

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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710180

研究課題名（和文）ChIP-seq法によるヘテロクロマチンの多様性の解明

研究課題名（英文）Elucidation of functional diversity of heterochromatin using ChIP-seq

研究代表者

長尾 恒治（NAGAO KOJI）

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

研究者番号：60426575

研究成果の概要（和文）：

染色体上のヘテロクロマチンと呼ばれる領域は、遺伝情報を安定に維持するための染色体構造を作り出したり、発生・分化過程に応じた遺伝子の発現を制御するために重要な役割を果たしています。本研究では、次世代シーケンサーによる解析を駆使した ChIP-seq 法を用いることで、ヒト細胞のヘテロクロマチンがどのようなタンパク質の組み合わせによって成り立っているか明らかにしました。

研究成果の概要（英文）：

Heterochromatin plays an essential role for the maintenance of chromosomal integrity and the regulation of cell specific gene expression pattern. In this study, we map heterochromatin-associated proteins throughout genome using ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation combined with high-throughput sequencing) method, and elucidate the architecture of human heterochromatin.

交付決定額

（金額単位：円）

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|---------|-----------|
| 2010 年度 | 1,700,000 | 510,000 | 2,210,000 |
| 2011 年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,100,000 | 930,000 | 4,030,000 |

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

染色体上のヘテロクロマチン領域は、細胞周期を通して常に凝縮している領域として同定され、セントロメアやテロメアなどの染色体構造の維持や、エピジェネティックな遺

伝子発現の制御に重要な役割を果たしている。ヘテロクロマチンの主要な構成因子である HP1 タンパク質は、ヒストン H3 のメチル化された 9 番目のリジン (H3K9me) を“目印”としてクロマチンと結合し、染色体機能を制御するさまざまな“エフェクター”タンパク質

を染色体上に運び込む“土台”となる。このように HP1 は、特異的ヒストン修飾を特色ある染色体環境に変換する分子である。

一般的には”HP1 によるヘテロクロマチン”＝”遺伝子発現抑制の場”として広く受け取られているが、その分子機構についてはまだよくわかっていない。ヘテロクロマチンの分子機構の理解には、ヘテロクロマチン機能にどのようなエフェクタータンパク質が関与するか、またそれらが染色体上のどこでどのような組み合わせで働くかを、染色体全体に対して明らかにする必要がある。ヒト細胞において、ヘテロクロマチンタンパク質を全ゲノム上に位置づけることは、そのゲノムサイズの巨大さからこれまで困難であったが、最近開発されたクロマチン免疫沈降と次世代シーケンサーを組み合わせた ChIP-seq 法を用いることで解析可能となる道筋が見えてきている。

2. 研究の目的

ヒト細胞を用いて、HP1 タンパク質と物理的に相互作用するタンパク質を、質量分析器を用いて網羅的に同定し、この同定したタンパク質を ChIP-seq 法によって、ヒト染色体のどの領域に結合するかを明らかにする。同時に同じ細胞を用いて、ヘテロクロマチンタンパク質の土台となる特異的ヒストン修飾も、染色体上のどこに局在するかを位置づける。これによって、ヒト細胞のヘテロクロマチンについて、“どの領域が、どのようなタンパク質により構築され、どのような染色体機能と関わっているか”について明らかにする”ヘテロクロマチンタンパク質地図”を作成することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) Flag タグを付加したヒト HP1 α を安定に発現するヒト細胞株を樹立した。Flag 抗体を用いた免疫沈降法によって HP1 α と物理的に相互作用するタンパク質を精製し、質量分析器によって、それらタンパク質を同定する。また同時に、HP1 α の変異タンパク質（二量体化欠損、エフェクターとの結合欠損などを示すもの）6 種類をそれぞれ安定に発現する細胞株に対しても同様の実験を行い、それらすべての実験を合わせ、質量分析器の結果を定量的に情報処理することで、HP1 α と生物学的に意味のある結合タンパク質を同定する。

(2) 同定した HP1 α 結合タンパク質のいくつかについて、特異的に認識する抗体を作製し、ヒト細胞株から目的の HP1 α 結合タンパク質を免疫沈降できる系を作製する。

(3) 既にヒトゲノム上での結合部位が明らかになっている CTCF タンパク質を用い、ChIP-seq 法のパイロット実験を行い、クロマチン免疫沈降法 (ChIP)、次世代シーケンサーによる測定の条件検討、その後の情報処理法に必要なソフトウェアの選定、作成を行うことで、ChIP-seq 法の確立を行う。またヘテロクロマチンの土台となるヒストン修飾の ChIP-seq 実験を行い、使用している細胞中でのヒストン修飾の状態を確認するだけでなく、数 Mb オーダーに及ぶ結合領域を染色体全体で評価し、視覚化する情報処理系を作成する。

(4) HP1 結合タンパク質のいくつかについて、ChIP-seq 法でゲノム上での局在領域の位置づけを行い、ヒストン修飾との関係性を明らかにする。さらに RNAi 法を組み合わせることで、HP1 結合タンパク質の間の局在依存性を検証する。

4. 研究成果

(1) HP1 結合タンパク質の同定

① 免疫沈降産物に対する質量分析器の解析結果を評価する 2 つの指標（濃縮効率、再現性）を新たに定義し、質量分析器によって同定された約 1000 個タンパク質を分類した。その結果、高い信頼性を持って HP1 α と物理的に結合するタンパク質を全部で 82 種類同定することができた。

② 同定した HP1 結合タンパク質それぞれについて野生型 HP1 α 、6 種類の変異 HP1 α 、計 7 種類の HP1 α に対する結合プロファイルを作製し、クラスタリングで分類した結果、4 つのグループに分類された。この結果は、HP1 と HP1 結合タンパク質との間の結合様式には、少なくとも 4 種類存在するを意味する。いずれのグループのタンパク質も HP1 との結合には、HP1 の二量体化が必要であった。

③ 70 種類のタンパク質が含まれる最も大きなグループには、既に HP1 結合タンパク質として知られていた Mis12、CAF1、KAP1 などが含まれていた。結合プロファイルから、これらはすべて HP1 のクロモシヤドドメインと HP1 結合モチーフ PxVxL との相互作用、もしくは HP1 結合モチーフを持つタンパク質と結合するタンパク質であることが示唆された。

④ 新規 HP1 結合タンパク質である POGZ が含まれていたグループは、その結合プロファイルから HP1 結合モチーフを使わないこれまで知られていなかった結合様式で HP1 と結合していることが明らかになった。さらに解析を進めた結果、POGZ は HP1 に対して HP1 結合モチーフを持つタンパク質と競合的に結合し、分裂期の Aurora B キナーゼの活性化、均等

な姉妹染色体の分配に必要であることを明らかにした。これによって新たなHP1制御機構のモデルを提唱することができた。これらの結果は、Nozawa et al., (2010) Nature Cell Biology 誌に報告した。

(2) ヒトヘテロクロマチンに対するChIP-seq法の確立

① CTCFタンパク質などをパイロット実験として用い、ChIP-seq法に最適な細胞固定条件、超音波によるクロマチンの断片条件、必要な抗体量、解析に適した細胞株、ChIP-seq測定に用いるライブラリー作成法などの実験条件を決定することができた。

② ChIP-seq法の情報処理については、最適なmappingソフトウェアの選定と条件検討を行い決定し、その後の解析系についてもヘテロクロマチンタンパク質の局在解析に適したものを作成した。ヘテロクロマチンタンパク質、およびそれに付随するヒストン修飾のように数Mbに及ぶような広範な領域に結合するようなタンパク質のChIP-seq解析は、ゲノムを数10-100kbの一定間隔に区切り、それぞれの領域にmapされるChIP由来のDNA断片数をInput由来の断片数で標準化することで解析を行うこととした。その結果、H3K9me3修飾は数Mbに及ぶ染色体ドメインを形成すること、またこれまで知られているようにH3K9me3とH3K27me3のヒストン修飾は排他的に存在することを明らかにした。

(3) HP1結合タンパク質のChIP-seq解析
HP1と結合するタンパク質についてゲノム上での局在領域をChIP-seq法によって解析を行った。その中でも、新規タンパク質HBiX1とその結合タンパク質によって形成される複合体について詳細にChIP-seq解析を行った。その結果、HBiX1複合体はX染色体全体に特に局在することが明らかとなった。またヒトX染色体は、H3K9me3修飾と、H3K27me3修飾を受ける巨大なドメインからなることをChIP-seq法においても見いだした。RNAi法によるHBiX1複合体構成因子のノックダウンによる解析結果から、HBiX1複合体のH3K9me3ドメインへの局在はHBiX1に、H3K27me3ドメインへはもう一つのHBiX1複合体構成因子に依存して局在することが示唆された。他の解析結果も合わせて、不活性化X染色体のヘテロクロマチン凝縮の分子機構のモデルを提唱することができた。これら結果をまとめて論文を投稿中である。

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4件)

① Fukuura, M., Nagao, K., Obuse, C., Takahashi, T. S., Nakagawa, T., and Masukata, H. (2011) CDK promotes interactions of Sld3 and Drc1 with Cut5 for initiation of DNA replication in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 14, 2620-2633 査読あり

② Nozawa, R. S., Nagao, K., Masuda, H. T., Iwasaki, O., Hirota, T., Nozaki, N., Kimura, H., and Obuse, C. (2010) Human POGZ modulates dissociation of HP1alpha from mitotic chromosome arms through Aurora B activation. *Nat. Cell Biol.* 12, 719-727 査読あり

③ 野澤竜介, 長尾恒治, 小布施力史 (2010) ヒトHP1結合タンパク質のプロテオーム解析からみえてきたHP1の新機能 実験医学 28, 2983-2986 査読なし

④ 野澤竜介, 長尾恒治, 小布施力史 (2010) ヒトHP1結合タンパク質POGZは分裂前期のAurora Bキナーゼの染色体腕部での活性化に寄与する 細胞工学 29, 868-870 査読なし

[学会発表] (計4件)

① 長尾恒治, 野澤竜介, 柴田幸子, 木村宏, 小布施力史
ChIP-seq Analysis of Heterochromatin-associated Histone Modifications in Human Female Cells
哺乳類X染色体不活性化について
2012年2月24日
北海道大学

② 長尾恒治, 野澤竜介, 柴田幸子, 木村宏, 小布施力史
ChIP-seq Analysis of Heterochromatin-associated Histone Modifications in Human Female Cells
BMB2011 第34回日本分子細胞生物学会年会
2011年12月15日
パシフィコ横浜

③ Koji Nagao, Ryu-suke Nozawa, and Chikashi Obuse
Quantitative Proteomic Analysis of HP1 α Interaction Network-Four Different Interaction Modes of HP1 α with Its Associated Proteins
International Symposium Physicochemical Field for Genetic Activities
2011年1月25日

淡路夢舞台国際会議場

④ 長尾恒治、野澤竜介、小布施力史
半定量プロテオミクスによるヒト HP1 α タンパク質間相互作用ネットワークの解明 - HP1 は4つの異なる様式でさまざまなタンパク質と相互作用する

BMB2010 第33回日本分子細胞生物学会年会 第83回日本生化学会大会 合同大会

2010年12月8日

神戸国際会議場

[図書] (計0件)

[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

長尾 恒治 (NAGAO KOJI)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・助教

研究者番号：60426575

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし