

平成 21 年 5 月 25 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770152

研究課題名 (和文) クロマチン制御機能ネットワークの理解に向けた複合体解析

研究課題名 (英文) Protein complex analysis for the Chromatin regulation and its functional network

研究代表者

田上 英明 (TAGAMI HIDEAKI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科・准教授

研究者番号：70273216

研究成果の概要：本研究ではヒストン複合体解析を通してクロマチン形成の分子機構、および動的なクロマチン制御を介する細胞機能の解明を目指した。酵母をモデル系として、様々な条件下におけるヒストン複合体を精製し、ヒストン相互作用因子ネットワークとそのダイナミクス解析を行った。酵母やヒトのヒストン複合体を比較することでクロマチン形成の共通の分子基盤と戦略のバリエーションが示唆された。また、ヒストンシャペロン FACT が複製や転写だけでなく、よりグローバルにヒストン H2A/H2B をクロマチンから解離させるという興味深い結果を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,100,000	0	2,100,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	390,000	3,790,000

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：ヒストン、タンパク質複合体、クロマチン制御

1. 研究開始当初の背景

クロマチン情報は一過的な遺伝子発現調節に重要な役割を果たすだけでなく、細胞分裂後も維持されることにより、エピジェネティクス機能を持つことが明らかとなっている。

研究開始当初においても、国内外において

「ヒストンコード」に代表される詳細な化学修飾やリモデリング複合体などクロマチン制御解析が活発に行われていた。また、S 期におけるヒストンの染色体への挿入は、DNA 複製機構と同様に厳密に制御されるべき事象であり、癌などにおけるゲノム不安定化とも密接に関わることが明らかとなりつつあ

った。しかし、クロマチン制御は可塑的かつダイナミックであることから、その動態について、分子機構から細胞機能、さらには高次生命システムを理解することが重要課題の1つとなると思われた。

研究代表者は、ヒト培養細胞において、各種ヒストンをクロマチンに挿入する装置を精製する独自の実験手法を確立していたが、エクソピクにエピトープタグを付加するという技術的な問題と、がん化している培養細胞では、前述したゲノム安定性など厳密な制御が既に破綻していることが懸念された。

そこで、本研究課題においては、分子遺伝学的な解析も容易な酵母をモデル系として、ゲノム上の目的遺伝子に直接タグを付加して、その複合体を精製した。複合体構成因子の同定とその機能について解析することで、ダイナミックなクロマチン制御ネットワークを網羅的・統合的に理解できることが期待された。さらに、クロマチン構造はDNA複製や転写、DNA修復といった様々な制御と密接に関わるため、ヒストンと相互作用する因子群をそれぞれ機能複合体として解析することが重要であると考えられた。複合体精製を機能ネットワークの生化学的スクリーニングとして捉えることで、クロマチン制御複合体の生理機能の理解に繋げることを試みた。

2. 研究の目的

本研究はヒストン及び、クロマチン関連複合体解析を通してクロマチン形成やエピジェネティック情報維持の分子機構、および動的なクロマチン制御を介する細胞機能の解明を目指すものであり、具体的に次の課題を遂行した。

課題1：複合体精製法によるヒストン相互作用因子ネットワーク解析：分子遺伝学的手法も容易な酵母をモデル系として、種々のヒストン複合体の機能解析を進めることを目的とした。ヒストンと相互作用する全ての因子を同定すると同時に、それらの生理機能を生化学的、遺伝学的に解析する。ヒストン結合因子についても同様の解析を進めることにより、俯瞰的にヒストン相互作用因子群をスクリーニングする。また、細胞周期やストレス応答時における一過的な相互作用についても細胞固定によるヒストン複合体スナップショット系を確立することによりダイナミックなクロマチン制御の分子基盤に迫る。

課題2：生理的クロマチン再構成系の構築：課題1で同定されるクロマチン制御複合体の生理的機能を *in vitro* アッセイシステムを構築することにより解析する。複合体同士の機能的相互作用についても検討することで、生理的クロマチン再構成系の構築を目

指す。生理的クロマチン再構成系は、クロマチン構造形成だけでなく、クロマチン上で起こる転写や複製等の分子メカニズムを理解する上で必須であると考えられた。

3. 研究の方法

出芽酵母、分裂酵母ゲノムの各種ヒストン遺伝子に直接 FLAG/HA エピトープタグを付加し、生理的条件に近い低塩条件や各種薬剤添加時などにおけるヒストン複合体のダイナミクス解析を行った。精製したヒストン複合体の生化学的特性について、Glycerol 密度勾配遠心法や構成因子の抗体を用いた相互免疫沈降法などによりヘテロジェネイティを検討した。それぞれ単一の複合体の構成成分を質量分析により同定するとともに、構成因子についても複合体解析を行うことにより、機能的相互作用ネットワークの理解を試みた。

また、一過的な相互作用についてはフォルムアルデヒド細胞固定によるヒストン複合体スナップショット系を確立することにより、ダイナミックなクロマチン構造形成とヒストンメタボリズム制御機構の解明を目指した。

生理的クロマチン再構成系は、クロマチン形成だけでなく、クロマチン上で起こる転写や複製等の分子メカニズムを理解する上で必須であるが、ヒストン複合体の構成成分として検出されなかった既存のヒストンシャペロンについては、それぞれエピトープタグを付加した細胞株を構築し、それぞれ機能複合体として精製することを試みた。

S 期におけるヒストンの染色体への挿入は、DNA複製機構と同様に厳密に制御されるべき事象であり、癌などにおけるゲノム不安定化とも密接に関わることが明らかとなりつつある。S 期以外においてもヒストンはダイナミックにクロマチン構造を変換させ、遺伝子発現やDNA修復など様々なDNAメタボリズムに関与する。細胞周期依存的なヒストン複合体を解析することで、制御因子や特異的修飾などを明らかにするとともにヒストン複合体のダイナミクスについても解析した。また、UVや化学物質等によるDNA損傷修復時におけるヒストン複合体の変化を解析することにより、ダイナミックなクロマチン構造変換についても新たな知見が得られると期待した。

4. 研究成果

分子遺伝学的手法も容易な酵母をモデル系として、種々のヒストン複合体の機能解析を進めた。出芽・分裂酵母のヒストン遺伝子および数種のクロマチン関連因子にエピトープタグを付加して複合体精製を行った。精

製した各種ヒストン複合体について、グリセロール密度勾配遠心法によりヘテロジェネイティ等を詳細に検討した。

出芽酵母、分裂酵母、ヒトから精製したヒストン H3/H4 複合体が異なり、Asf1 以外のいわゆるヒストンシャペロンの存在に顕著な違いが見られた。このことは、クロマチン形成の共通の分子基盤と戦略のバリエーションを示唆するものと考えられる。現在、出芽酵母において、それらヒストンシャペロン因子群についてもエピトープタグを付加した株を構築しており、複合体同士の分子機能について、*in vitro* 再構成系を用いて検討しているところである。生理的クロマチン再構成系は、クロマチン形成だけでなく、クロマチン上で起こる転写や複製等の分子メカニズムを理解する上で必須であると考えている。

また、ヒストン遺伝子の 3' UTR 領域の新たな機能や大量発現による複合体形成異常などダイナミックな制御システムを理解する上での問題点を浮き彫りにした。細胞周期依存等の一過的な相互作用や比較的弱い相互作用について解析を進めるため、細胞固定によるヒストン複合体スナップショット系を確立した。

また、出芽酵母の主要 H2A と H2B については *hta1*, *hta2* および *htb1*, *htb2* 遺伝子全てについて精製を行った結果、複合体のヘテロジェネイティはあるものの主要な H2A-H2B 複合体には、ヒストンシャペロンである Nap1 やカリオフェリン Kap114 に加えて Spt16-Pob3 (FACT) が主要構成因子として含まれていた。

FACT は転写中などにヒストン H2A/H2B をヌクレオソームから解離させる活性を持つことが *in vitro* で示されていたが、転写阻害剤等を含めた各種薬剤の影響について解析した。さらにフォルムアルデヒド固定をはじめとした様々な条件下において、精製を行う複合体スナップショット解析計を構築した。その結果、酵母においてヒストンシャペロン FACT が複製や転写だけでなく、よりグローバルにヒストン H2A/H2B をクロマチンから解離させるという興味深い結果を得た。ヒストンダイナミクスとその生理的機能について現在解析を進めており、論文投稿準備中である。

機能単位として複合体を解析することはプロテオミクスと生物学的機能解析の両方の特性を併せ持ち、細胞の分子機能を明らかにする強力なアプローチとなる。俯瞰的にヒストン相互作用因子機能ネットワークの探索を行うことは単なるプロテオミクスによるカタログ作りではなく、将来的により有機的な生命機能システム構築を目指す分子基盤としても捉えられる。網羅的にある一定の条件で全てのタンパク質について複合体精製を行う場合は巨大プロジェクトとならざ

るを得ず、実際に世界中でタンパク質相互作用のデータベース化は進んでいる。しかし、重要なのはそれらの相互作用の生理的意義であり、如何にして細胞機能と結びつけるかが鍵であることに間違いのないであろう。本研究において確立した機能複合体解析法は、他の研究分野においても応用可能であり、新旧の解析手法を組み合わせるだけでない新研究領域の創造など大きな波及効果も期待される。また、当然これらの研究成果は、基礎生命科学における知的好奇心を満足させるだけでなく、将来的にポストゲノム時代の医療やバイオテクノロジー技術開発のためのシーズとなることも期待される。

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 5 件)

- ① Alejandra Loyola, Hideaki Tagami, Tiziana Bonaldi, Danièle Roche, Jean Pierre Quivy, Axel Imhof, Yoshihiro Nakatani, Sharon YR Dent, and Geneviève Almouzni The HP1 α -CAF-1-SetDB1 complex provides H3K9me1 for Suv39-mediated K9me3 in pericentric heterochromatin. EMBO Reports (2009) accepted (論文、査読有)
- ② Elaine M. Dunleavy, Danièle Roche, Hideaki Tagami, Nicolas Lacoste, Dominique Ray-Gallet, Yusuke Nakamura, Yataro Daigo, Yoshihiro Nakatani, Geneviève Almouzni-Pettinotti. HJURP, a key CENP-A-partner for maintenance and deposition of CENP-A at centromeres at late telophase/G1. Cell, 137, 487-497 (2009) (論文、査読有)
- ③ Shiori Kohno, Takao Kohno, Yoshimi Nakano, Kenta Suzuki, Moe Ishii, Hideaki Tagami, Atsushi Baba and Mitsuharu Hattori. Mechanism and significance of specific proteolytic cleavage of Reelin. Biochemical and Biophysical Research Communications, 380, 93-97 (2009) (論文、査読有)
- ④ Midori Shimada, Hiroyuki Niida, Doaa H. Zineldeen, Hideaki Tagami, Masafumi Tanaka, Hiroyuki Saito, and Makoto Nakanishi. Chk1 is a histone H3 threonine 11 kinase that regulates DNA damage-induced transcriptional

repression. Cell, 132, 221-32(2008) (論文、査読有)

- ⑤ Shinji Terakura, Yoshihisa Ueno, Hideaki Tagami, Saeko Kitakura, Chiyoko Machida, Hiroetsu Wabiko, Hiroji Aiba, Léon Otten, Hironaka Tsukagoshi, Kenzo Nakamura, and Yasunori Machida. An oncoprotein from the plant pathogen *Agrobacterium* has histone-chaperone-like activity. Plant Cell, 19, 2855-65 (2007) (論文、査読有)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 田上英明 「新規クロマチン因子 Mlo2 とヒストン H3/H4 相互作用」 遺伝研研究会「単細胞における複合システム系の連帯と統合」 2009年3月24日、三島
- ② 保坂いづみ、田上英明 「新規クロマチン関連因子 Mlo2 とヒストン H3/H4 相互作用」 第26回染色体ワークショップ、2009年1月27日、姫路
- ③ 田上英明、加藤麻希 「FACT は出芽酵母ヒストン H2A/H2B ダイナミクスを規定する」 第26回染色体ワークショップ、2009年1月26日、姫路
- ④ 田上英明 「FACT を介した酵母ヒストン H2A/H2B ダイナミクス」 BMB2008 2008年12月10日、神戸
- ⑤ 加藤麻希、田上英明 「出芽酵母 H2A-H2B 複合体の分子解剖」 BMB2008、2008年12月10日、神戸
- ⑥ 田上英明 「酵母ヒストン H2A/H2B から見るクロマチンダイナミクス」 クロマチン研究会、2008年10月22日、三島
- ⑦ Hideaki Tagami and Maki Kato 「FACT MEDIATES HISTONE H2A/H2B DYNAMICS IN YEAST」 International Symposium on Chromosome Dynamics in Ise, 2008年5月28日、三重

[図書] (計 1 件)

- ① 田上英明 「S1 マッピングによる RNA 末端の決定」 『RNA 実験ノート』 上 無敵のバイオテクニカルシリーズ 稲田利文、塩見春彦 編 pp107-113 羊土社 (2008)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田上 英明 (TAGAMI HIDEAKI)

名古屋市立大学・大学院システム自然科学
研究科・准教授

研究者番号：70273216

(2) 研究分担者
該当無し

(3) 連携研究者
該当無し