

平成22年 5月25日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770005

研究課題名 (和文) 重複しているヒストン遺伝子はすべて等価なのだろうか

研究課題名 (英文) Functional analysis of individual histone genes in fission yeast

研究代表者

高山 優子 (TAKAYAMA YUKO)

久留米大学・分子生命科学研究所・助教

研究者番号：90461467

研究成果の概要 (和文)：重複遺伝子として知られているヒストン遺伝子は、S 期に転写活性化が起こり、細胞成育に必須である。本研究では、個々のヒストン分子の性質について解析を行った。各ヒストン H3 遺伝子の結合因子を分離すると、細胞周期によって異なる分子が結合することが分かった。また、各 H3 の染色体結合量を比較したが、タンパク質量の違い等の影響から明確に結論できなかった。さらに、ヒストン転写量の増加に伴う細胞死の一因を明らかにした。

研究成果の概要 (英文)：The histone genes are highly repeated in genome and are transcribed at S phase. In this study, we analyzed the molecular feature of individual histone H3 in fission yeast. We showed that the binding partners of each histone H3 were varied throughout the cell cycle. There was a little difference among chromosome binding regions of these histone H3 proteins. However, we cannot be rule out the possibility that this result obtained it according to the different amount of histone H3. In addition, we reported that constitutive histone expression leads to centromere chromatin disruption and cell death.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：ヒストン

1. 研究開始当初の背景

真核生物では、遺伝情報を担う DNA がヒストン八量体の周りに巻きついてヌクレオソームを形成し、機能的に折りたたまれて染

色体を形成します。最近、ヘテロクロマチン構造や転写発現制御、DNA 修復などの染色体構造や機能発現において、ヒストン修飾 (メチル化・アセチル化・リン酸化等) が重

要な役割をしていることが明らかになってきています。

ヒトやショウジョウバエなどの高等真核生物では数個のアミノ酸が異なるヒストン H3 のバリエーションが存在し、それらの役割の違いについての報告が相次いでいます。あるバリエーションは S 期特異的に転写されヌクレオソームに取り込まれますが、他のバリエーションは細胞周期を通して転写されており S 期以外にもヌクレオソームに取り込まれることが示されています。また、これらのバリエーションの間でメチル化やアセチル化等の修飾に偏りがあることが報告されています。分裂酵母では、このようなヒストン H3 バリエーションは存在せず、1 種類の蛋白質で高等真核生物のバリエーションが担っている役割を示すと考えられています。しかし、最近の研究から各ヒストン遺伝子によって個性があることが分かってきました。

2. 研究の目的

重複遺伝子として知られるヒストン遺伝子は、分裂酵母では 2~3 コピー存在します。高等真核生物とは異なり、ヒストン遺伝子は全く同じアミノ酸配列をコードしていることが知られています。

最近、申請者はこれら同じアミノ酸をコードする 3 つのヒストン遺伝子の転写パターンに違いがあることを見出しました。分裂酵母では遺伝子間のバリエーションではなく、転写パターンにバリエーションをつけることで役割の異なるヒストン H3 を作り出しているのではないかと考えました。本申請研究では、同じアミノ酸をコードしている 3 つのヒストン H3 遺伝子を個別に解析することで、転写パターンの違いが 3 つのヒストン分子の修飾などに与える影響を明らかにすることを目的としました。

3. 研究の方法

(1) 個々のヒストン H3 遺伝子の標識化とその分子挙動の解明

3 コピーのヒストン H3 遺伝子が存在するため、個々に GFP タグと融合したヒストン遺伝子を作製し、ゲノム上に挿入して識別します。タグ特異的な抗体を用いることで、個々のヒストン H3 蛋白質を特異的に認識することができ、タグをつけていないヒストン H3 との量比も電気泳動度の違いにより明らかにできます。3 コピーのヒストン間で修飾の違いがあるかどうかについても、現在購入可能なメチル化・アセチル化・リン酸化等に対するヒストン修飾抗体を用いたウェスタンブロットで調べることができます。また、G1, S, G2, M 期に細胞周期を同調した細胞でもウェスタンブロットを

行います。これにより、3 コピー間でヒストン転写様式の違いと蛋白質レベルでの違いの一端を明らかにすることができると思っています。

(2) ヒストン H3 複合体を形成するタンパク質の同定

各ヒストン H3 に GFP タグ付加した細胞の細胞抽出液を GFP 抗体で免疫沈降します。GFP-H3 と共免疫沈降してきた蛋白質を SDS-PAGE で分離後、銀染色を行います。各共沈降物を比較し、異なる蛋白質を質量分析によって同定します。さらに、細胞周期を S または G2 期に同調して同様の実験を行います。これらの実験により、各ヒストン H3 と特異的に結合する因子や、細胞周期特異的な新規の因子を同定できる可能性があります。新たな因子が明らかになった場合、その因子の破壊株やタグ導入株を作成し、解析して行きたいと思っています。

(3) 各ヒストン H3 局在領域の同定

GFP タグ付加した細胞を用いて、GFP 抗体によるクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行います。免疫沈降した DNA が染色体上どの領域に結合しているのかを分裂酵母マイクロアレイにより解析します。この ChIP on chip 解析により、3 つのヒストン H3 の染色体上への結合領域を比較します。また、これまでヘテロクロマチン形成に関わる Swi6 や、ユークロマチンに存在する K4 メチル化ヒストン H3 の結合領域が報告されています。これらの領域と比較することでヘテロクロマチン形成に関係している分子や転写活性な遺伝子領域に関係する分子が明らかになると考えます。

(4) 細胞周期非特異的ヒストン発現がもたらす細胞増殖異常の検討

ヒストン転写因子 Ams2 の恒常的発現により、細胞が致死となる現象を発見しました。そこで、Ams2 恒常的発現と細胞致死の関連性を検討します。チアミン制御により発現を調節できるプロモーター下流に Ams2 を連結させた plasmid を作成し、細胞に導入後、細胞周期同調実験を行います。Ams2 発現を ON または OFF にしたときのヒストン転写量をノーザンブロットにより解析します。これまでの研究知見から、おそらく Ams2 が恒常的に発現されている (ON) 時には常にヒストンが発現されていると推察されます。さらに、Ams2 恒常発現細胞死が染色体異常により引き起こされる原因を明らかにするため、染色体脱落頻度の測定を行います。もし、染色体の脱落頻度が上昇しているのならば、クロマチンを MNase 処理し、ヌクレオソームパターンによ

りセントロメア構造の差異を検討します。

4. 研究成果

(1) 個々のヒストン H3 遺伝子の標識化とその分子挙動の解明

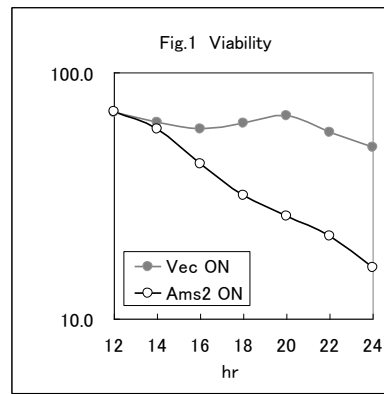
3つのヒストン H3 遺伝子を GFP タグ標識し、免疫沈降を行いました。細胞周期特異的な複合体形成を明らかにするため、非同調細胞、S 期同調細胞、G2 期同調細胞を用いて GFP 抗体で免疫沈降実験を行いました。S 期と G2 期同調細胞から、ヒストン H3 の免疫沈降パターンに違いが見られました。そこで、3つのヒストン H3 のタンパク修飾の違いについて、メチル化、アセチル化、リン酸化を認識する抗体を用いてウェスタンブロット解析しました。シグナルが弱かったため、様々な実験条件の検討を行いました。シグナルの確認は出来るようになりましたが、3つのヒストン H3 タンパク質間の違いについて明確に結論付けることが出来ませんでした。

(2) ヒストン H3 複合体を形成するタンパク質の同定

まずセントロメアヌクレオソームに注目し、次のような実験手法をとりました。3つのヒストン H3-GFP 細胞抽出液からセントロメア特異的ヒストン H3 バリエント Cnp1 抗体による免疫沈降解析を行いました。免疫沈降物を GFP 抗体によるウェスタン解析を行い、H3-GFP 分子が共沈降していることが分かりました。細胞周期同調細胞による検討を行ったところ、S 期と G 2 期で沈降物の変化が見られました。また、ヒストン修飾抗体を用いた免疫沈降解析を行いました。共沈降物は確認できませんでした。

(3) 各ヒストン H3 局在領域の同定

GFP タグ付加した個々の細胞用いて、GFP 抗体によるクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行いました。免疫沈降した DNA はセントロメア領域、ヘテロクロマチン領域、ユークロマチン領域のプロンプを用いて、定量 PCR により定量化しました。そのままの結果を見ると、3つのヒストン H3 間に違いが認められました。しかし、3つのタンパク質量の違いが影響している可能性があります。このタンパク質量の違いと転写量を検討していく過程で、ヒストン遺伝子を恒常的に発現させると細胞が致死になることを発見しました。この細胞致死性は、ヒストン転写因子 Ams2 の過剰発現細胞でも同様に起こりました (Fig. 1)。そこで、この細胞致死とヒストン発現メカニズムについてさらに解析しました。



(4) 細胞周期非特異的ヒストン発現がもたらす細胞増殖異常の検討

細胞周期を G1, S, G2 期に同調させた細胞に Ams2 をプラスミド発現させ、各ヒストン転写量をノザンブロットにより検討しました。Ams2 高発現細胞では、検討したすべての細胞周期においてヒストン転写量の蓄積が見られました。さらに、過剰に Ams2 を発現させると、ヒストン転写量蓄積されるだけでなく、細胞が致死になりました。このとき、セントロメアクロマチン構造を MNase 処理により解析しました。正常細胞ではスメアパターンになるのに対して、Ams2 過剰発現細胞では、ヒストン転写量の蓄積に応じてスメアからラダーパターンへと変化しました。セントロメアヌクレオソームのラダーパターンの変化は、染色体分配異常を引き起こすことが知られています。そこで、ミニ染色体安定性試験を行うと、Ams2 高発現細胞では正常細胞に比べ 30 倍の染色体不安定性を示しました。これらの結果、S 期にヒストン転写が活性化されることは染色体構築に重要であり、その調節は Ams2 によって行われていることがわかりました。これらの研究結果をまとめ、論文 (Developmental Cell および 実験医学) に発表しました。

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 高山優子, 登田 隆, 齋藤成昭, 細胞周期におけるヒストン転写因子 Ams2 の分解制御～ヒストン転写とセントロメア構築への影響、実験医学、査読無、vol.28、2010、pp.1409-1412
- ② Takayama Y, Mamnun Y, Trickey M, Dhut S, Masuda F, Yamano H, Toda T, and Saitoh S. Hsk1- and SCF^{PoB}-dependent proteolysis of *S. pombe* Ams2 ensures histone homeostasis and centromere function、Developmental Cell、vol.18、2010、pp.385-396

[学会発表] (計4件)

- ①高山優子、分裂酵母 Ams2 の分解制御とヒストン発現調節の関連、染色体ワークショップ、2010年1月21日、御殿場高原ホテル (静岡県)
- ②高山優子、Hsk1- and SCF^{Po3}-dependent proteolysis of *S. pombe* Ams2 ensures histone homeostasis and centromere function、International Fission Yeast Meeting、2009年10月28日、国立オリンピック記念青少年総合センター (東京都)
- ③高山優子、分裂酵母 Ams2 の S 期発現調節機構の解析、酵母遺伝学フォーラム、2009年7月30日、つくばノバホール (茨城県)
- ④高山優子、分裂酵母 Cnp1 の G2 期セントロメアローディングに関わる因子の探索、染色体ワークショップ、2009年1月27日、ウェルサンピア姫路ゆめさき (兵庫県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.kurume-u.ac.jp/announce/kouhou/info2009/info200991.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 優子 (TAKAYAMA YUKO)
久留米大学・分子生命科学研究所・助教
研究者番号：90461467

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：