

研究報告書

「複合体解析から挑む動的エピゲノム制御と多様性」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 田上 英明

1. 研究のねらい

DNA メチル化およびヒストン化学修飾を介したクロマチン高次構造制御が、DNA 配列に依存しないエピジェネティクスの分子基盤である。細胞メモリーとしての機能を持つエピゲノム情報は可塑的であると同時に、非常にダイナミックであることが明らかとなってきた。静的なクロマチン修飾状態を網羅的に解析するだけでなく、ヒストン分子も含めた動態制御の理解が今後の課題であろう。本研究「複合体解析から挑む動的エピゲノム制御と多様性」では、動的なエピゲノム情報の形成・維持・変換機構およびその破綻の分子メカニズムとその分子戦略の多様性を理解するために、クロマチン制御の反応中間体である可溶性(クロマチンに挿入されていない)ヒストンと相互作用する因子群を機能複合体として解析する。動的エピゲノム制御因子として作用する候補因子を可溶性ヒストン複合体として生化学的なスクリーニングを行い、その機能解析より複雑で機能重複性やバックアップ機構が絡むネットワークの理解を目指すものである。特に、分裂酵母における可溶性ヒストン H3 結合因子として新規に同定した HiTAP1(Histone H3(Three) associated protein 1)に着目し、その分子機能と生理的意義を明らかにする。さらに、様々な条件における複合体制製法の確立など新技術の創成を狙うと同時に、クロマチンダイナミクスに關与する機能因子群や可溶性ヒストンの量的バランス制御が、核内のみならず細胞質での代謝系や細胞増殖制御、細胞寿命と如何に關連するか、という新しい課題にも挑戦する。酵母から植物、ヒト培養細胞、マウスまで様々なモデルシステムを用いて、分子生物学・生化学的手法を中心に、細胞生物学、構造生物学、分子遺伝学を組み合わせることにより多角的に解析を進め、クロマチン制御の共通基盤と多様性について理解したい。

2. 研究成果

(1) 概要

酵母をモデル系として、内在性ヒストン遺伝子 C 末端に FLAG/HA エピトープタグを付加した細胞株から様々な条件(対数増殖期、定常期、細胞周期同調系、クロスリンクの有無や固定法、抽出法)で各種ヒストン複合体を精製する解析系を構築している。このような生化学的スクリーニングにより、これまでに既知のヒストンシャペロン以外に多くのヒストンパートナーを得ている。本研究では、分裂酵母の可溶性 H3 複合体の構成成分として新規に単離した HiTAP1(Histone H3(Three) Associated Protein 1) に焦点を絞り、分子機能解析を進めることで、以下の点を明らかにした。

HiTAP1 は H3 と優先的に結合し、3 ヘリックスバンドル構造を持つ C 末端領域が、新規 H3 結合モチーフである。細胞内で HiTAP1 と結合する H3 は新規合成ヒストンマークである 56 番目のリジンのアセチル化が見られず、転写活性と關連する 4 番目のリジンがメチル化されるこ

とより、細胞内においても H3/H4 を分離させることが示唆される。また、HiTAP1 の酸性領域および C 末端領域のみを核で大量発現させると著しい増殖阻害が見られるが、この阻害には H3 相互作用部位が必要であることを明らかにした。

種間を通して高度に保存された HiTAP1 の機能について、植物、マウスといった多細胞系においても、それぞれ根の生長や生殖への関与を見だし、共通性と多様性について今後さらに解析を進める手がかりを掴むことに成功している。

ヒストン H3 量的制御に関与する候補因子として SPBC776.07 を同定し、その相互作用解析から核-細胞質-ミトコンドリアの機能連携やクロマチンと代謝との関連性を示唆する結果を得ている。

可溶性ヒストン複合体の機能解析から新規に見いだした因子群の機能解析とその共通性や多様性を理解することにより、動的エピゲノム制御の分子基盤の解明につながる事が期待される。

(2) 詳細

研究テーマ A「HiTAP1 の分子機能と生理的意義の解明」

HiTAP1 は分裂酵母からヒトまで高度に保存されたタンパク質で、分裂酵母においてその過剰発現によって染色体分配異常を引き起こし、致死性を持つ因子(Mlo2, N.A.R.(1996))として報告されているが、その分子機能は全く不明であった。我々は、H3/H4 二量体と結合する既知のヒストンシャペロン Asf1 と比較することにより、細胞内で HiTAP1 は H3 と優先的に結合することを見いだした。HiTAP1 と共精製される H3 には新規合成ヒストンに特異的な 56 番目のリジン残基のアセチル化(K56Ac)が見られず、転写活性と関連する 4 番目のリジン残基のメチル化(K4Me2/3)が見られることから、H4 と解離した古い H3 であることが示唆された。*in vitro* において、リコンビナント HiTAP1 は複数部位で H3/H4 と結合するものの、C 末端 50 アミノ酸は H4 を解離し、H3 と優先的に結合することが明らかとなった。従来、H3/H4 は安定で二量体/四量体がユニットとされてきたが、H3/H4 を解離させる活性が初めて見出された。何故ヘテロ二量体というシステムがすべての真核生物に保存されているか、解く鍵になるかもしれないと期待される。

in vitro における結合実験により、HiTAP1 C 末端断片はヒトでも保存されている Y288A および K292A 変異で H3 結合活性が低下した。NMR 構造解析により、HiTAP1 C 末端断片は新規の 3 ヘリックスバンドル構造であり、上記の部位は同一の表面に位置することを明らかにした。NLS-GFP を付加した酸性領域を含む HiTAP1 C 末端領域を大量発現すると強い増殖阻害を引き起こし、上記の H3 結合部位の点変異により抑圧されることを明らかにし、HiTAP1-H3 相互作用が核内で機能をしていることが示唆された。

研究テーマ B「HiTAP1 機能の共通性と多様性」

HiTAP1 は高度に保存されており、ヒトの可溶性 H3 複合体にも含まれることを確認し、HiTAP1-H3 相互作用の共通基盤が示唆される。植物モデルであるシロイヌナズナでは、根で多く発現し、その生長に関与することが確認された。現在、KO マウスを作成しているが、生殖への関与が示唆されている。多細胞生物における HiTAP1 の機能についてはこれからの課

題であるが、個体レベルでの表現型を初めて示すことに成功している。

研究テーマ C「ヒストン量的制御に関与する因子の探索」

DNA 複製時にクロマチン構造も倍加するため、ゲノム DNA とヒストン分子間の量的バランスは厳密に制御される必要がある。このバランスが如何に制御されているのか、破綻が何を引き起こすのか、H3 過剰発現時の複合体解析を行った。その結果、機能未知の SPBC776.07 を同定した。SPBC776.07 は、主にミトコンドリアマトリックスや細胞質に局在する Mam33 ファミリータンパク質で、出芽酵母からヒトまで保存されている。出芽酵母では、ミトコンドリア内での酸化的リン酸化や翻訳への関与が報告されており、ヒトでは、補体 C1q に結合する受容体 gC1qR としても報告されているが、ヒストンとの関連性については全く不明である。

内在性 SPBC776.07 にエピトープタグを付加して相互作用因子を探索したところ、脂肪酸合成(Fas1, Lsd1)やクエン酸回路(SPBP4H10.15)に関与するタンパク質を同定した。分裂酵母の脂肪酸合成酵素 Lsd1 は、核分裂異常の示す変異体としても報告されているが、ヒストン H3 過剰発現と代謝や呼吸といった細胞機能が如何に関連づけられるのか、今後の課題である。

3. 今後の展開

クロマチン高次構造はゲノム・エピゲノム統合性と関連して厳密に制御されるもので、その破綻が細胞がん化などにおけるゲノム不安定性と密接に関わる。また、クロマチン修飾の供与体は、アセチル-CoA や S-アデノシルメチオニン(SAM)という非常に重要な中間代謝産物であり、クロマチン制御と細胞の代謝、増殖、寿命とは密接に関わる。

可溶性ヒストン複合体の機能解析から新規に見いだした HiTAP1 や SPBC776.07 の機能解析とその共通性や多様性を理解することにより、動的エピゲノム制御の分子基盤の解明を目指してさらに研究を展開したい。また、動的な複合体精製法の確立やクロマチン動態の解析手法をについてさらに改良を重ねることにより、新技術の創成や新しい研究展開を目指す。これらの基礎研究から得られる成果は、エピゲノム制御に基づく細胞リプログラミングやがんなどの疾患に対するポストゲノム医療やバイオテクノロジー技術開発のためのシーズとなることも期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究の目的に対しては、有効的に研究備品を活用して多角的な解析を進めることで一定の成果を上げることができたと感じている。特に、および領域内外の共同研究により単独で解析すべてを行うのではなく、有機的な連携により効果的に研究展開できたと考えている。一方で、小さい研究室で博士後期課程に進学するなど研究者を目指す学生がいない中、1, 2 名の研究補助者だけで研究を実施することの難しさも改めて痛感した。年 2 回の領域会議で毎回成果を出すことに余裕なく追われてしまったという反省もある。納得するまでできることはやり

きるために生化学の地道な解析の積み重ねは当然必要であるが、より戦略的に研究を進めて成果を論文という形で連続的に世界に発信する努力をしたい。研究成果を論文として広く発信することが、サイエンスの進歩に欠かせないことは言うまでもないが、社会に対する大きな責任であり、一番の社会貢献であると考えている。今後はこの経験を糧にして、モチベーションを持つ学生を指導して次代を担う人材育成ができるような研究室運営を目指したいと考えている。基礎研究は、すぐに役立つものではないものの、一般社会への波及効果を常に意識して研究を進めたいと考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

可溶性ヒストン複合体から動的エピゲノム制御を理解するとの考えのもと、新規 H3 結合因子 HiTAP1 を見出し、その分子の生化学的性質、分子機能、生理的意義、量的制御などについて解析した。その結果、この分子は真核生物で保存され、H3 と優先的に結合し、H3/H4 を解離させる活性が見出された。さらに、HiTAP1 の C 末領域を過剰発現すると増殖阻害を起こすこと、ノックアウトマウスでは生殖や発育にも関わること、また、過剰発現時の複合体解析より、代謝や呼吸機能に関わることも示唆されている。このように多くの結果が得られているので現状で取りまとめることを進める。今後得られたデータをもとに、HiTAP1 の生理機能にせまるストーリーを構築する必要がある。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Gohei Nishibuchi, Yukimasa Shibata, Tomohiro Hayakawa, Noriyo Hayakawa, Yasuko Ohtani, Kaori Sinmyozu, **Hideaki Tagami** and Jun-ichi Nakayama. Physical and Functional Interactions between the Histone H3K4 Demethylase KDM5A and the Nucleosome Remodeling and Deacetylase (NuRD) Complex. (2014) *J. Biol. Chem.* 289, 28956–28970
2. Gohei Nishibuchi, Shinichi Machida, Akihisa Osakabe, Hiromu Murakoshi, Kyoko Hiragami-Hamada, Reiko Nakagawa, Wolfgang Fischle, Yoshifumi Nishimura, Hitoshi Kurumizaka, **Hideaki Tagami** and Jun-ichi Nakayama. N-terminal phosphorylation of HP1 α increases its nucleosome-binding specificity. (2014) *Nucl. Acids Res.* in press.

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

- ・ **Hideaki Tagami**, Yuko Sakakura, Maki Kato, Role of a new histone H3 binding protein in chromatin regulation., International symposium “Message from yeast to Epigenetics~

Yeast clarifies the frontiers of life science～”, Fukui, Sep.2-4.2013

- **Hideaki Tagami**, Role of a new histone H3 binding protein in chromatin regulation., Cold Spring Harbor Asia conference “Epigenetics, Chromatin & Transcription”, Suzhou, China, May 5-9, 2014
- **Hideaki Tagami**, A novel histone H3 associated protein 1 (HiTAP1) is involved in histone level/balance control. 11th EMBL Conference: Transcription and Chromatin, Heidelberg, Germany, August 23-26, 2014