子は HP1 結合コンセンサスを介して HP1 と結合しており、HP1 のダイマー形成により生じる疎水ポケットの形成に必要なアミノ酸の変異により結合できなくなる。しかしながら、この変異に影響を受けない POGZ など数種類の因子が存在することが明らかとなり、疎水ポケットを介さない新たな結合様式の存在が明らかとなった。また、ある種のヒストン修飾酵素などは、ヒストン H3 のテールの認識と結合に関与しているクロモドメイン (CD) のアミノ酸の変異に影響を受けた。このことから、CSD だけでなく CD も HP1 と相互作用因子との結合様式に何らかの関わりがあることが示唆された。

(2) 同定した82種類のHP1結合タンパク質のうち21種類はKRABドメインを持つジンクフィンガータンパク質であった事から、HP1を基点としたKRABジンクフィンガータンパク質ネットワークが想定された。KRABジンクフィンガータンパク質のひとつZNF483について相互作用因子の網羅的な同定を試みたところ、HP1に結合するコリプレッサーであるTIF1βが効率よく検出された。一方で、ZNF483以外のKRABジンクフィンガータンパク質およびHP1は同定されなかった。逆に、Flag-tagしたTIF1βを安定発現するヒト293細胞を樹立し、免疫沈降を行ったところ、HP1と結合しているものも含む40種類のKRABジンクフィンガータンパク質が同定された。また、HP1も効率よく共精製される事がわかった。これらの結果より、HP1には多種類のKRABジンクフィンガータンパク質が結合するが、KRABジンクフィンガータンパク質間では相互作用しない事、TIF1βに複数のKRABジンクフィンガータンパク質が同時に結合するのではなく、それぞれのKRABジンクフィンガータンパク質とTIF1βが1対1で相互作用している事が示唆された。また、TIF1βは多くの種類のKRABジンクフィンガータンパク質と結合する事がわかった。HP1はTIF1βのような多種類のタンパク質と結合できるタンパク質と直接結合することにより、HP1自身の局在や機能に多様性を付加しているものと考えられた。

(3) HP1結合因子として同定したPOGZの機能阻害によって、HP1およびAurora Bキナーゼ、

INCENPがM期染色体腕部から解離しないこと、Aurora Bキナーゼの活性化が起こらないことが明らかとなった。さらに、HP1とPOGZとの相互作用の詳細な解析により、他のHP1結合因子がPxVxLモチーフを介してHP1と結合するのに対して、POGZは特殊なZnフィンガーを介してPxVxLタンパク質と競合的にHP1と結合することが明らかになった。M期前期の細胞において、POGZはこの競合的な結合により、HP1と結合しているINCENPおよびHP1を染色体から解離させる役割があることが明らかとなった。また、この過程はAurora Bの活性化に必要であることを見いだした。Aurora BのM期における活性化は、キネトコア形成、チェックポイントの確立など正常な染色体分配に必要な不可欠であり、その制御にPOGZがHP1を介して関与がするモデルを提案することができた。また、POGZ以外の新規HP1結合因子3種類について、機能解析を行った。1種類はSUMO化を介したHP1の局在化の促進に関与すること、1種類はpoIIIと直接結合して転写制御に関与すること、もう1種類はX染色体の不活性化に関与する因子の局在に関与することが示唆された。

(4) HP1α結合因子の探索と同様に、HP1βとHP1γについても結合因子を同定したところ、HP1αと同様にそれぞれ100種類以上の結合タンパク質を見いだした。そのうち、50種類は全てのサブタイプに共通の因子であったが、残りの50種類については、それぞれのHP1特異的あるいは、3種類のうち2種類に特異的に結合する因子であることがわかった。このサブタイプによる結合因子の違いがそれぞれのサブタイプの局在あるいは機能の違いに貢献していることが強く示唆された。興味深いことに、HP1βには、DNA複製に関与するポリメラーゼ複合体、ヒストンシャペロン、クロマチンリモデリング複合体が見いだされ、HP1αあるいはHP1γとの機能の違いが示唆された。また、KRAB-ZNFタンパク質は、その種類によって結合するHP1のサブタイプが異なることが明らかとなった。KRAB-ZNFタンパク質はTIF1βを介してHP1と結合することが知られている。われわれの解析によりHP1とTIF1βとの結合にはHP1のサブタイプによる特異性がないこと、TIF1βとKRAB-ZNFタンパク質との結合にもKRAB-ZNFタンパク質の種類による特異性がないことが明らかとなった。これらのことから、それぞれの種類のKRAB-ZNFタンパク質はTIF1βと複合体形成することにより、結合するHP1のサブタイプへの特異性を獲得することが示唆された。これらの知見は、3種類のHP1が如何にそれぞれ異なる機能を獲得しているのかを解明する手がかりになると思われる。

#### 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 16 件)

1. Human POGZ modulates HP1 dissociation from mitotic chromosome arms through Aurora B activation, Nozawa R., Nagao K., Masuda H, Iwasaki O., Hirota T., Nozaki N., Kimura H. and Obuse C. *Nature Cell Biol.*, in press. (査読有)
2. Inner Centromere Formation Requires hMis14, a Trident Kinetochore Protein That Specifically Recruits HP1 to Human Chromosomes. Kiyomitsu T., Iwasaki O., Obuse C. and Yanagida M. *J. Cell Biol.*, **188**: 791-807, 2010. (査読有)
3. The E3 ligase TTC3 Facilitates Ubiquitination and Degradation of Phosphorylated Akt. Suizu F., Hiramuki Y., Okumura F., Matsuda M., Okumura J. A., Hirata N., Narita M., Kohno T., Yokota J., Bohgaki M., Obuse C., Hatakeyama S., Obata T. and Noguchi M. *Dev. Cell*, **17**: 800-810, 2009. (査読有)
4. Active Establishment of Centromeric CENP-A Chromatin by RSF Complex. Perpelescu M., Nozaki N., Obuse C., Yang H. and Yoda Y. *J. Cell Biol.*, **185**: 397-407, 2009. (査読有)
5. The Augmin Complex Plays a Critical Role in Spindle Microtubule Generation for Mitotic Progression and Cytokinesis in Human Cells. Uehara R., Nozawa R., Tomioka A., Petry S., Vale R.D., Obuse C. and Goshima G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**: 6998-7003, 2009. (査読有)
6. Human Blinkin/AF15q14 Is Required for Chromosome Alignment and the Mitotic Checkpoint through Direct Interaction with Bub1 and BubR1. Kiyomitsu T., Obuse C. and Yanagida M. *Dev. Cell*, **13**: 663-676, 2007. (査読有)
7. Alpha-Klotho as a Regulator of Calcium Homeostasis. Imura A., Tsuji Y., Murata M., Maeda R., Kubota K., Iwano A., Obuse C., Togashi K., Tominaga M., Kita N., Tomiyama K., Iijima J., Nabeshima Y., Fujioka M., Asato R., Tanaka S., Kojima K., Ito J., Nozaki K., Hashimoto N., Ito T., Nishio T., Uchiyama T., Fujimori T. and Nabeshima Y-I. *Science*, **316**: 1615-1618,

2007. (査読有)

8. Helicobacter Pylori CagA Targets PAR-1/MARK Kinase to Disrupt Epithelial Cell Polarity. Saadat I., Higashi H., Obuse C., Umeda M., Kamiya M.K., Saito Y., Lu H., Ohnishi N., Azuma T., Suzuki A., Ohno S. and Hatakeyama M. *Nature*, **447**: 330-333, 2007. (査読有)
9. Priming of Centromere for CENP-A Recruitment by Human hMis18 $\alpha$ ,  $\beta$  and M18BP. Fujita Y., Hayashi T., Kiyomitsu T., Toyoda Y., Kokubu A., Obuse C. and Yanagida M. *Dev. Cell*, **12**: 17-30, 2007. (査読有)

[学会発表] (計 46 件)

1. 野澤竜介、長尾恒治、榊田浩孝、小布施力史 HP1相互作用因子 POGZ/ZNF280EはM期における AuroraBキナーゼの染色体腕部からの解離と活性化に寄与する 第27回染色体ワークショップ、2010年1月20日-22日、御殿場市
2. 位上健太郎、野澤竜介、榊田浩孝、小布施力史 新規HP1結合因子HPB85の機能解析 BMB2009、2009年12月9日-12日、横浜
3. 野呂絵美子、野澤竜介、小布施力史 ヘテロクロマチンタンパク室HP1を介したKBAB-ZNFタンパク質ネットワークの解析 BMB2009、2009年12月9日-12日、横浜
4. 岡田晃明、野澤竜介、小布施力史 脱SUMO化活性のある新規HP1結合因子、SEN7の機能解析 BMB2009、2009年12月9日-12日、横浜
5. 野澤竜介、長尾恒治、榊田浩孝、小布施力史 プロテオミクスによるヘテロクロマチンの構築とダイナミクスの解明 BMB2009、2009年12月9日-12日、横浜
6. Obuse, C. An HP1 binding protein POGZ has pivotal role in mitotic chromosome organization in human cells International mini-symposium on chromosome biology : Centromeres to telomeres and the chromatin between 2009年11月5日、札幌市
7. Nozawa, R., Nagao, K., Obuse, C. A

- HP1-interacting ZINC-FINGER protein SHAL5/POGZ/ZNF280E is involved in mitotic chromosome segregation EMBO conference series on nuclear structure and dynamics, 2009年9月28日-10月6日, L'Isle sur la Sorgue, France
8. Nozawa, R., Nagao, K., Obuse, C. A HP1-interacting ZINC-FINGER protein POGOZ/ZNF280E is involved in mitotic chromosome segregation Keyston Symposia "Chromatin Dynamics and Higher Order Organization", 2009年2月25日-3月2日, Idaho
  9. 野澤竜介、長尾恒治、岩崎治、榊田浩孝、小布施力史 新規HP1相互作用因子であるジンクフィンガータンパク質 POGZ/ZNF280Eは染色体分配に関与する BMB2008、2008年12月9日-12日、神戸
  10. Nozawa, R., Nagao, K., Masuda, H., Obuse, C. A HP1-Interacting zinc-finger protein POGOZ/ZNF280E is involved in mitotic chromosome CSHL meeting on Dynamic organization of nuclear function 2008年9月17日-9月21日 New York
  11. 野澤竜介、長尾恒治、岩崎治、小布施力史 (2007) プロテオミクスによるヒトヘテロクロマチンタンパク質HP1と相互作用する因子の網羅的な解析. BMB2007、2007年12月11日-15日、横浜
  12. 野澤竜介、長尾恒治、岩崎治、小布施力史 (2007) ヒトヘテロクロマチンタンパク質HP1と相互作用因子のプロテオミクス解析. 第7回核ダイナミクス研究会、2007年9月25日-27日、札幌
  13. Seki, T., Ohta, S., Obuse, C. (2007) Identification and characterization of novel human ORC binding proteins, CSHL meeting on Eukaryotic DNA replication & genome maintenance, 2007年9月5日-9日, New York
  14. Nozawa, R., Nagao, K., Iwasaki, O., Obuse, C. (2007) Comprehensive proteomic analyses of human heterochromatin protein 1 (HP1) interacting, CSHL meeting on Eukaryotic DNA replication & genome maintenance, 2007年9月5日-9日, New York

〔図書〕 (計 4 件)

1. (書籍)「プロテオミクス」、「ゲノミクス」、「インフォーマティクス」の項. 小布施力史, (2009). 『分子生物学』(柳田充弘・西田栄介・野田亮編:改訂版), 東京化学同人, 129-133
2. (総説)染色体を構築する複合体のプロテオミクス解析. 明日を拓く新次元プロテオミクス, 長尾恒治, 野澤竜介, 小布施力史, (2009). 細胞工学(別冊)81-90.
3. (総説)ヘテロクロマチン結合因子とその機能. 細胞核—遺伝情報制御と疾患, 野澤竜介, 小布施力史, (2009). 実験医学(増刊)27,123-130.
4. (総説)プリンキン-紡錘体形成チェックポイントと微小管結合に必須なキネトコアタンパク質. 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), 清光智美, 小布施力史, 柳田充弘, (2009). タンパク質・核酸・酵素(増刊)54,421-426.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.lfsci.hokudai.ac.jp/labs/infgen/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小布施 力史 (Obuse Chikashi)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号：00273855

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし