

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770001

研究課題名(和文)ヘテロクロマチン形成・維持に果たすヒストンシャペロンの役割に関する研究

研究課題名(英文)Roles of the FACT for heterochromatic silencing in fission yeast

研究代表者

高畑 信也(Takahata, Shinya)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：50381588

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンシャペロン関連遺伝子を網羅的に破壊してFACT構成因子であるpob3破壊株のヘテロクロマチン崩壊様表現型が顕著である事を発見した。またSwi6依存的FACTリクルートメカニズムを発見した。マイクロアレイ解析からFACT変異株とswi6破壊株のグローバルなRNA発現パターンに高い類似性を見いだした。さらにFACT変異株でヒストンH2A/H2Bのヌクレオソーム組込不全が起きていた。加えて新規H3K9メチル化の領域を発見した。ヘテロクロマチンとユークロマチンの境界決定因子のノックアウト株でこのピークが増加する事からH3K9メチル化の生物学的意義の一端が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We performed the comprehensive histone chaperone gene disruption and found that pob3 gene disrupted fission yeast shows most serious silencing defects at the peri-centromeric heterochromatin. We also identified that Swi6 recruits FACT onto the heterochromatin independently of RNA polymerase II transcription. Our microarray analysis to compare pob3 knockout strain and swi6 knockout strain revealed that the expression patterns of ncRNA and mRNA were quite similar in both strain as if they regulate gene expression in the same pathway. In pob3 knockout strain, we found that impaired histone H2A/H2B reorganization triggers heterochromatic silencing defect at peri-centromeric region. In addition, novel histone H3K9me regions were identified by ChIP-sequencing. Mutations in the heterochromatin/euchromatin boundary factor results more peaks at these regions, suggesting the biological significance of H3K9 methylation for living cells.

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：クロマチン ヘテロクロマチン ヒストンシャペロン HP1 FACT Spt16 Pob3 CK2

## 1. 研究開始当初の背景

### クロマチン因子としてのFACTの発見

申請者は出芽酵母をモデル生物としてヒストンシャペロン活性を持つFACT (Facilitate Chromatin Transcription) によるクロマチン転写制御機構に関する研究を行ってきた。FACTはSpt16/Pob3/Nhp6から構成される複合体でありDNA複製、転写開始制御、転写伸長制御に関わる多機能性クロマチン因子である。生化学的解析から構成因子Spt16がヒストンH2A/H2Bシャペロン、Pob3がヒストンH3/H4シャペロン、Nhp6が非特異的DNA結合タンパク質とされており分裂酵母の場合spt16は必須遺伝子、pob3とnhp6は非必須遺伝子である。申請者が現在までに発表したFACTによるヌクレオソーム構造変換モデル (Xin H. et al., *Mol Cell*, 2009) ではSpt16-Pob3がヒストンシャペロンとして機能するには非特異的DNA結合因子のNhp6がクロマチン上に足場を作る必要がある。

### FACTがプロモーター上でも機能する

FACTがクロマチン因子として機能するのは上述した通りであるが、どのようにして染色体上の特定の部位で作用しているのかは大きな疑問であった。申請者は出芽酵母FACTの変異株が示す表現型の解析、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 実験、試験管内再構成実験によって細胞周期G1/S移行時のチェックポイントでFACTが転写因子SBFと相互作用して遺伝子プロモーター上のクロマチン構造変換を行って転写制御を行う事を見いだした。SBFにはWhi5と呼ばれるSBFの活性抑制因子も結合する。Cdk1(Cyclin dependent Kinase 1)によるリン酸化によってWhi5はSBFから乖離しSBFの活性抑制が解除されるのだがG1/S期においてSBF上で起こるFACTとWhi5の競合は細胞周期チェックポイント機構の中で極めて重要なステップである。このWhi5とSBFの関係は高等真核生物におけるガン抑制因子Rb (Retinoblastoma tumor suppressor) と転写因子E2Fの関係と同様であり種を超えて保存されているものである。上述した研究結果はヒストンシャペロンFACTによる細胞周期依存的な転写制御システムの種を通した普遍性を示唆するものであった (Takahata S. et al., *EMBO J.*, 2009, Takahata S. et al., *Mol Cell*, 2009)。

### ヘテロクロマチンとFACT

凝縮したクロマチン構造を持ちセントロメア近傍に存在するヘテロクロマチンは転写制御や染色体分配・維持に深く関わる。ヘテロクロマチン形成・維持メカニズムは非

常に複雑だがヒストンタンパク質に付与されるエピジェネティックマークの伝播・受渡しとその中心的役割を果たす事は想像に難くない。中でもヒストンシャペロンが果たす役割は重く、分裂酵母株を用いた近年の研究でメチル化修飾を受けたヒストンH3に結合するヘテロクロマチンタンパク質 (HP1) とヒストンH2A/H2BシャペロンFACT複合体との相互作用が報告されたがその詳細な相互作用機構は不明なままであり、解明は急務である。また上述した通りFACT複合体はRNA polymerase IIと結合してクロマチン構造を弛緩させる活性が報告されていたが、分裂酵母を用いたヘテロクロマチン研究でFACTがヘテロクロマチン内のncRNA発現を抑制する働きがある事が新たに報告されFACTのクロマチン制御メカニズムの一端が明らかとなった。これらの研究報告と申請者が現在までに行ってきたFACT研究成果を併せて、申請者はヘテロクロマチン形成・維持に果たすFACTの役割を分子レベルで解明する事を目指し研究課題を申請するに至った。

## 2. 研究の目的

### (1) ヘテロクロマチン形成・維持にかかわるヒストンシャペロンの同定

ヘテロクロマチンの形成に最も重要な役割を果たすのがヒストンH3K9のメチル化である。この翻訳後修飾を受けたヒストンH3がどのように伝播し、また新生染色体に受け渡されるのかを考えるとヒストンH3K9メチル化酵素による新しい修飾反応はもちろんであるが、一方で既存のH3K9メチル化ヒストンの有効活用を行う為にはヒストンシャペロンの果たす役割は無視できない。そこでヒストンシャペロン関連遺伝子に的を絞って網羅的な遺伝子破壊株を作成し、ヘテロクロマチン内部のサイレンシングアッセイからその形成・維持に重要な役割を果たす遺伝子の同定を試みる。

### (2) FACTによるヘテロクロマチン形成・維持の分子機構解明

HP1相互作用タンパク質を決定するためのLC-MS/MS解析からHP1には非常にたくさんのタンパク質が結合する事が報告されている。その中にはクロマチンを抑制する因子はもちろんの事、活性化する因子も含まれていた。この中にはFACTが含まれていたがHP1とFACTの詳細な分子メカニズムは不明瞭である。ショウジョウバエを用いた解析からFACT構成因子のSSRP1とHP1cが結合してクロマチンを活性介している事が明らかになっているが、ショウジョウバエのHP1cと分裂酵母のHP1ホモログSwi6の間には機能的に大きな隔たりがあると考えられている。そこで酵母のFACTを構成する3つのタンパク質 (Spt16, Pob3, Nhp6) のなかでどれがSwi6と結合するのか、その相互作用様式を明らかに

する。

### (3)新規ヒストンH3K9メチル化領域およびHP1結合領域の探索

分裂酵母の染色体ではセントロメア、テロメア、MAT座位の三カ所が非常に強力にヘテロクロマチン化(ヒストンH3K9のメチル化及びHP1の結合)が知られている。申請者の先行研究からヒストンH3K9メチル化が他の領域でも起きる事が示唆された。この領域の同定とFACT結合の有無を調べ、生理学的な意義を理解する。

## 3. 研究の方法

### (1)ヘテロクロマチン形成・維持にかかわるヒストンシャペロンの同定

分裂酵母のデータベースから逆遺伝学的に非必須遺伝子でかつヒストンシャペロン関連遺伝子をピックアップして網羅的に破壊後、ヘテロクロマチン内に組み込んだレポーター遺伝子の発現量の変化を測定する事でヘテロクロマチン形成・維持に関連する因子であるかどうかを判定した。

### (2)FACTによるヘテロクロマチン形成・維持の分子機構解明

生化学的手法によってFACTとHP1タンパク質複合体を精製し、更にその複体内に含まれるタンパク質を同定した。また遺伝学的解析からFACTと同一経路でヘテロクロマチンサイレンシングを行う因子の解析とFACT変異が示す脱抑制表現型のサプレッサー単離を試みた。加えてFACT変異株とヘテロクロマチン形成因子破壊株を用いたトランスクリプトーム解析によるクラスターリング解析を行い、ncRNA発現制御に限らずヘテロクロマチン因子によるmRNA発現制御機構に関する解析も行った。

### (3)新規ヒストンH3K9メチル化領域およびHP1結合領域の探索

抗ヒストンH3K9me抗体によるChIP-sequencingを次世代シーケンサー(NGS)で行った。また(2)と関連してヘテロクロマチンとユークロマチンの境界決定に関わる因子*epe1*+遺伝子がFACTと同一経路で機能する事が疑われた為、*epe1*遺伝子破壊株を用いたヒストンH3K9meのChIP-sequencingを同時に行い、H3K9meの新しい生理学的役割に関する知見を得た。

## 4. 研究成果

### (1)ヘテロクロマチン形成・維持にかかわるヒストンシャペロンの同定

ヒストンシャペロン関連遺伝子を網羅的に破壊した結果FACT構成因子である*pob3*+遺伝子破壊株の示したヘテロクロマチン崩壊様の表現型がもっとも顕著であった。またこの他にも*caf1*+遺伝子破壊株もヘテロクロマチン崩壊様の表現型を示す事が明らかとな

っている。加えて本計画期間中に海外の研究室からヒストンH3/H4シャペロンとして知られるAsf1がヘテロクロマチン形成・維持に何らかの役割を果たす事が報告されており、ヘテロクロマチンとヒストンシャペロンの包括的解析の重要性が一層強まった。

### (2)FACTによるヘテロクロマチン形成・維持の分子機構解明

FACT構成因子のChIP-qPCR実験を野生株、*swi6Δ*株、*chp2Δ*株で行い、Swi6依存的なFACT複合体のヘテロクロマチンへのリクルートメントメカニズムを発見した。またこれはSwi6のリン酸化状態には依存されない事をSwi6変異株と大腸菌で発現させたリコンビナントSwi6によって明らかにした。加えてFACT変異株と*swi6Δ*株のマイクロアレイ解析から両者のRNA発現パターンにはncRNA、mRNA共に相当な類似性がある事を発見した。またFACT変異株が示すヘテロクロマチン内転写の脱抑制メカニズムの解明にも着手し、遺伝学的相補性からヒストンH2A/H2Bの過剰発現が極めて効率よく再抑制を起こす事を解明し、我々のFACT変異株はヒストンH2A/H2Bをヌクレオソームに組み込めなくなっていることが明らかとなった。

### (3)新規ヒストンH3K9メチル化領域およびHP1結合領域の探索

抗ヒストンH3K9me抗体によるChIP-sequencingを行い、強力にヘテロクロマチン化されるセントロメア、テロメア、MAT座位以外のシグナルを確認した。野生株においては上記の3領域をカバーする様な広範囲なピークが確認できた上に、他の領域においても局所的に鋭いピークが観察された。加えてヘテロクロマチンとユークロマチンの境界を決定する因子のノックアウト株ではこのような局所的ピークがたくさん出現する事とテロメア領域近傍に形成されるヘテロクロマチンがサブテロメアにまで流れ込んで来る事が明らかとなった。

## 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 3件)

①Shota Suzuki, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Yota Murakami, Shinya Takahata, A novel method for purification of the endogenously expressed fission yeast Set2 complex. Protein Expression and Purification, 査読有, Vol.97, 2014, 44-49  
DOI:10.1016

②Warren Voth, Shinya Takahata, Joy Nishikawa, Benjamin Metcalfe, Anders Naar, David Stillman, A role of the FACT in repopulation of nucleosomes at inducible genes. PLoS One, 査読有, Vol.9, 2014, e84092

DOI:10.1371

③ Shinya Takahata, Yaxin Yu, David Stillman, Repressed chromatin affects factor binding at yeast *HO* (homothallic switching) promoter. JBC, 査読有, Vol.286, 2011, 34809-34819

DOI:10.1074

[学会発表] (計 9件)

- ① 高畑信也、千田早織、村上洋太、Heterochromatic silencing defect in FACT mutant is concomitant with impaired H2A/H2B reorganization. 第36回日本分子生物学会年会、神戸国際会議場、兵庫県、12/3-6、2013
- ② Shinya Takahata, Saori Chida, Yota Murakami, Heterochromatic silencing defect in FACT mutant is concomitant with impaired H2A/H2B reorganization. Message from Yeast to Epigenetics Symposium、グランディア芳泉、福井県、9/2-4、2013
- ③ Shinya Takahata, Saori Chida, Yota Murakami, Heterochromatic silencing defect in FACT mutant is concomitant with impaired H2A/H2B reorganization. Cold Spring Harbor Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, USA, 8/27-31、2013
- ④ 高畑信也、千田早織、村上洋太、ヒストンH2A/H2BシャペロンFACT複合体によるヘテロクロマチンサイレンシングの分子機構、第65回日本細胞生物学会年会、ウインク愛知、愛知県、6/19-21、2013
- ⑤ Yota Murakami, Shinya Takahata, Takuya Kajitani, Shota Suzuki, Saori Chida, Miyuki Mori, Transcriptional machinery including RNA polymerase II regulates transcriptional and post-transcriptional gene silencing at heterochromatin. 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県、12/13-16、2011
- ⑥ Masato Sorida, Shinya Takahata, Atsushi Shimada, Yota Murakami, Functional analysis of a JumjC protein Epe1 as a heterochromatin boundary effector. 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県、12/13-16、2011
- ⑦ Shota Suzuki, Atsushi Shimada, Shinya Takahata, Yota Murakami, Functional analysis of Set2, histone H3K36 methyltransferase, for heterochromatin formation. 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県、12/13-16、2011
- ⑧ Shinya Takahata, Yaxin Yu, Yota Murakami, David J. Stillman, Repression mechanism of the *HO* promoter in budding yeast. 第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県、12/13-16、2011
- ⑨ 千田早織、村上洋太、高畑信也、分裂酵母におけるFACT依存的ヘテロクロマチンサイレンシング機構、第34回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜、神奈川県、12/13

-16、2011

[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

<http://wwwchem.sci.hokudai.ac.jp/~bo/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

高畑 信也 (TAKAHATA, Shinya)

北海道大学・大学院理学研究院化学部門・助教

研究者番号：50381588

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし