

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23370004

研究課題名(和文)ヘテロクロマチン構造の確立と維持を制御する分子機構

研究課題名(英文)The molecular mechanisms of heterochromatin establishment and maintenance

研究代表者

中山 潤一(Nakayama, Jun-ichi)

名古屋市立大学・システム自然科学研究科・准教授

研究者番号：60373338

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円、(間接経費) 4,110,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、真核生物の染色体機能やエピジェネティックな遺伝子発現制御に重要なヘテロクロマチンが、どのように確立・維持されるのか、そのメカニズムの解明を目指した。クロマチン研究の優れたモデルである分裂酵母を用いた遺伝学的なスクリーニングによって、新規RNAi関連因子としてErs1とDsh1を単離し、詳細な解析からそれらがRNAi経路のエフェクター複合体をリクルートし、siRNAの産生を促進することでヘテロクロマチン形成に関与している事を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research program, we tried to gain a better understanding of the molecular mechanisms underlying the establishment and maintenance of higher-order chromatin structure, heterochromatin. Using fission yeast as a model organism, we employed a genetic screening and successfully identified two novel RNAi factors, Ers1 and Dsh1, involved in heterochromatin assembly. Further analyses uncovered that these factors play roles in recruiting RNAi-effector complexes, such as RDRC, and promote siRNA production to form higher-order chromatin structure.

研究分野：基礎生物学

科研費の分科・細目：遺伝・ゲノム動態

キーワード：遺伝子 発現制御 ヘテロクロマチン RNA干渉 分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体に存在する高度に凝縮したヘテロクロマチンは、染色体の機能やゲノム恒常性維持に必須な構造であるばかりでなく、エピジェネティックな遺伝子発現制御にも重要な役割を果たしている。ヘテロクロマチンには特徴的なヒストンのメチル化が存在し、この修飾を認識するタンパク質によって高次のクロマチン構造が形成されている。分裂酵母を用いた先駆的な研究によって、このヘテロクロマチン構造の形成に、その領域からの RNA の転写と、RNA 干渉 (RNAi) として知られる機構の関与が明らかにされた。また、生化学的解析によってヘテロクロマチン因子や RNAi 経路で働く中心的な因子が同定され、ヘテロクロマチン形成を制御する機構については徐々に明らかにされてきた。しかし、どのようにヒストンのメチル化と RNA 干渉の機構が共役してクロマチン構造変換を導くのかなど、その分子メカニズムの詳細については依然不明な点が数多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、ヘテロクロマチン研究の優れたモデルである分裂酵母を用い、遺伝学的なスクリーニングによってヘテロクロマチン形成を制御する新規因子の単離を試みるとともに、生化学的手法によって単離された新規因子の機能解析を行い、ヘテロクロマチン構造の確立と維持の制御に関わる、ヒストンのメチル化と RNAi 経路の分子メカニズムの詳細を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規 RNAi 因子の機能解析: ヘテロクロマチン形成に関わる因子の変異体では、ヘテロクロマチンに挿入したマーカー遺伝子の発現抑制 (サイレンシング) が解除される。特に RNAi 関連因子の場合、セントロメア特異的にこのサイレンシングの解除が観察される。本研究に先行して遂行した若手研究 A (平成 19~22 年度) において、ヘテロクロマチンのサイレンシング異常を示す変異体を多数単離した。本研究では、変異体として単離され、新規 RNAi 因子と考えられる Ers1 と Dsh1 に着目し、遺伝学的、生化学的、細胞生物学的な手法によってその機能解明を試みた。また、これら新規因子と相互作用する因子を酵母ツーハイブリッド法によって単離し、ヘテロクロマチン構造形成との関連を解析した。

(2) CLRC 複合体の機能と RNAi: ヘテロクロマチン構造形成にはヒストンの H3K9 特異的なメチル化酵素である Clr4 が重要な役割を果たしている。これまでの研究から、Clr4 がユビキチン化に関わる Cul4 や、Rik1

とともに CLRC と名付けられた複合体を形成していることが明らかにされている。しかし、ユビキチン化活性が Clr4 の機能とどのように関わるのか、実際の基質も含めて明らかにされていない。本研究では、まずタグを付加したヘテロクロマチン関連因子を電気泳動で分離、検出し、その分子泳動度の変化からユビキチン化の基質候補の探索を行った。また、実際にユビキチン化の基質となるかについて検証するため、CLRC 複合体の精製と *in vitro* ユビキチン化反応系の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 新規 RNAi 因子の機能解析: 先行研究によって、*ers1* 変異体の表現型が *hrr1+* と *clr4+* の発現によって抑圧されることを見出していた。そこで本研究では、免疫沈降法、酵母ツーハイブリッド法によって三者の関係を解析し、実際に Ers1 が Hrr1 と結合する事を明らかにした。また、Ers1 は Clr4 とは直接相互作用しないが、その下流で働く Swi6/HP1 と結合することを明らかにした。さらに ChIP 解析によって、Ers1 と Hrr1 のヘテロクロマチン局在に Swi6 が重要な役割を果たす事を明らかにした。以上の結果より、Ers1 は Swi6 と Hrr1 を含む RDCR 複合体を結びつける仲介的な役割を果たす因子であることが強く示唆された。

さらに、同様な遺伝学的スクリーニングで単離された Dsh1 の機能解析を進め、Dsh1 が Dcr1 と RDCR 複合体と相互作用し、siRNA の効率的な増幅に関与することを明らかにした。さらに、Dsh1 は核膜近傍に特徴的な局在を示し、その局在がヘテロクロマチン構造形成に必須である事が明らかになった。以上の結果より、Dsh1 はヘテロクロマチンの核内局在を制御することで、siRNA の産生を促進するという、新しい機能を果たす因子であることが示唆された。

これら新規 RNAi 因子と相互作用する因子について、酵母ツーハイブリッド法を用いて探索したところ、Dsh1 と相互作用する因子として RNA ポリメラーゼ II の転写終結因子として知られている Seb1/Nrd1 を同定した。温度感受性変異体を単離してヘテロクロマチンサイレンシングとの関連を解析したが、ヘテロクロマチン形成において中心的な役割を果たしているという直接の証拠は得られなかった。ヘテロクロマチン形成における Seb1 の機能については、さらなる解析が必要であると考えられる。

(2) CLRC 複合体の機能と RNAi: 本研究ではまずタグを付加したヘテロクロマチン関連因子を電気泳動で分離、検出し、その分子泳動度の変化からユビキチン化の候補となる因子をスクリーニングした。また、実際に *clr4* や *rik1* の変異によって候補因子のユビキチン化が変化するかどうか解析を行った。

現在までに約 50 のヘテロクロマチン関連因子を検討し、ユビキチン化修飾を受ける候補因子として RNA ポリメラーゼ II のサブユニットの一つを同定することに成功した。さらに、このユビキチン化修飾は、*clr4* や *rik1* の変異によって変化しており、CLRC の基質である可能性が強く示唆された。

実際に単離した RNA ポリメラーゼ II のサブユニットを含む候補因子が実際にユビキチン化されるかを検証するため、*in vitro* のユビキチン化反応系の開発を進めた。TAP タグを付加した *Rik1* を酵母内で発現させ、アフィニティー精製法によって CLRC 複合体を精製する方法を確立した。実際に精製 CLRC を E1、E2 と反応させる事で、*in vitro* のユビキチン化反応系の構築に成功した。

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 11 件)

Nishibuchi G & Nakayama J. Biochemical and structural properties of Heterochromatin Protein 1: understanding its role in chromatin assembly. *J. Biochem* (2014), in press, DOI: 10.1093/jb/mvu032.

Kato H, Okazaki K, Iida T, Nakayama J., Murakami Y, & Urano, T. Spt6 prevents transcription-coupled loss of posttranslationally modified histone H3. *Sci Rep.* 3 (2013) p2186, DOI: 10.1038/srep02186.

Mano Y, Kobayashi T, Nakayama J., Uchida H, & Oki M. Single cell visualization of yeast gene expression shows correlation of epigenetic switching between multiple heterochromatic regions through multiple generations. *PLoS Biol.* 11 (2013) e1001601, DOI: 10.1371/journal.pbio.1001601.

Kamata K, Hatanaka A, Goswami G, Shinmyozu K, Nakayama J., Urano T, Hatashita M, Uchida H, & Oki M. C-terminus of the Sgf73 subunit of SAGA and SLIK is important for retention in the larger complex and for heterochromatin boundary function. *Genes Cells.* 18 (2013) p823-37, DOI: 10.1111/gtc.12075.

Kawakami K, Hayashi A., Nakayama J., & Murakami Y. A novel RNAi protein, Dsh1, assembles RNAi

machinery on chromatin to amplify heterochromatic siRNA. *Genes Dev.* 26 (2012) p1811-1824, DOI: 10.1101/gad.190272.112.

Ishida M, Shimojo H, Hayashi A., Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K, Nishimura Y & Nakayama J. Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatic gene silencing. *Mol. Cell.* 47 (2012) p228-41, DOI: 10.1016/j.molcel.2012.05.017.

Shiomi Y, Ishii T, Hayashi A, Shinmyozu K, Nakayama J., Sugawara K, & Nishitani H. Two different RFC proteins, Ctf18 and RFC1 separately control PCNA-CRL4Cdt2-mediated Cdt1 proteolysis during S phase and following UV-irradiation. *Mol Cell Biol.* 32 (2012) p2279-88, DOI: 10.1128/MCB.06506-11.

Hayashi A., Ishida M, Kawaguchi R, Urano T, Murakami Y, & Nakayama J. Heterochromatin protein 1 homologue Swi6 acts in concert with Ers1 to regulate RNAi-directed heterochromatin assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109 (2012) p6159-64, DOI: 10.1073/pnas.1116972109.

Hatanaka A, Chen B, Sun JQ, Mano Y, Funakoshi M, Kobayashi H, Ju Y, Mizutani T, Shinmyozu K, Nakayama J, Miyamoto K, Uchida H, & Oki M. Fub1p, a novel protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. *Genes Genet Syst.* 86 (2011) p305-314, https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/86/5/86_5_305/_article

Goto DB & Nakayama J. RNA and epigenetic silencing: Insight from fission yeast. *Dev Growth Differ.* 54 (2011) p129-141, DOI: 10.1111/j.1440-169X.2011.01310.x.

Kitano E, Hayashi A., Kanai D, Shinmyozu K, & Nakayama J. Roles of fission yeast Grc3 in ribosomal RNA processing and heterochromatic gene silencing. *J. Biol. Chem.* 286 (2011) p15391-402, DOI: 10.1074/jbc.M110.201343.

[学会発表](計 11 件)

中山 潤一、 Posttranslational modifications of HP1 regulate its function in heterochromatin formation、Keystone Symposia "Chromatin mechanisms and cell physiology"、2014年03月25日、Oberstdorf Haus (ドイツ、オーベルストドルフ)

中山 潤一、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 による高次クロマチン構造形成の分子機構、平成 25 年度遺伝研研究会、2013 年 10 月 17 日、国立遺伝学研究所 (静岡県三島市)

中山 潤一、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1 による高次クロマチン構造形成のメカニズム、第 86 回 日本生化学会大会、2013 年 09 月 12 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

中山 潤一、Roles of chromodomain proteins in higher-order chromatin assembly、エピジェネティクス国際シンポジウム、2013 年 09 月 02 日、グランディア芳泉 (福井県あわら市)

西淵 剛平、ヒストン脱メチル化酵素 RBP2 と相互作用する因子の探索と転写調節における役割の解明、第 6 回 エピジェネティクス研究会年会、2012 年 05 月 14 日~2012 年 05 月 15 日、学術総合センター (東京都千代田区)

西淵 剛平、ヒストン脱メチル化酵素 RBP2 と相互作用する因子の探索と転写調節における役割の解明、第 35 回 日本分子生物学会年、2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

中山 潤一、分裂酵母の遺伝子サイレンシングにおけるクロモドメインタンパク質の役割、第 35 回 日本分子生物学会、2012 年 12 月 11 日~2012 年 12 月 14 日、福岡国際会議場 (福岡県福岡市)

中山 潤一、分裂酵母ヘテロクロマチン形成における Chp1 の役割、第 29 回 染色体ワークショップ、2012 年 1 月 26 日、ホテルニュー水戸屋 (仙台市)

中山 潤一、Roles of chromodomain proteins in higher-order chromatin assembly、第 34 回 日本分子生物学会年会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

中山 潤一、高次クロマチン構造の形成と維持の分子機構、第 62 回 染色体学

会年会、2011 年 11 月 12 日、神奈川大学 (神奈川県平塚市)

中山 潤一、Roles of chromodomain proteins in RNAi-directed heterochromatin assembly、第 6 回 国際分裂酵母学会、2011 年 6 月 30 日、ボストン (アメリカ)

〔図書〕(計 7 件)

中山 潤一、他、羊土社、エピジェネティクスキーワード事典、2013、p43-51

中山 潤一、他、化学同人、エピジェネティクス、2013、p49-65

中山 潤一、他、化学同人、染色体と細胞核のダイナミクス、2013、p79-93

中山 潤一、日本生化学会生化学 vol.85、ヘテロクロマチン構造の形成とサイレンシング」生化学、2013、p565-70

中山 潤一、羊土社、実験医学 2012 年 9 月号「ヘテロクロマチン構造からみる非コード DNA と染色体」、2012、p2221-2227

中山 潤一、生体の科学 2011 年 9-10 月号、「ヘテロクロマチンタンパク質 HP1」、2011、p466-467

中山 潤一、秀潤社、細胞工学 2011 年 7 月号「高次クロマチン構造とノンコーディング RNA」、2011、p699-705

〔その他〕

ホームページ
<http://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/~jnakayam/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 潤一 (NAKAYAMA, Jun-ichi)
名古屋市立大学・大学院システム自然科学研究科
研究者番号：6 0 3 7 3 3 3 8

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

林 亜紀 (HAYASHI, Aki)
独立行政法人理化学研究所・クロマチン動態研究チーム・研究員
研究者番号：8 0 3 9 9 5 3 4