

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年2月28日現在

機関番号：32685

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570185

研究課題名（和文）転写制御におけるクロマチンダイナミズムを規定するシス及びトランス因子の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of cis- and trans-acting factors to govern chromatin dynamisms in transcriptional regulation

研究代表者 清水 光弘 (SHIMIZU MITSUHIRO)

明星大学・理工学部・教授

研究者番号：80231364

研究成果の概要（和文）：遺伝子発現におけるクロマチン機能に関する重要な問題の一つは、ヌクレオソームの配置決定とそのダイナミクスの機構である。本研究では、転写制御に着目し、出芽酵母ゲノム及びミニ染色体において、ヌクレオソームの配置を規定するシス因子としていくつかの DNA リピート配列を同定した。また、トランス因子としてクロマチンリモデリング Isw2 複合体、ヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3、ヒストン H3 バリエントの機能を解析した。

研究成果の概要（英文）：Mechanisms of nucleosome positioning and its dynamics are one of the central issues to understand gene expression in eukaryotes. In this study, we identified several DNA repeat sequences acting as *cis*-elements for nucleosome formation and transcriptional regulation in the yeast cells. Also, we investigated the roles of the chromatin remodeling Isw2 complex, the histone deacetylase Rpd3 and histone H3 variants as *trans*-acting factors for nucleosome positioning as well as transcription.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：遺伝子、発現制御、ゲノム、クロマチン、ヌクレオソーム

1. 研究開始当初の背景

真核生物において、遺伝情報を担うゲノム DNA はクロマチンとして細胞核内に収納されている。クロマチンの基本構造単位はヌクレオソームであり、それは 147 bp の DNA がヒストン 8 量体に 1.7 回転巻付いた複合体である。ヒストン修飾因子、ヒストンバリエント、クロマチンリモデリング複合体、ヒストンシャペロン

などに関する最近の研究から、個々の遺伝子の発現制御のみならず、エピジェネティクスの機構においても、クロマチンの構造変化は重要な役割を担っていることが示された。

クロマチンの構造と機能を理解するうえで重要な問題の一つは、ゲノムにおけるヌクレオソーム配置決定のメカニズムである。ヒストンは DNA と非特異的に結合するにもかかわらず、ヌ

クレオソームはゲノム上でランダムには形成されていない。プロモーター領域などにおいて、特定の位置にヌクレオソームが形成される、いわゆる「ヌクレオソームポジショニング」は、これまでにさまざまな真核生物で見られており、転写制御機構のひとつとして提唱されてきた。

最近、出芽酵母やショウジョウバエにおいてゲノムワイドでヌクレオソームの配置に関する報告がなされ、ゲノムにおける約50%のヌクレオソームの位置はDNA配列依存的に規定されることやプロモーターからコード領域にかけてのヌクレオソーム配置の共通性などが明らかにされた。しかし、マイクロアレイを用いたゲノムワイド解析では、同じ生物種においても解析結果に差異が見られており、ゲノムにおいてヌクレオソームの配置を規定する因子については未だに不明の点が多く、統一的な概念は確立されていない。

2. 研究の目的

本研究は、転写制御においてヌクレオソームの配置(ヌクレオソームポジショニング)とそのダイナミクスを規定する分子機構を解明することを目的としている。具体的には、ヌクレオソーム形成に係わるシス因子としてさまざまなDNAリピート配列に着目する。また、トランス因子としてクロマチンリモデリング因子、ヒストン修飾酵素、ヒストンバリエーションに関して、出芽酵母ゲノムおよびミニ染色体における *in vivo* でのヌクレオソームポジショニングのダイナミクスのメカニズムを解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 出芽酵母変異株の作製

S288C および SK1 を genetic background とする株を用いて、一段階遺伝子置換、二段階遺伝子置換法などの分子遺伝学的方法を用いて変異株を作製した。

(2) クロマチン構造の解析

出芽酵母細胞から核を単離し、micrococcal nuclease (MNase) によりクロマチンを限定消化した。MNase による切断部位を間接末端標識、ヌクレオソームリピートアッセイなどにより解析した。

(3) その他の方法

通常の方法と生化学的方法を用いて行った。

4. 研究成果

(1) ヌクレオソームの配置を規定するシス因子 (DNA 配列) の同定とその転写制御に及ぼ

す影響

① ベント DNA による転写の活性化におけるヌクレオソームポジショニングのダイナミクスの役割

ヌクレオソーム形成に影響を及ぼすシス因子について検討するために、転写活性がヌクレオソームの形成に依存する出芽酵母 Δ UAS *CYCI-lacZ* レポータープラスミドを使用した。A•T 塩基対が連続して並んだトラクトが 9 bp の周期性で現われるベント DNA 配列である T12 (108 bp)、T20 (180 bp)、T28 (252 bp) を挿入したレポータープラスミドを構築した。出芽酵母に導入すると、それらの *lacZ* の発現は 51~61 倍と大きく上昇が見られた。ベント DNA による転写の活性化とクロマチン構造との関係を明らかにするために、酵母細胞におけるクロマチンの構造を解析した。T12、T20、T28 をプロモーター領域の TATA box 上流に挿入したプラスミドでは、ベント DNA 配列上で安定なヌクレオソームの形成が誘起されて、ヌクレオソームのポジションがプロモーターの上流側へスライドした。その結果、TATA box が露出されて、転写活性が上昇すると解釈された。

② 遺伝的疾患に関与するリピート配列によるヌクレオソーム形成の促進と阻害

ポジショニングしたヌクレオソームから構成される出芽酵母ミニ染色体のアッセイ系を用いて、*in vivo* でヌクレオソーム形成を促進または阻害する配列を調べた。その結果、遺伝的神経筋疾患に関与する CTG や ATTCT リピートがヌクレオソームの形成を促進し、CGG リピートはヌクレオソームの形成を阻害することを見いだした。そこで、出芽酵母ゲノムにおけるヌクレオソームの形成とその転写に及ぼす影響について調べた。CTG または ATTCT リピートを *PHO5* 遺伝子座プロモーター領域に挿入すると、転写活性化条件においても、*PHO5* の発現は著しく抑制された。一方、CGG リピートを挿入すると、転写抑制条件において *PHO5* の発現の活性化が見られた。ゲノムのクロマチン構造を調べた結果、比較的長い ATTCT と CTG リピートはプロモーター領域にヌクレオソームをポジショニングして転写を抑制すると結論づけられた (投稿論文準備中)。

③ テロメアリピート配列によるヌクレオソームポジショニングの不安定化

さらに、ヒト及び出芽酵母のテロメアリピート配列のヌクレオソーム形成を出芽酵母ミニ染色体のアッセイ系で解析した。ヒトと

出芽酵母のテロメアリピートはともに、ヌクレオソームを不安定化する性質を有することが示された。染色体末端のテロメアリピートのクロマチン構造は、高等真核生物（ヒトなど）と下等真核生物（出芽酵母など）との間で大きく異なっていることが報告されている。出芽酵母のテロメアリピートではヌクレオソームは形成されていないのに対して、ヒトでは密に詰まった間隔でヌクレオソームが形成されている。本研究で明らかにされた、*in vivo*でのヒト及び出芽酵母のテロメアリピートはヌクレオソーム形成に対して阻害的に働くという共通の性質は、染色体末端のテロメアクロマチン構造のダイナミクスにおいて重要な役割を持ち、それが染色体の維持や安定性に寄与すると考察された（論文投稿中）。

④ *in vitro* 再構成ヌクレオソームの生化学的解析とその X 線結晶構造解析

*in vivo*で解析したさまざまなリピート配列について、ヌクレオソームを *in vitro* で再構成して、それらの配列の形成するヌクレオソーム構造の特徴を生化学的に解析した。その結果、CTG や ATTCT リピートを中央に含む再構成ヌクレオソームでは周辺部の DNA の構造的性質が異なっていることがわかった。この結果は DNA の構造特性に関連して、ヌクレオソームの構造とその安定性には多様性があることを示唆している。

さらに、X 線結晶構造解析により、(CTG)₁₅•(CAG)₁₅を含むヌクレオソームの構造を 3.5 Å で決定し、これまでに決定されたヒト a-サテライト配列のヌクレオソームの結晶構造と比較した。その結果、ヒストン 8 量体に巻き付いた DNA path における差異を明らかにした（投稿論文準備中）。

(2) *In vivo* におけるヌクレオソームの形成とその配置決定におけるトランス因子の機能解析

① ヌクレオソームポジショニングに関与するクロマチンリモデリング Isw2 複合体の構成因子の同定

研究代表者らは、従来、a 細胞特異的遺伝子の転写抑制のメカニズムとして、ヌクレオソームポジショニングを提唱してきた。このヌクレオソームポジショニングに関与するクロマチンリモデリング因子 Isw2 複合体に着目し、その構成因子 (Isw2、Itc1、Dls1、Dpb4) の役割を解析した。各因子の欠損株を用いた解析から、Isw2 と Itc1 はヌクレオソームポジショニングに必須であるが、Dls1 と Dpb4 は

ポジショニングには関与していないことを明らかにした（投稿論文準備中）。

② 転写因子 Ume6 における Isw2 複合体及びヒストン脱アセチル化酵素 Rpd3 複合体の相互作用ドメインの解析

減数分裂初期遺伝子群の転写は、Ume6 によって制御されており、Ume6 はアクチベーターとリプレッサーの二つの機能を有する。Ume6 による転写抑制において、Isw2 によってプロモーター上にポジショニングしたヌクレオソームが形成され、そのヒストンが Rpd3 によって脱アセチル化される。Ume6 の変異株の解析から、Ume6 における Isw2 複合体および Rpd3 複合体の相互作用ドメインを同定した（投稿論文準備中）。

③ 出芽酵母におけるヒト H3 ヒストンバリエーションの発現とその影響

出芽酵母における二つのヒストン H3 遺伝子座 (HHT1、HHT2) の一方に、ヒト H3 バリエーション (H3.1、H3.2、H3.3) 遺伝子を導入した菌株を構築した。その遺伝子発現に及ぼす影響を調べたところ、減数分裂初期遺伝子 HOPI の誘導発現に対して、各 H3 バリエーションが異なる効果を与えることが示された。さらに、H3.1、H3.2、H3.3 のみを発現する出芽酵母菌株の遺伝学的解析を行った。その結果、出芽酵母 H3 遺伝子をヒト H3 バリエーション遺伝子への置換は、出芽酵母染色体の異数性の頻度を高めるか、もしくは転座を誘発するという興味深い可能性が示唆された。

(3) 総括と今後の展望

本研究において、ヌクレオソームポジショニングを規定するシス因子として、いくつかの DNA 配列を *in vivo* で同定した。この結果に基づいて、*in vivo* でヌクレオソーム形成の促進または阻害と転写活性との関係を明確に示した。さらに、*in vitro* 再構成ヌクレオソームの解析から DNA の構造特性によるヌクレオソームの多様性が示唆された。

従来、ヌクレオソームは進化的に保存された均一な基本構造体であると考えられてきた。しかし、本研究の結果から、ヌクレオソームの構造と安定性には多様性があり、その要因の一つに DNA の構造特性がある、という新しい概念を考えるに至った。

また、クロマチンリモデリング因子やヒストン修飾酵素、ヒストンバリエーションのヌクレオソームポジショニングにおける役割を解析した。これらのトランス因子は、シス因子によって特徴づけられるヌクレオソームの

構造的性質と協調して、ゲノムにおけるクロマチンダイナミクスを生み出すのではないかと考えている。

クロマチンの構造と機能の制御機構は、真核生物ゲノムにおける遺伝子の発現と制御において根幹をなすものであり、エピジェネティクスの機構解明に必須である。また、近年、クロマチン構造制御の異常がさまざまな疾患の原因となっていることが報告されている。これらの解明の基盤として、本研究は、ヌクレオソームの配置決定とそのダイナミクスの分子機構に関して重要な知見を提供している。

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 Jun-ichi Tanase, Nobuyuki Morohashi, Masashi Fujita, Jun-ichi Nishikawa, Mitsuhiro Shimizu*, Takashi Ohyama*. Highly Efficient Chromatin Transcription Induced by Superhelicity Curved DNA Segments: The Underlying Mechanism Revealed by a Yeast System. *Biochemistry*, **49**, 2351-2358 (2010) (*Co-corresponding authors) (査読有)
- ② Kensuke Miki, Mitsuhiro Shimizu, Michihiko Fujii, Shinichi Takayama, Mohammad N. Hossain, Dai Ayusawa. 5-Bromodeoxyuridine induces transcription of repressed genes with disruption of nucleosome positioning. *FEBS J.*, **277**, 4539-4548 (2010) (査読有)

[学会発表] (計 21 件)

- ① 清水光弘. クロマチンを介した転写抑制機構と天然変性タンパク質、第 82 回日本生化学会大会 シンポジウム、2009 年 10 月 21 日、神戸 (招待講演)
- ② 早川新一、諸橋伸行、立和名博昭、胡桃坂仁志、清水光弘. 出芽酵母におけるヒト由来ヒストン H3 バリエーションの発現と機能解析. 第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 10 日、横浜
- ③ 藤田仁、諸橋伸行、棚瀬潤一、大山隆、清水光弘. 出芽酵母における DNA 構造による遺伝子発現とクロマチン構造の制御、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 11 日、横浜
- ④ 清水光弘. 酵母ゲノムでのシスおよびト

ランス因子の変異によるヌクレオソームの機能解析. 第 19 回 酵母合同シンポジウム- イノベーションを推進する酵母研究、2010 年 6 月 24-25 日、東京大学、東京 (招待講演)

- ⑤ 諸橋伸行、渋沢庸一、清水光弘. クロマチン構造をシスに制御する DNA 因子と転写制御. 第 54 回日本薬学会関東支部会、2010 年 10 月 2 日、東京薬科大学、東京
- ⑥ 清水光弘. ヌクレオソーム形成促進配列と転写制御. 平成 22 年度遺伝学研究会細胞核超分子複合体の動態とその機能、2010 年 10 月 21-22 日、国立遺伝学研究所、三島 (依頼講演)
- ⑦ 清水光弘、藤田亮、富田伸之、森智、神庭昂平、小林玄太、松浦徹、諸橋伸行. DNA 配列によるヌクレオソーム形成の促進と転写制御、BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 7-10 日、神戸ポートアイランド、神戸
- ⑧ 諸橋伸行、大島えりか、藤田仁、大島綾子、Aaron P. Mitchell、清水光弘. 出芽酵母の転写活性化・抑制因子 Ume6 における天然変性領域の機能解析. BMB2010 (第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会 合同大会)、2010 年 12 月 7-10 日、神戸ポートアイランド、神戸
- ⑨ 諸橋伸行、立和名博昭、志賀達也、香川亘、胡桃坂仁志、清水光弘. DNA リピート配列が形成するヌクレオソームの構造と機能. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、国立京都国際会館、京都 (招待講演)
- ⑩ 諸橋伸行、大島えりか、藤田仁、大島綾子、Aaron P. Mitchell、清水光弘. 出芽酵母の転写活性化・抑制因子 Ume6 における天然変性領域の機能解析. 第 84 回日本生化学会大会、2011 年 9 月 21-24 日、国立京都国際会館、京都
- ⑪ 清水光弘. DNA リピート配列のクロマチン構造とその転写制御に及ぼす影響. 平成 23 年度国立遺伝学研究所研究会「クロマチンダイナミクスの分子機構」、2011 年 10 月 20-21 日、国立遺伝学研究所、三島 (依頼講演)
- ⑫ Nobuyuki Morohashi, Ayako Oshima, Erika Oshima, Azusa Matsumoto, Satoshi Fukuchi,

- Yoshifumi Nishimura, Aaron P. Mitchell, Mitsuhiro Shimizu. Functional Analysis of intrinsically disordered regions for transcriptional activation by Ume6, an activator/repressor protein of early meiotic genes in *S. cerevisiae*. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13-16日、パシフィコ横浜、横浜
- ⑬ 大島えりか、諸橋伸行、大島綾子、福地佐斗志、西村善文、Aaron P. Mitchell、清水光弘. 出芽酵母 Ume6 による転写抑制に関与する天然変性領域の機能解析. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13-16日、パシフィコ横浜、横浜
- ⑭ Nobuyuki Morohashi, Kazuki Kurokawa, Tohru Matsuura, Hiroaki Tachiwana, Tatsuya Shiga, Wataru Kagawa, Hitoshi Kurumizaka, Mitsuhiro Shimizu. Promotion of nucleosome assembly with DNA repeat sequences associated with hereditary neurological diseases. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13-16日、パシフィコ横浜、横浜
- ⑮ Yuichi Ichikawa, Nobuyuki Morohashi, Yoshifumi Nishimura, Hitoshi Kurumizaka, Mitsuhiro Shimizu. The effect of human telomeric sequences on nucleosome positioning in yeast cells. 第34回日本分子生物学会年会、2011年12月13-16日、パシフィコ横浜、横浜
- ⑯ 清水光弘. クロマチン関連転写因子 Ume6 における天然変性領域の機能解析、新学術領域研究「天然変性タンパク質の分子認識機構と機能発現」第2回公開シンポジウム、2012年1月24-25日、千里ライフサイエンスセンター、大阪（依頼講演）
- ⑰ 諸橋伸行、黒川和希、渋谷庸一、松浦徹、清水光弘. *In vivo*における ATTCT リピートによるヌクレオソームポジショニングとその転写制御に及ぼす影響、日本薬学会第132年会、2012年3月28-31日、北海道大学、札幌
- ⑱ Nobuyuki Morohashi, Tomohiro Fuse, Tohru Matsuura, Wakana Iwasaki, Hiroaki Tachiwana, Wataru Kagawa, Hitoshi Kurumizaka, Mitsuhiro Shimizu. Promotion of nucleosome assembly with DNA repeat sequences associated with hereditary neurological diseases, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting on EPIGENETICS & CHROMATIN, September 11-15, 2012,

Cold Spring Harbor, New York, USA

- ⑲ Yuichi Ichikawa, Nobuyuki Morohashi, Keita Handa, Yoshifumi Nishimura, Hitoshi Kurumizaka, Mitsuhiro Shimizu. The effect of human telomeric repeat sequences and telomere binding protein TRF1 on nucleosome positioning in yeas. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡
- ⑳ Nobuyuki Morohashi, Erika Oshima, Ayako Oshima, Ayako Makino, Yuichi Ichikawa, Hitoshi Kurumizaka, Satoshi Fukuchi, Yoshifumi Nishimura, Mitsuhiro Shimizu. Intrinsically disordered regions essential for activator and repressor functions of Ume6. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡
- ㉑ Nobuyuki Morohashi, Ayako Oshima, Tomohiro Fuse, Tohru Matsuura, Wakana Iwasaki, Hiroaki Tachiwana, Wataru Kagawa, Hitoshi Kurumizaka, Mitsuhiro Shimizu. Promotion of nucleosome assembly with ATTCT and CTG repeats and its effect on transcription. 第35回日本分子生物学会年会、2012年12月11-14日、福岡

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.hino.meisei-u.ac.jp/chem/LBT/Shimizu01.html>

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
清水 光弘 (SHIMIZU MITSUHIRO)
明星大学・理工学部・教授
研究者番号：80231364
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
なし
- (4) 研究協力者
胡桃坂 仁志 (KURUMIZAKA HITOSHI)
早稲田大学・理工学術院・教授
研究者番号：80300870

Aaron P. Mitchell
米国カーネギーメロン大学・教授