

研究課題別評価

1. 研究課題名 :クロマチン情報が親鎖から娘鎖に維持伝承される機構

2. 研究者氏名 柴原 慶一

グループメンバー 小山 真 (研究期間 H13.4.1. ~ H14.3.31.)

3. 研究の狙い:

遺伝子発現状態を制御するクロマチン情報が、真核生物の細胞増殖過程において、親細胞から娘細胞へと維持・伝承される仕組みに興味があり研究を展開している。当プロジェクトでは、DNA 複製に伴う速やかなヌクレオソーム形成反応に着目し、その機構及び生物学的意義の理解を目指した。

具体的には、自身が提案した *in vitro* 再構成系により、同反応に必要な活性群を同定し、その解析を進めることで反応機構を理解すること。DNA 複製装置と同ヌクレオソーム形成反応の機能的関連を明らかにすること。さらに、関連する因子群の高等植物シロイヌナズナホモログの変異株を解析し、クロマチン情報が維持・伝承される仕組みへの同ヌクレオソーム形成反応の寄与を実証すること、の三点を目指した。

4. 研究結果:

(1) DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成反応機構の理解

CAF-1 による複製 DNA の識別機構は長らく不明であった。我々は、DNA ポリメレースクランプとして機能する複製必須因子 PCNA が、CAF-1 と蛋白-蛋白相互作用することで CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成に関与することを、本プロジェクト開始以前に提唱していた。そこで、出芽酵母の CAF-1p150 サブユニットホモログとの結合能が弱い変異型 PCNA をもった出芽酵母変異株を探索し、解析した。cac 変異株と同様の表現型、例えば、ジーンサイレンシングの脱抑制が認められることなどを観察した。さらに、他のグループからは、ヌクレオチド除去修復に伴う CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成にも PCNA が関与すること、PCNA 結合モチーフに変異をもつ出芽酵母 CAF-1 複合体では、ヌクレオソーム形成反応を促進する活性は維持されるが、複製 DNA に対する選択的なヌクレオソーム形成反応を促進する活性が、特異的に失われていることが示された。これら一連の観察から、PCNA と CAF-1 との相互作用が、CAF-1 による複製 DNA への選択的なヌクレオソーム形成反応に必要であると、ほぼ結論できると考えた。

複製後 DNA に PCNA が滞留している限り、その DNA が CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成反応の優れたテンプレートに成り得るといふ観察を元に、ゲル濾過カラムにより粗精製した複製反応後 DNA を CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成に用いるという新規な再構成系を提案した。この系により、複製 DNA、CAF-1、ヒストン、PCNA 以外の複数の未同定因子が、効率的なヌクレオソーム形成反応には不可欠であることを示し、その同定を試みた。そのうちのひとつは、他グループから既に報告されていた RCAF (ASF1/CIA とヒストン H3.H4) であった。CAF-1 の p60 サブユニットは ASF1/CIA と相互作用することをいち早く見いだしたが、生細胞中での結合の正否の確認がとれず論文発表を躊躇していた。しかし最近になって、タグを付けた CAF-1 を恒常発現するヒト293細胞を樹立し、CAF-1 を含む蛋白複合体の精製を試みたところ、生細胞中でも RCAF は一部の CAF-1 と機能的複合体を形成することが判明した。RCAF の CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成

における作用機序に興味を持たれる。一方、RCAF 以外の活性の同定には、アッセイ上の問題もあり苦難している。

酵母の遺伝学的解析等より存在が予想された CAF-1 に依存しないが、複製 DNA に対して選択的をもつヌクレオソーム形成経路の同定を試みた。具体的には、出芽酵母で *cac1?* 変異株を作成し、その酵母細胞抽出液中に、CAF-1 同様、複製 DNA を選別しそれを選択的にヌクレオソームに変換する活性があるかどうかを入念に検討した。結果、検出できる明らかな活性は存在しないという結論に至った。

(2) シロイヌナズナ変異株の解析

CAF-1 のシロイヌナズナホモログ変異株 (*fas* 変異株) の解析を、京都大学のグループと共同で行った。ヒトCAF-1 の3つのサブユニットはシロイヌナズナでも保存されていて、複合三量体を形成し複製 DNA を選択的にヌクレオソームに変換する反応を促進するというヒトCAF-1 と同様な活性が確認された。*fas* 変異株の茎頂分裂組織は、幹細胞集団と器官分化に関わる細胞集団との組織学的区分がはっきりしていない。また、根端分裂組織は、様々な始原細胞の配列 振る舞いに異常が認められ、細胞の層状構造も不規則になっていた。さらに、この表現型の程度が個体ごとに、或いは同じ個体でも分裂組織ごとにまちまちであった。分裂組織の特殊な細胞のみで限局的な発現を示す遺伝子、WUS と SCR の発現を観察したところ、興味深い異常が観察された。本来発現しない細胞での異所性発現や、本来発現するはずの細胞での発現消失が認められた。また、この異常の方向性、時期、部位に一貫性がないばかりでなく、その程度も分裂組織毎にまちまちで低頻度なものであった。

セントロメア近傍に位置する通常野生型では発現が認められない遺伝子 TSI と CACTA の発現を *fas* 変異株で検討した結果、個体内の一部の細胞のみにて散発的で低頻度にそのジーンサイレンシングの脱抑制が認められた。また、このジーンサイレンシングの脱抑制は個体の成育につれて蓄積する傾向にあった。

これらユニークな遺伝子発現異常は、*caf-1* 変異株ではあたかも、細胞の増殖過程を通じて遺伝子の発現状態が安定的に維持され難いといったことを推察させるような結果であった。

5. 自己評価：

当初は、生化学的な解析を元にした DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成機構の解析を中心に課題を提案したが、蛋白解析の研究環境を立ち上げるのに時間がかかったこと、データの不備を理由に論文投稿に慎重になりすぎ競合相手に先をこされたことなどにより期待した成果を発表できなかったことは大いに悔やまれる。一方、シロイヌナズナ *caf-1* 変異株の解析を通じて、CAF-1 依存的なヌクレオソーム形成の細胞内での役割を考察し、複製後の速やかなヌクレオソーム形成の意義を理解する上で先鞭となるような研究ができたことは一定の評価に値すると思う。

6. 研究総括の見解

ヒト遺伝子コト解読終了に続いて、ポストゲノムの重要課題としてエピジェネティック機構の解明への動向が急上昇しつつある。シロイヌナズナという植物材料を用いて、その利点を巧みに活用して実質的かつ波及効果の高い成果をあげ、上記分野の新たな展開に貢献したことは高く評価できる。

7. 主な論文等：

(1) 論文

- Zhang Z, Shibahara K-i, Stillman B. PCNA connects DNA replication to epigenetic inheritance in yeast. *Nature* 408:221-225. 2000.
- Kaya, H., Shibahara, K-i, Tasaka, K-I, Iwabuchi, M, Stillman, B., and Araki, T. FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in Arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell*. 104, 131-142. 2001
- Yang, H-s, Jansen, AP, Rajalakshimi, N, Shibahara, K-i, Verma, AK, Cmarik, JL, and Colburn, NH. A novel transformation suppressor, Pdcd4, inhibits AP-1 transactivation but not NF-kB or ODC transactivation. *Oncogene*, 20 (6): 669-676. 2002
- Takeda, S., Tadele, Z., Hofmann, I., Probst, A. V., Angelis, K. J., Kaya, H., Araki, T., Mengiste, T., Scheid, O. M., Shibahara, K-i, Scheel, D., Paszkowski, J.. BRU1, a novel link between responses to DNA damage and epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Genes & Dev* 18, 782-793 2004.
- Ishikawa, Y., Endo, M., Osakabe, K., Abe, K., Ito, Y., Kameya, T., Kaya, H., Araki, T., Ichikawa, H, Shibahara, K-i, Hohn, B. and Toki, S.: Enhanced homologous recombination in chromatin assembly factor-1 mutants of Arabidopsis thaliana Submitted.
- Kaya, H., Araki, T., Shibahara, K-i: fas mutant shows de-repression of gene silencing at peri-centromeric region in a stochastic manner. in preparation.

(2) 総説

- 賀屋秀隆, 柴原慶一, 荒木崇 :CAF-1 のシロイヌナズナ後胚発生において役割、細胞工学、Vol.20 No.2,176-177. 2001
- 柴原慶一 :DNA 複製に伴うクロマチン構築のメカニズム、細胞工学、Vol.20 No.3、368-372 2001
- 久保知大, 柴原慶一 DNA 複製に伴うヌクレオソームアセンブリー、'ゲノムの複製と分配' シュプリンガー・フェアラーク社刊、p194-p199. 2002
- 久保知大, 柴原慶一 DNA 複製期のヌクレオソームアセンブリー、実験医学増刊「エピジェネティクスと遺伝子発現制御」, VOL.21 No.11, 24-28. 2003
- 久保知大, 柴原慶一 DNA 複製及びヌクレオチド除去修復に伴うヌクレオソーム形成、わかる実験医学「DNA 複製とDNA 修復」, 88-93. 2004

(3) 口頭発表

国際会議

- Kaya, H., Araki, T., Shibahara, K-i: Implications of FAS and ASF1 in Maintaining the Cellular Organization of Apical Meristems, XIII International Conference on Arabidopsis Research, July 2002
- Werner, M. H., Ahujas, S., Mendeleev, N., Ito, Y., Huang, G., Shigesada, K., Osato, M., Liu, P. P., Krude, T., and Shibahara, K-i. Chromatin assembly and acute human leukemia. HFSP Awardees Meeting in Japan, May 2004

国内会議（下記の招待口演 14 件を含む計 16 件）

- ・ 柴原慶一 DNA 複製、クロマチンアセンブリー 及びエピジェネティック維持のリンカー因子としての PCNA の役割、第 18 回染色体ワークショップ、2001 年 1 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一、荒木崇 高等植物における CAF-1 の機能、第 18 回染色体ワークショップ、2001 年 1 月
- ・ 賀屋秀隆、久保知大、荒木崇、柴原慶一 複製期クロマチン構築に関与する因子群がシロイヌナズナ形態形成において果たす役割、第 74 回日本生化学会大会、2001 年 10 月
- ・ 柴原慶一 DNA 複製に伴うヌクレオソームアセンブリー において CAF 1 及び ASF1 が果たす役割、第 9 回弘前大学遺伝子実験施設シンポジウム、2001 年 11 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一 シロイヌナズナ HIRA 遺伝子の機能欠損変異体の単離、第 24 回日本分子生物学会年会
- ・ 賀屋秀隆、久保知大、柴原慶一 DNA 複製に伴うヌクレオソームアセンブリー において CAF? 1 及び ASF1 が果たす役割、第 24 回日本分子生物学会年会、2001 年 12 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一 FAS と相互作用するシロイヌナズナ ASF 1 の機能欠損変異体の単離、第 42 回日本植物生理学会年会、2002 年 3 月
- ・ 柴原慶一 細胞複製に伴うクロマチン維持の機構、The 841st Biological Symposium、2002 年 7 月
- ・ 柴原慶一 DNA 複製に伴うヌクレオソームアセンブリー の機構論と生命システムにおける意義、第 75 回日本生化学大 2002 年 11 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一 第 25 回日本分子生物学会、ヒストン結合蛋白 ASF1 のシロイヌナズナの器官形成における役割、2002 年 12 月
- ・ 賀屋秀隆、荒木崇、柴原慶一 シロイヌナズナ形態形成におけるヌクレオソーム形成関連遺伝子群の役割、第 43 回日本植物生理学会、2003 年 3 月
- ・ 賀屋秀隆、荒木崇、柴原慶一 クロマチン構築因子 ASF1 のシロイヌナズナ形態形成における役割、日本植物学会第 67 回大会、2003 年 8 月
- ・ 賀屋秀隆、柴原慶一 DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成機構及びそ生体内における役割、国立遺伝学研究所研究会「クロマチンの生物学」、2003 年 11 月
- ・ 久保知大、賀屋秀隆、柴原慶一 DNA 複製に伴うヌクレオソーム形成反応の機構、第 26 回分子生物学会年会シンポジウム、2003 年 12 月