

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870377

研究課題名(和文) ヒストンシャペロン Spt6 の相互作用因子 lws1 の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of the histone chaperone Spt6-interacting protein lws1

研究代表者

加藤 太陽 (Hiroaki, Kato)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：40548418

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)：lws1 (Interact with Spt6) は転写装置であるRNAポリメラーゼIIに付随するヒストンシャペロンであるSpt6の相互作用因子である。Spt6はエピジェネティック制御において重要な役割を果たすが、lws1の細胞内での機能は不明である。本研究は、lws1の不在がプロモーター付近におけるRNAポリメラーゼIIの蓄積を引き起こすという新規知見にもとづき、分裂酵母の転写開始点を塩基レベルで解析し、それが哺乳類と類似しており、かつある程度予測可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Interact with Spt6 (lws1) is an interacting factor of the RNA polymerase II-associated histone chaperone Spt6. Although Spt6 plays important roles in epigenetic regulation, the intracellular function of lws1 remains unclear. In this study, based on our novel finding that RNA polymerase II accumulates at the promoters in the absence of lws1, we investigated the base composition of fission yeast transcription start sites, and revealed that it resembles mammalian promoters and is predictable to some extent.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

本研究を開始するに先立って、我々は、転写領域におけるヒストン翻訳後修飾の保護に Spt6 が貢献することを報告していた。Spt6 の機能不全は、ヘテロクロマチン領域の指標とな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修飾 (H3K9me) や、転写活性と相関する 4 番目と 36 番目のリジンのメチル化修飾 (H3K4me, H3K36me) を失わせる。エピジェネティック制御における Spt6 の重要性が明らかになってきた一方で、その相互作用因子である Iws1 の機能については不明な点が多かった。Iws1 は試験管内でヒストンと競合的に Spt6 と相互作用することが報告されていた。我々の研究は、Iws1 は Spt6 と同経路で機能するが、あくまでも補助的な役割をもつことを示唆していた。

2. 研究の目的

エピジェネティック制御における Spt6 の重要性を考えると、細胞内における Iws1 の機能を知ることは非常に重要である。そこで本研究は、Iws1 の機能不全が細胞内での RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の機能に及ぼす影響を調査し、ゲノム座標上での局所的な影響を明らかにし、その活動基盤としての DNA に注目することで、Iws1 がゲノムの文脈においてどのように要求されるのかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

RNAPII は 12 のサブユニットからなる複合体である。最も大きなサブユニットである Rpb1 の C 末端 (CTD) に存在する繰り返し配列は、ゲノムの文脈において様々なリン酸化パターンを示すことが知られており、それぞれの修飾を特異的に認識する抗体が作成されている。本研究では、CTD4H8 というモノクローナル抗体を用いて RNAPII の ChIP-seq を行い、野生型と Iws1 欠損株における RNAPII のゲノム上の分布を調査した。CTD4H8 を用いて得られた結果は、Rpb1 にエピトープタグを付加して得られた結果とよく似ており、ゲノム上の存在量をよく反映すると考えられる。分裂酵母の転写開始点 (TSS) を得るための CAGE-seq、PIC の位置を知るための TFIIB の ChIP-seq、それと RNA-seq の情報を合わせて解析した。データのプロセッシングや分析には BWA、MACS、R 等を用いた。塩基配列の取扱いには R の Biostrings パッケージを利用し、データの可視化には IGV、WebLogo、R の lattice パッケージ等を用いた。モチーフの検索には MEME と FIMO を用いた。

4. 研究成果

RNAPII の ChIP-seq の結果、Iws1 の不在は転写開始点付近での RNAPII の蓄積を引き起こすことが判明した (図 1)。この傾向は特に、転写レベルが高い遺伝子 (リボソームサ

ブユニットをコードする遺伝子等) において顕著だった。この結果は、RNAPII による転写開始あるいはその直後の伸長段階において Iws1 の機能が要求されることを示唆している。しかしながら、分裂酵母の転写開始機構については不明な点が多く、DNA の塩基構成さえ詳細に解析されていなかったため、Iws1 がどのようなゲノムの文脈で要求されるのかを検討できないという課題に直面した。

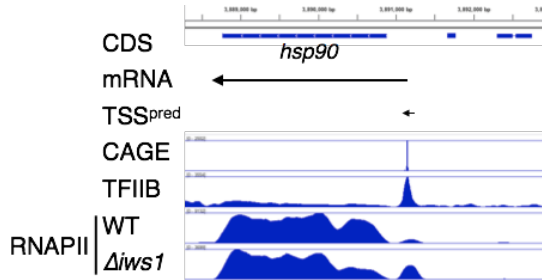


図 1. Iws1 の不在によって RNAPII の蓄積が見られる典型的な遺伝子

TFIIB の ChIP-seq と CAGE-seq によって TSS を明確に知ることのできる hsp90 のブラウザビューを示す。それぞれの遺伝子において、Iws1 の有無で TSS 付近の RNAPII の量が大きく異なる。TSS^{pred}: FIMO で予測された TSS の位置と方向。

上で述べた課題を解決するため、分裂酵母の TSS を塩基構成の観点から詳細に解析した。CAGE-seq で明らかになっている TSS のうち、細胞内で TFIIB の結合が認められる 1,532 の TSS を対象とした。この中には、タンパク質をコードする 1,508 遺伝子と、24 の非コード RNA 遺伝子が含まれる。TSS は TFIIB のサミットから 20 塩基対ほど下流に存在していた (図 2)。

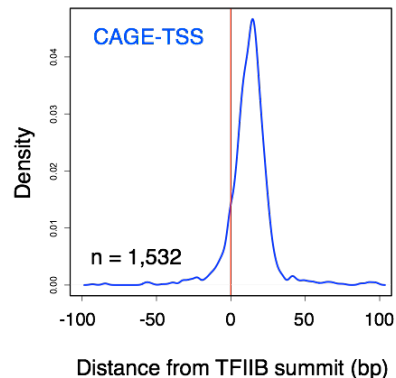


図 2. TFIIB と TSS の位置関係

TSS に特徴的なモチーフの有無を調査するため、MEME 解析を行った。1,532 の TSS の前後 25-100 塩基対からなる 51-201 塩基対を対象として、5 次マルコフモデルを用いてモチーフを検索したところ、4 つのモチーフが見つかった。もっとも出現頻度の高かったモチ

ープ (Motif1) は非対称の 21 塩基対からなり、snRNA 遺伝子を含む 1,247 (81.2%) の遺伝子に見つかった (図 3 A)。このモチーフは、CAGE-seq を報告した Li らが報告済みのモチーフ (図 3 B) を上流側と下流側に拡張したモチーフであった。モチーフ内の 6 番目の塩基が TSS に相当していた。MEME の検索条件によって、5' 側に更に 8 塩基対拡張された 29 塩基対のモチーフとして Motif1 が見つかることがあったが、その部分の特徴は WebLogo で視覚化されず、分裂酵母ゲノムに乏しい G と C に富むと予想された。

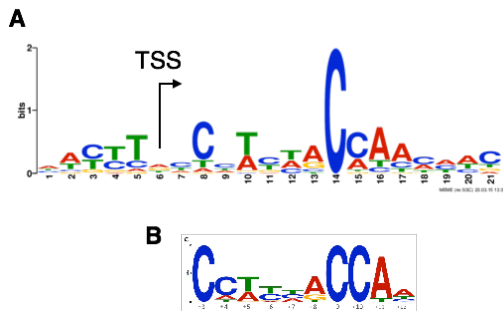


図 3. 分裂酵母 TSS に見つかるモチーフ (A) MEME が検出した Motif1 のロゴ。(B) Li ら (*RNA biology*, 2015) のモチーフ。

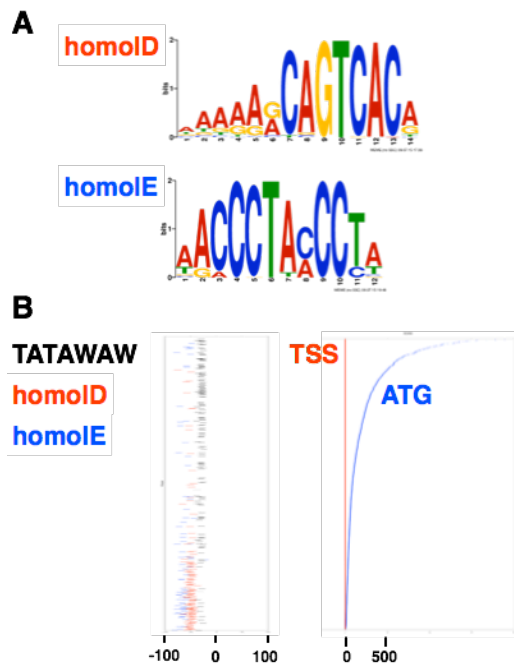


図 4. TSS の上流に見つかるモチーフ (A) homolD と homolE のロゴ。(B) TATA、homolD、および homolE の TSS からの位置。5' -UTR の長い遺伝子から順に 1,508 遺伝子を並べた。

残りの 3 つのモチーフは既知のものであり、すべて TSS の上流に見つかった (図 4)。TATA ボックス (TATA)、homolD、および homolE と呼ばれている。TATA はおよそ 1 割の遺伝子

に見つかった。homolD と homolE は TATA をもたないリボソームサブユニット遺伝子のプロモーターに頻出し、TATA の代わりに機能すると提案されている。我々の調査によると、homolD と homolE は、確かにリボソームサブユニット遺伝子に頻出していたが、TATA に比べると明らかに TSS から離れた位置に存在していた。homolD と homolE の両方をもつ遺伝子と、いずれかをもつ遺伝子が存在したが、いずれにしても、TSS から最も近い位置のモチーフは TSS から 50 塩基対ほど離れていた。

8 割の遺伝子に Motif1 が見つかったことから、分裂酵母の TSS は非常に特徴的な塩基構成をとることが予想された。これを確かめるため、各遺伝子における 4 種類の塩基を平面にプロットする技法を考案したところ、予想通り明確な縦縞模様を描くことができた (図 5)。Motif1 は TSS に位置するので、高等真核生物のイニシエーター (Inr) に該当すると思われる (灰色)。そのすぐ上流に GC リッチな領域があり (ピンク)、さらに上流に AT リッチな領域が存在した (水色)。ここで言う GC リッチとは、分裂酵母ゲノムの低い GC 含量に対して GC リッチという程度であり、WebLogo で可視化されるものではない。

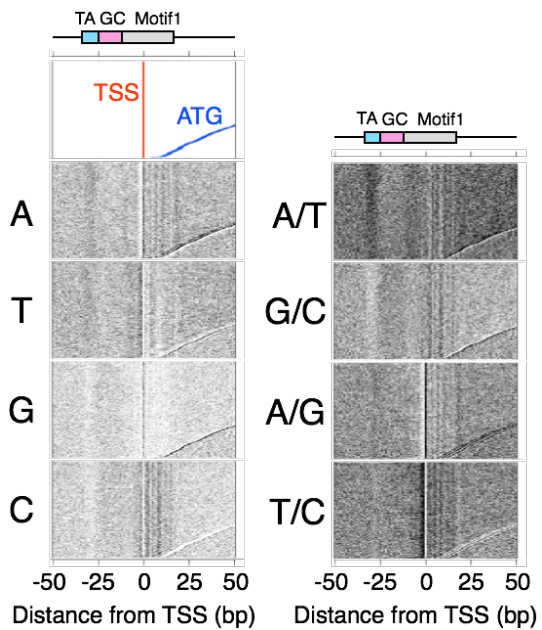


図 5. TSS 周辺の塩基構成

遺伝子の並び順は図 4 と同じ。図中に示した塩基が存在する座標に黒の点をプロットした。

TATA の有無で遺伝子を分けて塩基構成を解析してみたところ、TATA を含まない遺伝子は Motif1 に該当する場所の塩基構成が明確であり、TATA を含む遺伝子のそれは不明瞭であることが判明した (図 6)。これは、高等真核動物における TATA と Inr の関係に似ている。既報のウイルスプロモーターを用いた

構造解析は TFIIB が TATA の上流と下流の GC リッチ領域に結合することを示しているが、我々の解析では、TATA の有無によらず、TSS のすぐ上流の GC リッチ領域に TFIIB のサミットが位置していた。このため分裂酵母の細胞内では、仮に TFIIB が TATA をまたぐように配置するとしても、それは一過性のものだと思われる。

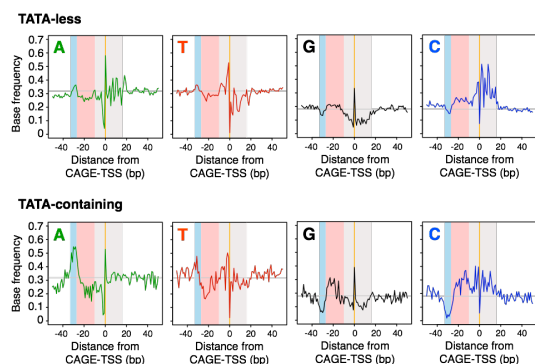


図 6. TATA の有無と TSS 周辺の塩基構成の関係

分裂酵母の TSS 付近がモチーフとして検出可能なほど特殊であることから、我々は、純粋に DNA 配列のみを対象として潜在的な TSS を予測できると考えた。分裂酵母の全ゲノムを対象として、21 塩基対の Motif1 に類似する配列を FIMO で検索したところ、検出されたモチーフは高い頻度で実際の TSS と重なっており、転写方向も合致していた (図 1 と図 7)。興味深いことに、部分的に重複するかたちでモチーフが検出されることがあり、そういった遺伝子は主要な CAGE シグナル (TSS) を複数もっていた (図 7)。

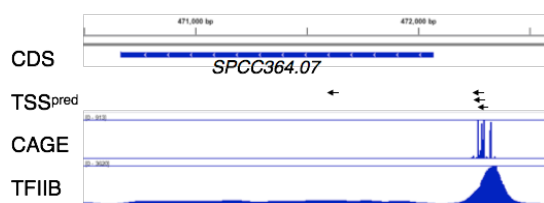


図 7. 主要な TSS を複数もつ遺伝子の例。

我々は、分裂酵母の Iws1 が転写開始時から伸長初期のある段階で RNAPII の制御にかかわる可能性を示唆する情報を得たが、そもそも分裂酵母の TSS には不明な点が多すぎるという課題に直面した。TSS に関する詳細な調査の結果、Iws1 の不在で RNAPII が蓄積するリボソームサブユニット遺伝子の TSS の上流には homolD と homolE が位置することが判明した。しかしながら、homolD と homolE が TATA の代替機能を担うという既存の予測に反し、これらは TSS から離れた位置に存在していたので、転写開始制御という観点から

TATA と異なる機能をもっている可能性がある。興味深いことに、分裂酵母の TSS には高等真核生物の Inr を彷彿させるモチーフがあり、その上流に GC リッチな領域があることから、高等真核生物のモデルとして価値が高いかもしれない。驚くべきことに、どうやら分裂酵母では DNA 配列からプロモーターの予測が可能らしい。今後は、プロモーターの人工的なデザインや、それによる転写機構の研究等への応用が期待される。

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 1 件)

① Shota Suzuki, Hiroaki Kato, Yutaka Suzuki, Yuji Chikashige, Yasushi Hiraoka, Hiroshi Kimura, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Shinya Takahata, Yota Murakami.

Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast.

Nucleic Acids Research 2016, May 19;44(9):4147-62

doi: 10.1093/nar/gkw008 (査読あり)

[学会発表] (計 3 件)

① Hiroaki Kato, Shinya Takahata, Yota Murakami and Takeshi Urano. Coupling of Transcription and Nucleosome Destabilization in Fission Yeast.

International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function (ISCSDF2015) 2015年8月24日、淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)

② 加藤太陽、高畑信也、村上洋太、浦野健 遺伝子の 5' 非翻訳領域で観察される未知の mRNA プロセッシング

生化学会 中国・四国支部例会 2015年5月29日、島根大学 (島根県松江市)

③ 加藤太陽、高畑信也、村上洋太、浦野健 分裂酵母の転写開始点のマッピング

第9回エピジェネティクス研究会年会 2015年5月26日、一橋講堂 (東京都)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 太陽 (KATO, Hiroaki)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 40548418