

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25650001

研究課題名(和文)クロマチン構造にゆらぎを生み出す分子基盤の解明

研究課題名(英文)Study on the molecular mechanisms of chromatin fluctuation

## 研究代表者

村上 洋太 (Murakami, Yota)

北海道大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：20260622

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の性質は基本的に遺伝子により規定されるが、その発現には「ゆらぎ」が存在し、個体間・細胞間の性質の差として現れる。これは生命のもつ柔軟性・可塑性の表れであり、ゆらぎの制御機構の理解は生命の本質の理解に重要である。本研究では、遺伝子発現の「ゆらぎ」の分子機構の解明に取り組みEpe1というタンパク質が、種々のタンパク質とともに過度のゆらぎを抑制する因子であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Gene (DNA) primarily determines the character of the cell. However the steps in the gene expression has some "fluctuation", which results in the slight difference of the phenotype between cells or individual organisms. This is one of the bases of the flexibility and the plasticity of the life. We have tried to understand the molecular mechanisms underlying the fluctuation of gene expression. We revealed that a protein Epe1, together with other partner proteins, repressed the excessive fluctuation of the gene expression by regulating chromatin structure, which is a "DNA-packaging" structure and important for gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチン エピジェネティクス 遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

細胞集団が刺激に反応して遺伝子発現のパターンを変更するとき、DNA 配列に違いのない細胞の間で刺激に対する応答の強さ早さに“ゆらぎ”が観察されることがある。このゆらぎは細胞集団を扱う実験では多くの場合は不安定な表現型として無視される。厳密に言えば、分化などの遺伝子パターンの切り替えは、あるゆらいだ状態から別の揺らぎの状態への遷移としてとらえる必要がある。この遷移は、ゆらぎの方向と強さ、ゆらいだ状態の安定性を一定の方向に変化させることでおこる。

遺伝子発現の基本レベル制御は多くの場合、ヒストンタンパク質の翻訳後化学修飾（メチル化、アセチル化、リン酸、ユビキチン化等）に起因する恒常的なクロマチン高次構造変化やクロマチンの一過的な制動変化によって引き起こされる。このクロマチン高次構造は固定されたものでなく、適度にゆらいでおり、そのことが各細胞間の刺激に対する応答の差としてあらわれる。つまり、ゆらぎの制御が柔軟な遺伝子発現制御の基盤にある。しかし、“ゆらぎ”を発生させる分子メカニズム、“ゆらぎ”を発生・抑制するクロマチン高次構造の特徴、“ゆらぎ”に関わるヒストン修飾間の階層性はいまだによく判っていない。

分裂酵母は単純で高等真核生物と類似したクロマチン制御システムをもち、クロマチン研究のよいモデルとなる。クロマチン構造は凝縮して転写に対し不活性なヘテロクロマチンと、活性なユークロマチンに大別され、ゲノム上での両者の局在は厳密に制御されている。分裂酵母の Epe1 タンパク質はユークロマチン・ヘテロクロマチン境界を決める因子として同定されたが、その後、ヘテロクロマチンに局在し、ヘテロクロマチン安定化に寄与するとともに、ヘテロクロマチン内での転写を活性化するという機能をもつことが示されてきたが、それらの機能の分子機構は不明であった。我々は、Epe1 がヘテロクロマチン安定化に機能する事から、ヘテロクロマチンのゆらぎ制御因子として働くのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

上記の背景のもと、本研究ではクロマチン構造制御を基盤とする遺伝子発現制御における「ゆらぎ」を制御する分子機構の解明を目的とした。特に、遺伝子発現に関し不活性なヘテロクロマチンの制御因子である Epe1 に着目し、Epe1 によるクロマチン構造を介したゆらぎ制御の分子機構の解明をめざした。

### 3. 研究の方法

Epe1 に関し以下の 3 つの観点から解析を進めた。

#### (1) Epe1 によるヘテロクロマチン構造の制御機構

Epe1 の欠損により、ヘテロクロマチンが不安定化する事が知られており、Epe1 はヘテロクロマチンのゆらぎ抑制因子と考えられる。この分子機構の解明のために、Epe1 欠損により、不安定化しているヘテロクロマチンの状態を、ヘテロクロマチンを規定するヒストン修飾であるヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化 H3K9me をモニターすることで検討した。H3K9 の検出はクロマチン免疫沈降法(ChIP法)と定量的PCR を組み合わせさせておこなった。

#### (2) Epe1 によるユークロマチンでのヘテロクロマチン制御

Epe1 がユークロマチンで形成される異所的ヘテロクロマチンの制御に関わる可能性を考え、Epe1 欠損株でゲノム全体のヘテロクロマチンの状況を、H3K9me<sub>3</sub> に対する ChIP をおこない、得られた DNA を次世代シークエンサーにより解析する(ChIP-seq 法)ことで検討した。次世代シークエンサーによる解析は新学術領域ゲノム支援の助力のもと行った。

#### (3) Epe1 相互作用因子の解析

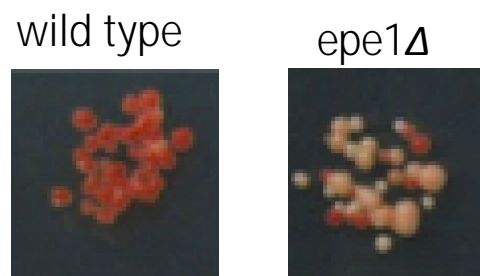
Epe1 タンパク質にタグをつけ、タグを標的にした免疫沈降法により Epe1 を含む複合体を精製し、LC-MS/MS による質量分析で複合体に含まれる因子を同定した。質量分析は北海道大学先端生命科学研究院小布施力史の研究室の助力のもと行った。

### 4. 研究成果

#### (1) Epe1 によるヘテロクロマチン構造の制御

Epe1 によるヘテロクロマチンの不安定化はヘテロクロマチンに挿入した *ade6* 遺伝子の発現によりモニターできる。挿入した *ade6* 遺伝子が、周囲のヘテロクロマチンの拡張により発現抑制を受けると、細胞内に代謝産物の蓄積がおこり赤色コロニーを形成する。野生型株では一様に赤井コロニーを形成するが、Epe1 欠損株では赤白のコロニーがまじり、ヘテロクロマチン形成が不安定化したことがわかる(図1)。赤、白の表現型は安定で

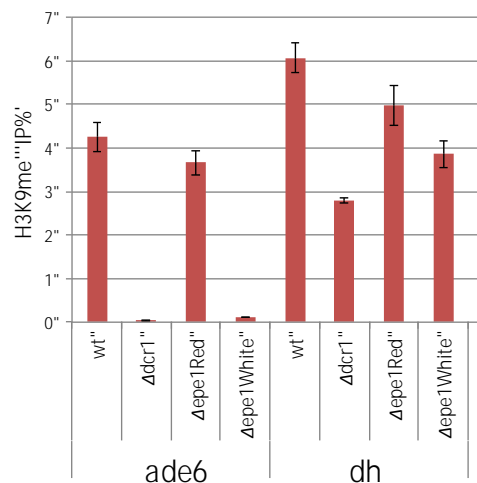
図1. Epe1欠損株の表現型



あるが、低い頻度で変換がおこることから、これらの表現型はエピジェネティックに制御されていることがわかる

次に、赤、白それぞれの株について、*ade6* 遺伝子上および本来のヘテロクロマチン領域 (dh) のヘテロクロマチンの状態を H3K9me-ChIP により検討した。その結果ヘテロクロマチンの H3K9me は *epe1* 欠損によりあまり影響がなく、*ade6* 上の H3K9me が白い株では大きく減少していることがわかった(図2)。これは、*Epe1* がヘテロクロマチンが隣接領域への拡張、あるいは拡張したヘテロクロマチンの安定維持に寄与することを示している。

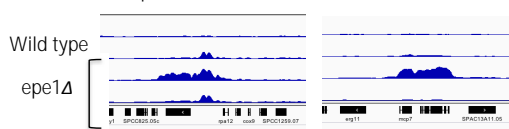
図2. *Epe1*欠損株でのヘテロクロマチン



## (2) *Epe1* によるユークロマチンでのヘテロクロマチン制御

分裂酵母ではヘテロクロマチンはセントロメア、mating locus、テロメアに局限されているが、ユークロマチン上に小さなヘテロクロマチンが存在する事も知られている。*Epe1* がユークロマチンでのヘテロクロマチン制御に関わる可能性を考え、*Epe1* 欠損株でのゲノム全体のヘテロクロマチン分布を ChIP-seq により解析した。その結果、*Epe1* 欠損株では、ユークロマチン上に偶発的に異所的ヘテロクロマチンが形成されていることがわかった(図3)。つまり *Epe1* はユークロマチン上では、異所的ヘテロクロマチン形成による、遺伝子発現のゆらぎを抑制する機能を果たしていることになる。

図3 *Epe1*欠損株での偶発的異所的クロマチン形成



青色はH3K9meのゲノム上での分布を示す。

## (3) *Epe1* 相互作用因子の解析

*Epe1* はヒストン脱メチル化酵素にみられる触媒ドメインである、*jmjC* ドメインを持つ

が、脱メチル化活性は検出されていない。*Epe1* の転写活性化など多様な機能を考えると、単に脱メチル化酵素としてだけでなく、他の因子と協調して働く可能性が高い。そこで、*Epe1* の相互作用因子を *Epe1* を含む複合体を免疫沈降し、質量分析によりその構成成分を検討した。その結果表1のような因子が同定された。

クロマチンリモデリング因子や、ヒストンシャペロン、ヒストンア修飾酵素など直接クロマチン構造制御や転写に関わる因子のほかに、複製関連タンパク質(RFC)がふくまれているのは興味深い。

Proteins/ comcomplex	Function	observed proteins
RSC	Chromatin remodeling complex	Rsc1, Rsc4, Rsc7, Rsc9, Rsc58, Ssr3, Sfm1, Snf21
Mst2	Histone acetyl transferase	Mst2
SWRC/H2AZ	loader of Histone H2AZ	Swr1, Msc1, Pht1 (=H2AZ)
RF-C	PCNA loader	Rfc1, Rfc2, Rfc3, Rfc4
Set9/Pdp1	H4K20 methylation: DNA damage response	Set9, Pdp1
HIRA	histone H3/4 chaperon	Hip1, Hip3
Clr6/Rdp3 complex	HDAC complex, Rpd3 complex	Pst3 (Pst2, Alp13, Chp2, Prw1, Clr6, Cph1)
RNA pol 2	RNA polymerase II	Rpb5, Rpb7,
Pap1	transcription factor, pombe c-Jun	Pap1
Hsf1	transcription factor, regulation of heat-shock genes	Hsf1
Condensin	chromosome condensation	Cut3
SPCC548.05c	Ubiquitin ligase E3 (Cse1 degradation in budding yeast)	SPCC548.05c

## (4) まとめ

以上、本研究で *Epe1* がヘテロクロマチンのみならず、ユークロマチンでもヘテロクロマチン形成もしくは維持を制御することで、ゲノムワイドな遺伝子発現のゆらぎを調節する因子であることが明らかになった。このような因子の報告としては初めてのものであり、今後エピジェネティクスの研究分野にインパクトを与えるものである。*Epe1* が機能をはたす分子機構は現時点では明確ではないが、本研究で明らかにした、相互作用因子などの情報をもとにさらに解析を進めることで、その制御システムの全体像が明らかになるであろう。

## 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)

Suzuki S, Nagao K, Obuse C, Murakami Y and \*Takahata S: A Novel Method for Purification of the Endogenously Expressed Fission Yeast Set2 Complex. *Protein Expression* 97: 44-49 (2014). 10.1016/j.pep.2014.02.005 (査読有り)

Kato H, Okazaki K, Iida T, Nakayama J-I, Murakami Y and Urano T: Spt6 prevents transcription-coupled loss of

posttranslationally modified histone H3. *Scientific Report* 3: e2186 (2013). 10.1038/srep02186 (査読有り)

Oya E, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y and Murakami Y: Mediator Directs Co-transcriptional Heterochromatin Assembly by RNA Interference-Dependent and -Independent Pathways. *Plos Genetics* 9: e1003677 (2013). 10.1371/journal.pgen.1003677 (査読有り)

〔学会発表〕(計 4件)

村上洋太: jmjC ドメインタンパク質 Epe1 によるエピゲノム制御、国際高等研究所 研究プロジェクト「クロマチン・デコーディング」第2回研究会、2014年3月19-21日、国際高等研究所、京都府精華町

Murakami Y: A CTD code of RNA polymerase II promotes heterochromatin formation via lncRNA and RNAi.、IIAS Research Conference 2014 “Chromatin decoding”、 May 12-15 (2014)、International Institute for Advanced Studies, Seika-Cho, Kyoto

村上洋太: ヘテロクロマチン形成に必要なsiRNAは転写と共役して核膜近傍で合成される、第36回日本分子生物学会年会、2013年12月3-6日、神戸国際会議場、神戸

Murakami Y: Regulation of RNAi-directed heterochromatin by CTD-phosphorylation of RNA polymerase II、EMBO conference of Fission Yeast: Pombe 2013、June 24-29 (2013)、University of London, London, UK

〔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

村上 洋太 (Murakami, Yota)  
北海道大学・大学院理学研究院・教授  
研究者番号：20260622

(2) 研究分担者  
( )

(3) 連携研究者  
高畑 信也 (TAKAHAT, Shinya)  
北海道大学・大学院理学研究院・助教  
研究者番号：50381588

加藤太陽 (Kato, Hiroaki)  
島根大学医学部・助教  
研究者番号：40548418

(4) 研究協力者  
( )