

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770001

研究課題名（和文） 多機能性転写因子による組換え活性化機構

研究課題名（英文） Functions of multi-functional transcription factors in recombination activation

研究代表者

山田貴富 (YAMADA TAKATOMI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：30451850

研究成果の概要（和文）：遺伝情報の適切な維持に必要な相同組換えが、DNA とヒストンタンパク質等からなる染色体構造の環境下で起こる仕組みを調べている。ここでは、DNA に直接結合して複数の現象に関わを制御する多機能性転写因子の一つ Atf1 が、染色体構造中で相同組換えを活性化する際の特徴を研究した。その結果、Atf1 及びその局在部位周辺のヒストンが特有の修飾状態にあり、それらが組換え活性と関連していることがわかった。これらから、多機能性転写因子が組換えを活性化する際に特有の制御機構が想定される。

研究成果の概要（英文）：We are interested in mechanisms of homologous recombination in chromatin structure. In this study, we focused on a multi-functional transcription factor Atf1, and examined its molecular features in recombination activation. Our study revealed that Atf1 and its surrounding histones have unique posttranslational modification patterns, and such patterns are in close relationship to recombination activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：遺伝ゲノム動態

キーワード：減数分裂 相同組換え 多機能性転写因子 ATF/CREB

1. 研究開始当初の背景

相同組換えは遺伝情報の適切な維持、継承、多様化のために大変重要な反応であり、その反応機構を明らかにすることは極めて意義深い。真核生物においては相同組換えの基質

となる DNA はヒストンなどのタンパク質とともに染色体（クロマチン）構造をとっている。クロマチン構造は高度に凝縮しているため、組換えを遂行する因子群が容易に DNA に接近することができず通常組換え等の反応は抑

制されている。従って生体内における相同組換えの活性化機構を明らかにするためには、組換え部位のクロマチン構造の凝縮度も視野に入れて研究を進める必要がある。

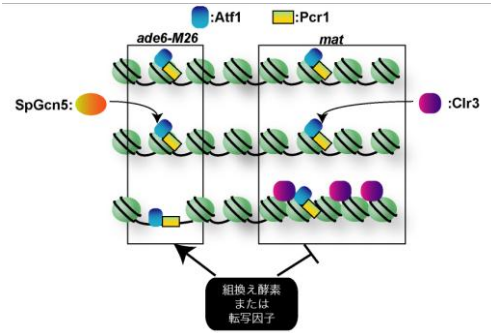
クロマチン構造の凝縮度の制御に重要な因子としてヒストンと、CRE(cAMP response element)と呼ばれるシス因子に配列特異的に結合する ATF/CREB(activating transcription factor/CRE binding)ファミリー転写因子群があげられる。前者は染色体のほぼ全域にわたってDNAと強固に巻き付いている。アセチル化、リン酸化など多様な翻訳後修飾を受けること及びそれらの翻訳後修飾がクロマチンの凝縮度や染色体の代謝現象と密接に関連していることが知られている。一方、ATF/CREBタンパク質は当初転写因子として同定、解析されたが、その後の研究から転写のみならず組換えや修復にも関与することが明らかになっている。分裂酵母のATF/CREBタンパク質 Atf1 と Pcr1 からなるヘテロダイマー(Atf1-Pcr1)はその代表的なもので、転写、相同組換えの活性化、ヘテロクロマチン形成に関与することが知られている。

報告者はそうした多機能性を持つ Atf1-Pcr1 に興味を持ち、特に(1)相同組換えを活性化する際と、(2)ヘテロクロマチンを形成する際の分子作用機序について研究を行い、以下のようなことを明らかにしてきた。(1) 分裂酵母の *ade6-M26* 遺伝子座は減数分裂期特異的な相同組換え頻発部位で、同遺伝子座に結合した Atf1-Pcr1 に依存して組換えが活性化される。報告者らは、*M26* に結合した Atf1-Pcr1 がヒストンアセチル化酵素 Gcn5 を呼び込み、周辺のヒストンをアセチル化することで相同組換えに有利な染色体構造を作り出しているというモデルを提唱した。(Yamada et al. 2004 EMBO J. vol. 23. p. 1792) (2) 分裂酵母のヘテロクロマチン領域の一つである接合型遺伝子座には CRE 配列が存在し、Atf1-Pcr1 がヘテロクロマチン形成に関与していることが知られていた。報告者らは、同遺伝子座に結合した Atf1-Pcr1 がヒストン脱アセチル化酵素 Clr3 を介して周辺のヒストンを脱アセチル化することを見出した(Yamada et al. 2005 Mol. Cell vol. 20. p. 173)。

以上の二つの結果から Atf1-Pcr1 が置かれた状況に適切な因子を呼び込み、それにより

周辺のクロマチン構造が修飾され、適切な染色体現象が進行するというモデルが考えられた(下図)。

しかしながら、Atf1-Pcr1 がいかにして状況を判断するか?いかにして呼び込むべき因子を選択するか?といった点についてはほとんど明らかになっていなかった。組換えの活性化に関しても、それらの問題点は不明であった。



2. 研究の目的

報告者らは染色体構造中での相同組換えの分子機構を明らかにするためには、ATF/CREBファミリータンパク質などの多機能性転写因子とヒストンの役割を明らかにすることが重要と考えている。本研究課題では、報告者自身が一貫して研究してきた分裂酵母の Atf1-Pcr1 をモデル因子とし、相同組換えを活性化する機構を明らかにすることを目的とした。

具体的には、相同組換えが活性化されている減数分裂期の分裂酵母細胞において、Atf1-Pcr1 の分子状態や局在位置周辺のヒストンなどの特徴について調べた。

3. 研究の方法

分裂酵母細胞を同調的に減数分裂に誘導し、解析に供した。(1)では Atf1 依存的な転写の活性化が起こっている細胞群と Atf1 依存的な相同組換えが活性化されている細胞群とで、Atf1 の分子状態の違いを検討した。(2)では、Atf1 依存的な組換え頻発部位周辺のヒストン修飾状態を検討した。

(1) 減数分裂開始直後では Atf1 依存的に減数分裂進行に関わる遺伝子の転写が著しく活性化される。それに対し、減数分裂進入後 3 時間後の細胞では相同組換えが活性化される。そこで、エピトープタグを付した Atf1

を発現する細胞を減数分裂に誘導したあと、経時的に細胞抽出液を調製し、Atf1 をウェスタンブロッティングで解析した。

(2) 先に述べたように、Atf1 はヒストン修飾酵素を呼び込み、自身の結合部位周辺のヒストンを適切に（その後の反応や現象に都合の良いように）修飾すると考えられる。従って、Atf1 依存的な組換え頻発部位周辺のヒストン修飾状態を調べることは、Atf1 による相同組換えの活性化のメカニズムを明らかにする上で重要と思われる。そこで、クロマチン免疫沈降法を用いて、複数の Atf1 依存的な相同組換え頻発部位のヒストン修飾状態を調べた。

4. 研究成果

(1) 減数分裂開始直後から3時間後までについて、Atf1 の SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動上での挙動を調べた。その結果、減数分裂に入って1時間以内に電気泳動度が上昇することがわかった。これは、Atf1 の翻訳後修飾状態が減数分裂の進行とともに変化することを示唆している。上で述べたように、Atf1 は、減数分裂開始直後には主として転写活性化に関わっているのに対し、減数分裂進入3時間後には組換えの活性化にも関与することが知られている。従って、組換えを活性化するには転写を活性化する際とは異なった翻訳後修飾状態にあることが考えられる。

ここで見られた電気泳動度の変化は微細なものであったため、その候補としてリン酸化が考えられた。実際、環境ストレスにさらされた分裂酵母細胞では、Atf1 が SAP (Stress activated protein) キナーゼ等によりリン酸化を受けることが知られている。そこで、Atf1 の分子中にある11のSAPキナーゼリン酸化サイトを全て非リン酸化型に置換した変異株 *atf1-11M* (英国マンチェスター大のウィルキンソン博士から供与された) において Atf1 依存的な相同組換え活性を調べた。その結果、同変異体では野生株の約半分に組換え率が低下することがわかった。以上から、Atf1 が相同組換えを活性化するためには、適切なリン酸化状態をとっていることが必要であると想定し、現在、翻訳後修飾及びその残基の特定を急いでいる。

(2) *ade6-M26* 遺伝子座とその対照である *ade6-M375* 遺伝子座 (ほぼ同じ部位であるが、組換え活性化能を持たない) についてヒストン H3 のリジン9、リジン14およびヒストン H4 のリジン5、リジン8、リジン12、リジン16それぞれのアセチル化状態を検討した。その結果ヒストン H3 リジン9、ヒストン H4 リジン8、リジン16では *M26* の方が有意にアセチル化状態が高かったが、他の残基に関しては両遺伝子座間で違いは見られなかった。このことから *M26* で見られたヒストン高アセチル化には残基特異性があることが明らかになった。

次に *M26* 配列を有する他の組換えホットスポットでも同様の解析を行った。具体的には、*M26* 様配列を *ade6* 遺伝子中の別部位に創出した *ade6-3049* 遺伝子座 (米国フレッドハッチンソン癌研究所のスミス博士から供与された)、*M26* 様配列と Pcr1 に依存して活性化される天然の組換えホットスポットをもつ *cds1* 遺伝子座について解析した。その結果、いずれについても *ade6-M26* で見られたものと同様のアセチル化パターンが見られた。従って、上記のヒストンアセチル化パターンは *M26* 様配列に依存した組換えホットスポットに普遍的なものであることが示唆された。

さらに見出されたヒストンアセチル化パターンが組換え活性と相関があるかどうかを先に述べた *atf1-11M* 変異体とヒストン H3 に対するアセチル化酵素 *gcn5* の破壊体を用いて検討した。*atf1-11M* 変異体同様、*gcn5* 破壊体についても *ade6-M26* での組換え活性が半減することが既に示されていた (Yamada et al. 2004 EMBO J. vol.23. p.1792)。両変異体の *ade6-M26* でのヒストンアセチル化状態は、野生株の *ade6-M26* でのレベルと *ade6-M375* でのレベルの間であった。すなわち、両変異体では *ade6-M26* での組換え活性と特定残基のヒストンアセチル化のいずれも低下していることがわかった。これは *M26* で見られたヒストンアセチル化パターンが組換え活性化と関連があることを示唆している。

一般に、転写活性の高い領域では、ヒストン H3 のリジン9、14が共に高アセチル化されていることが知られている。従って、以上でみられたヒストン修飾パターンは Atf1 が相同組換えを活性化する際に特徴的な物

であることが考えられる。

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 2 件)

1) Kouji Hirota, Tomoyuki Fukuda, Takatomi Yamada, Kunihiro Ohta
Analysis of chromatin structure at meiotic DSB sites in yeasts.
Methods in Molecular Biology (2009)
vol. 557 pp. 253-66. 査読なし

2) Yufuko Akamatsu, Yasuto Murayama, Takatomi Yamada, Tomofumi Nakazaki, Yasuhiro Tsutsui, Kunihiro Ohta, and Hiroshi Iwasaki.
Molecular characterization of the role of the *Schizosaccharomyces pombe nipl+/ctpl+* gene in DNA double strand break repair in association with the Mre11-Rad50-Nbs1 complex
Molecular and Cellular Biology (2008) vol. 28 pp. 3639-3651 査読あり

[学会発表] (計 5 件)

1) 山田貴富 森田智彦 太田邦史
分裂酵母 ATF/CREB ファミリータンパク質 Atf21 の機能解析
第 32 回日本分子生物学会年会
2009 年 12 月
横浜

2) Shintaro Yamada, Takatomi Yamada, and Kunihiro Ohta
Histone modifications around ATF/CREB-dependent meiotic recombination hotspots
The Fifth International Fission Yeast Meeting
October 2009
Tokyo, Japan

3) Takatomi Yamada, Shintaro Yamada, and Kunihiro Ohta
Residue specific acetylations around ATF/CREB-dependent recombination

hotspots in fission yeast
FASEB Summer Research Conferences,
Genetic recombination and genome rearrangements
August 2009
Colorado U. S. A.

4) 山田貴富 森田智彦 太田邦史
ATF/CREB ファミリータンパク質による減数分裂諸現象の総合的制御
第 31 回日本分子生物学会 第 81 回日本生化学会合同大会
2008 年 12 月
神戸

5) 森田智彦 山田貴富(発表者) 松本幸次 太田邦史
分裂酵母 ATF/CREB ファミリータンパク質 Atf21 の機能解析
第 41 回酵母遺伝学フォーラム
2008 年 9 月
札幌

[図書] (計 1 件)

1) 東京大学教養学部基礎生命科学実験編集委員会 (研究代表者を含む)
東京大学出版会
基礎生命科学実験第 2 版
総ページ数 205 ページ

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 貴富(YAMADA TAKATOMI)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号 30451850

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし