

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640111

研究課題名(和文) エピジェネティクス修飾を暗号解読する蛋白質複合体の網羅的解析

研究課題名(英文) High-throughput screening for protein complexes recognizing codes of epigenetic modifications

研究代表者

本田 信治 (Honda, Shinji)

福井大学・テニュアトラック推進本部・助教

研究者番号：90632167

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：DNAとヒストンは化学修飾され、この修飾の組み合わせが暗号となり、様々な生理機能を導くと考えられている。しかし、これらの修飾は特定の蛋白質(群)に認識されることがわかってきたが、複数の暗号による認識機構はまだ謎が多い。本研究では、モデル生物のアカパンカビにおいてDNAとヒストン修飾の組み合わせを人為的に改変させたセントロメア領域などに付随する蛋白質を網羅的に同定する方法を開発した。更に、その有用性を新規の暗号認識機構を発見することで立証した。

研究成果の概要(英文)：It has been proposing that multiple combinations of modifications of DNA and/or histones work as codes to direct various biological phenomena. Although the modifications has been known to be recognized by specific protein(s), the multiple code recognition system remains unclear. In this study, we developed a system to identify proteins associated with specific genomic domains such as centromeres which are modified using mutants lacking DNA and/or histone modifications in Neurospora. Furthermore, we found novel recognition machineries using the system, verifying the utility.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：DNAメチル化 アカパンカビ ヒストン修飾 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

我々ヒトは約 260 種類の細胞からなる集合体であるが、それぞれの細胞はほぼ例外なくすべての細胞になるために必要な遺伝情報 (ゲノム DNA) を受け継いでいる。言い換えると、両親から授かった受精卵の先天的な遺伝情報は細胞分裂をしても継承するが、後天的な遺伝情報獲得・継承システムにより、細胞は分化し、その形質を維持する。このシステムを専門用語でエピジェネティクスという。最近の研究により、このエピジェネティクスには DNA とその DNA を収納する蛋白質であるヒストンへのメチル化、アセチル化、リン酸化などの化学修飾が重要な役割を担っていることがわかってきた。この化学修飾数は、DNA とヒストンの両方を併せると 40 以上の場所に 10 種類以上あり、これらの修飾の組み合わせが暗号として働くという有力な仮説がなされている。そして、特定の蛋白質 (複合体) が特定の生理条件下でこの暗号を解読することで、私たちの恒常性を保つのに必要な生理機能を導くと考えられている。しかし、現時点では特定の修飾とその修飾を認識 (解読) する蛋白質の 1 対 1 の相互作用の研究が盛んに行われているが、複数の修飾 (複雑な暗号) が同時にどのように認識されるのかはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

複雑な生命現象を謎解くためには、特定の修飾と認識の 1 対 1 の相互作用を解析する単純系の研究から、生体内で多数の修飾が同時にどのように認識されているのかを解析する複雑系の研究へ移行する必要がある。本研究の目的は、エピジェネティクス研究において優れたモデル生物であるアカパンカビを用いて、新たな精製方法と遺伝学・分子生物学的手法を組み合わせることにより、どのように生体内で多数の修飾の組み合わせが認識されているのかを網羅的に解析し、高次元の分子認識機構の解明を目指すことである。

3. 研究の方法

哺乳類の典型的なヘテロクロマチンの特徴として、H3K9 メチル化、DNA メチル化、ヒストン低アセチル化が挙げられる。アカパンカビはこれらの特徴を全て持ち、更に単純なヘテロクロマチン形成経路を持つ。例えば本研究代表者らの研究により、ヒストン H3K9 メチル化酵素 DIM-5、DNA メチル化酵素 DIM-2、ヒストン脱アセチル化酵素 HDA-1 を欠損させると、それぞれ H3K9 メチル化の消失、DNA メチル化の消失、ヒストン高アセチル化を引き起こす (Lewis[#], Adhvaryu[#], Honda[#] et al. *PLoS genet.* 2010; Honda & Selker, *Mol. Cell. Biol.* 2008; Honda et al. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012)。これらの欠損株を利用すれば、ヘテロクロマチン領域における修飾の組み合わせを人為的に改変できる。アカパンカビにおいて染色体の中心領域であるセントロ

メアは全ゲノムのヘテロクロマチン領域のおよそ半分を占める (Lewis, Honda et al. *Genome Res.* 2009)。そして、このセントロメアにはセントロメア型ヒストン H3 (cenH3) が特異的に局在し、この cenH3 の局在はヘテロクロマチン化に重要な H3K9 メチル化にほぼ依存しない (Smith et al. *Mol. Cell. Biol.* 2011)。そこで、これらの利点を組み合わせ、FLAG タグ化した cenH3 (cenH3-FLAG) を持つ正常株とエピジェネティクス修飾を人為的に改変させた欠損株を作製し、抗 FLAG 抗体を用いてアフィニティー精製することで、生体内の状態を保ったままセントロメアを抽出する。そして、それぞれ人為的に改変させた株のセントロメアに付随する蛋白質を質量分析解析によって網羅的に同定し、比較解析する。同様に、染色体の末端領域であるテロメアに付随する蛋白質を網羅的に同定する手法の開発も行い、ゲノム領域特異性があるかを調べる。詳しい研究方法は下記の通りである。

(1) セントロメア・ヘテロクロマチンに対するエピジェネティクス制御の階層的理解

本研究代表者が開発したゲノム編集技術 (Honda & Selker, *Genetics*, 2009) によって作製した cenH3-FLAG 形質変換株から、正常株、H3K9 メチル化が消失する *dim-5* 欠損株、DNA メチル化が消失する *dim-2* 欠損株、ヒストンが高アセチル化する *hda-1* 欠損株、DNA メチル化が消失し、ヒストンが高アセチル化する *dim-2*, *hda-1* 二重欠損株をそれぞれ作製する。

cenH3-FLAG を利用して、エピジェネティクス修飾を改変させたセントロメア・クロマチン領域をそれぞれ精製し、全構成蛋白質を質量分析により同定する。

異なる修飾をもつクロマチンと相互作用する蛋白質群を比較解析することにより、蛋白質 (もしくは認識ドメイン) がどのように集合し、複雑な暗号を解読するのかを検証する。

(2) テロメアへ特異的に局在する蛋白質を用いたテロメア付随蛋白質同定法の確立

アカパンカビにおいて、テロメアへ特異的に局在する蛋白質はまだ同定されていない。そこで、分裂酵母、哺乳類においてテロメアに特異的に局在する蛋白質複合体 Shelterin の同定をアカパンカビにおいて行う。そして、この構成蛋白質が実際にテロメアに局在し、その局在がエピジェネティクス修飾に依存しないことを確認する。そして、この構成蛋白質を上記と同様に精製し、テロメアに付随する蛋白質を網羅的に同定する。

4. 研究成果

(1) セントロメア・ヘテロクロマチンに対する

るエピジェネティクス制御の階層的理解

セントロメアに付随する蛋白質の網羅的な同定を行った。そして、非特異的に結合する蛋白質を除去した結果、セントロメアに付随する蛋白質として約 100 種類を同定した。次にこの中から、新規蛋白質 1 種と既存の蛋白質複合体 1 種を選び、下記の更なる解析を行った。

新規 H3K9 メチル化認識蛋白質の同定

H3K9 メチル化されたセントロメアに特異的に付随する新規蛋白質を同定した。この蛋白質は、H3K9 メチル化を結合するドメインであるクロモドメインを持っていた。そこで、このドメインを含む組換え蛋白質を大腸菌の発現系で精製し、種々のヒストン修飾をもつペプチドを用いてプルダウンアッセイを行ったところ、このドメインが実際に H3K9 メチル化に特異的に結合することを確認した。更に、この蛋白質がセントロメアのサイレンシングを担うことを確認した。

DMM 複合体の新機能の発見

正常なセントロメア、H3K9 メチル化が消失したセントロメアには付随しないが、DNA メチル化がされていないセントロメア、もしくはヒストンが高アセチル化されているセントロメアに付随する蛋白質群として、DMM 複合体 (Honda et al, *Genes dev*, 2010) を同定した。更に、DMM 複合体は DNA メチル化の消失とヒストンの高アセチル化が同時にされているセントロメアに強く付随することを確かめた。DMM 複合体は、ヘテロクロマチン領域の両端に局在し、異常にヘテロクロマチンが拡がるのを防ぐ役割を担うが、どのようにこの局在がなされているのかはよくわかっていない。そこで、DMM 複合体の構成蛋白質である HP1、DMM-1、DMM-2 の相互作用機序を調べるため、酵母 Two-Hybrid 法を行った。その結果、HP1 のクロモドメインと DMM-1 の C 末側領域が相互作用し、更に DMM-1 にある 1 つ目の Cys-rich ドメインが DMM-2 の N 末端領域と相互作用することを見出した。次に、ヒストン修飾結合、DNA 結合ドメインの解析を行った。まず、HP1 の組換え蛋白質を大腸菌発現系で精製し、上記と同様のプルダウンアッセイを行った。その結果、クロモドメインを含む HP1 が H3K9 メチル化に結合することを確認した。更に、DMM-1 が持つ 2 つ目の Cys-rich ドメインを含む組換え蛋白質を大腸菌発現系で精製し、同様な解析を行ったところ、無修飾のヒストン H3 の N 末端領域、もしくは H3R2 メチル化に結合することを見出した。また、DMM-2 の DNA 結合ドメイン (Zn-Cys) も同様な解析を行ったが、DNA メチル化による DNA 結合能の変化は観察されなかった。これらをまとめると、HP1、DMM-1、DMM-2 は直接相互作用して複合体を形成し、HP1 のク

ロモドメインと DMM-1 の Cys-rich ドメインによって異なるヒストン修飾を認識する新たな分子機構が見えてきた。

(2) テロメア付随蛋白質同定法の確立

セントロメア領域以外のゲノム領域で同手法の有効性を調べるために、セントロメア領域の次に大きなヘテロクロマチン領域であるテロメア領域で同手法を試すことにした。まず、テロメアのキャッピングに重要な蛋白質複合体 Shelterin の構成蛋白質で、酵母から哺乳類に保存されている POT-1 に着目した。次に、ゲノム編集技術を用いて FLAG タグ化した POT-1 形質変換株を作製し、この蛋白質をアフィニティー精製した。そして、POT-1 と相互作用する蛋白質を質量分析解析した結果、アカパンカビ Shelterin の同定に成功した。アカパンカビ Shelterin は少なくとも 5 種類の蛋白質からなり、その一つはテロメア反復配列を認識するドメインを持つ。そこで、この構成蛋白質の局在を ChIP-seq 解析により調べたところ、この構成蛋白質がテロメア領域に強く局在することを確認した。更にこの局在が H3K9 メチル化に依存しないことも確かめた。そして、正常株において、上記と同様な手法を用いてテロメアに付随する蛋白質の網羅的精製・質量分析解析を行ったところ、28 種類の蛋白質を同定した。そのうち、20 種類がセントロメア領域にも付随する蛋白質、残りの 8 種類がテロメア領域へ特異的に付随する蛋白質であることを確認した。

これらの結果、本手法はまだ開発段階であるが、特定ゲノム領域のエピジェネティクス修飾の組み合わせを暗号解読する蛋白質 (複合体) の網羅的解析に有効であることが確認できた。

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 1 件)

Adhvaryu KK, Gessaman JD, Honda S, Lewis ZA, Grisafi PL, and Selker EU: The Cullin-4 complex DCDC does not require key E3 ubiquitin ligase elements to control heterochromatin in *Neurospora*. *Eukaryotic Cell* 14, 25-8, (2015) 査読有、doi: 10.1128/EC.00212-14

[学会発表] (計 5 件)

Uesaka M, Yokoyama A, Lewis ZA and Honda S: Identification and characterization of *Neurospora* Shelterin, The 9th Cold Spring Harbor meeting on Telomeres & Telomerase, Cold Spring Harbor (USA), May (2015)
Yokoyama A, Uesaka M and Honda S: Four

color imaging by fluorescent protein tagging system in *Neurospora crassa*, The 28th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Monterey (USA), March (2015)
Uesaka M, Yokoyama A and Honda S: Identification of *Neurospora* Shelterin, The 28th Fungal Genetics Conference at Asilomar, Monterey (USA), March (2015)
Uesaka M and Honda S: Heat break of ascospore dormancy in *Neurospora crassa*, Neurospore meeting 2014 at Asilomar, Monterey (USA), March (2014)

本田信治: アカパンカビの重複配列に対するエピジェネティクス制御、第7回日本エピジェネティクス研究会年会、奈良県新公会堂（奈良県奈良市）、2013年5月30日

〔その他〕

(1)ホームページ等

<http://www.honda-lab.com/>

(2)アウトリーチ活動

Honda S: DNA methylation-dependent and independent silencing through HP1 in *Neurospora crassa*, Temasek Life Laboratory, Singapore, January (2015)

本田信治: 福井大学発 最先端研究～明日への挑戦～ 「ゲノム防御～利己的なDNA から守るしくみ」, 2014年8月2日、福井大学 文京キャンパス アカデミーホール

(3) 受賞

平成 26 年度・文部科学大臣表彰・若手科学者賞

(4)報道関連情報

福井新聞に掲載（2014年5月7日）
中日新聞・日刊県民福井新聞に掲載（2014年4月24日）

6. 研究組織

(1)研究代表者

本田 信治 (HONDA SHINJI)
福井大学・テニユアトラック推進本部・助教
研究者番号：90632167