

染色体分配時のコアヒストン機能の解明

[1] 組織

代表者：関 政幸
(東北薬科大学)
対応者：田中 耕三
(東北大学加齢医学研究所)
分担者：中林 悠
(東北薬科大学)

研究費：物件費 24 万 2 千 399 円，旅費 0 円

[2] 研究経過

背景

真核細胞の DNA は、塩基性のタンパク質であるヒストン八量体(ヒストン H2A, H2B, H3, H4 のそれぞれ二分子から成る)に巻き付き、ヌクレオソームと呼ばれる構造をとる。転写、DNA 複製、DNA 修復などの様々な DNA 介在反応はヌクレオソーム構造によって負に制御されているため、それぞれの DNA 介在反応が進行するためには、適正なヌクレオソームの制御が必要と考えられている。染色体分配の基質である染色体自身もヌクレオソーム構造をもつ DNA から構成されているため、染色体分配時に特有のヌクレオソームの制御機構の存在が予想できる。実際、我々は出芽酵母の 439 のヒストン点突然変異株に対し、微小管阻害剤 (TBZ および benomyl) 感受性を指標に、染色体分配に異常をきたす **TBZ/benomyl sensitive (TBS)** ヒストン点突然変異株 24 株を取得していた。変異により表現型を示す 24 残基のうち一つを除いた 23 残基は TBS-I-III と名付けたヌクレオソームの領域のいずれかにマップされた。TBS-I と -II に関しては平成 22, 23 年度の共同研究により Sgo1 (染色体分配に関わるタンパク質)との関係が深いことを報告した。一方、平成 24 年度の共同研究により TBS-III についてヒストン H2A のバリエントである Htz1 との関連が示唆されたものの、その詳細な機能については不明のままである。

目的

ヌクレオソームと様々な DNA 介在反応に関する研究は、近年ますますその重要性を増している。しかし、染色体分配におけるヌクレオソームの役割についてはほとんど研究がなされていない。本共同研究では、背景で紹介した TBS-III 領域に属するコアヒストンの 4 残基 (H2B-D71, H4-L97, -Y98, -G99) に着目し、それらの性状解析を行ない、ヒストンの TBS-III が染色体分配に寄与する分子機構の解明を目指した。

概要

研究活動状況の概要は以下である。フローサイトメトリーによる細胞周期の解析や ChIP 解析は主に東北薬科大学で行ない、Delta vision (顕微鏡)を用いた細胞生物学的な解析およびテトラド装置を用いた新規な酵母株の樹立を東北大学加齢医学研究所で行なった。主に分担者の中林が両研究室を行き来し、実験を行ない、田中と関はデータの解釈、議論を行ない、研究を円滑に遂行する体制をとった。

研究打ち合わせ等の開催状況

基本的には、分担者の中林が東北薬科大学において関と議論し、加齢研において田中と議論し、関と田中は電話やメールなどで新規なデータの解釈や、次の実験の方針などを議論し、さらに 3 ヶ月に一度は、関、田中、中林が一同に会し (東北薬科大学 or 加齢研究にて)、研究打ち合わせを開催した。

[3] 成果

(3-1) 研究成果

本年度は、以下に示す研究成果を得た。

まず第 1 に、TBS-III と名付けた領域はヌクレオソームの内部に位置する 4 残基 (H2B-D71, H4-L97, -Y98, -G99) が該当する。以前の田中 (加

齡研) と関 (東北薬科大) の研究成果として、H4-L97A変異株でヒストンバリエントHtz1のクロマチン結合が著しく低下することを見いだしていた (*EMBO J.* 30, 3353-3367, 2011)。そこで、TBS-IIIの他の3残基についても調べたところ、H2B-D71A, H4-Y98A, -G99A 変異株での同様に Htz1 のクロマチン結合量が低下していた。

第2に、セントロメア領域に結合する Cse4 (ヒストン H3 バリエント) の量が、上記の4つのTBS-III株で低下するか ChIP法を用いて調べた。その結果、Cse4 はいずれの4つの変異株でも十分量セントロメアに結合していた。

第3に、TBS-III 変異株がM期を正常に通過できるか調べるため、微小管重合阻害剤ノコダゾール (Noc) でM期同調した細胞を、Noc無しの培地で培養した。その結果、4つのTBS-III 変異株ではM期進行の指標としてのコヒーシンのサブユニット (Scc1)の分解が遅れ、かつ flow cytometer による細胞周期の進行も遅れた。

第4に、TBS-III 変異株におけるセントロメア周辺の Cse4 (第2の項参照) 以外のタンパク質の動態を ChIP法で調べた。その結果、H2B-D71A 変異株 (TBS-III の代表として) において Scm3, Ctf3, Bub1, Nuf2, Dam1 などを含めた複数の因子のセントロメアへの結合が大幅に低下していた。

第5に、クロマチンへの結合量が低下したタンパク質 (第4の結果) について、細胞内のタンパク量をウェスタン法によりチェックした。その結果、Scm3, Ctf3, Bub1, Nuf2, Dam1 のタンパク量が H2B-D71A 株で大きく低下するという予想外の結果を得た。

第6に、第5の実験でタンパク量が低下した Scm3 につき、その転写量が少ない可能性をノザンブロッティング法で検証した。その結果、H2B-D71A 変異株において *HTZ1* の転写量は野生型と同じであったのに対し、*SCM3* の転写量は半分まで低下した。第4~6までの結果から、H2B-D71A 株において *HTZ1* は十分に転写されているが、その翻訳産物はクロマチンに結合できない。Htz1 はプロモーター領域に存在することから、*SCM3* の転写の低下が H2B-D71A 株における Htz1 の機能不全により副次的に誘導される可能性が考えられた。実際、*SCM3* のプロモーター領域において Htz1 量は H2B-D71A 変異株では野生株に比べほぼ完全に消失していた。

以上の実験結果を総合すると、TBS-III 変異により Htz1 の機能が不全なり、まず染色体分配因子の転写量の低下が起こる。それが副次的な要因となって、セントロメア周辺での染色体分配因子群の結合不全が起こる。それらの総和として染色体分配に異常が起こると考えられる。

(3-2) 波及効果と発展性など

本年度末で4年間継続の本共同研究は、平成22年度に「コアヒストンの視点からDNA介在反応におけるクロマチン制御機構を捉える」という新しい視点が評価され、その年に新規に発足した新学術研究領域「ゲノム複製・修復・転写のカップリングと普遍的なクロマチン構造変換機構」中の計画研究のひとつに採用され、今も継続中である。

本共同研究の中間点における、TBS-I と -II に関する成果は、論文(1)の発表に繋がり、その内容は平成23年8月5日付けの科学新聞に記事として紹介されている。本年度の TBS-III に関する成果もセントロメアにおけるヒストンの役割に関し、新しい視点を提供する効果が期待されるため、論文による公表を急ぎたい。

一方、本研究で見いだした H2B-D71A 変異について「その変異に由来する表現型はカノニカルなヒストンH2AとH2Bからなる二量体の機能不全に依るのか、あるいはヒストンバリエント Htz1 と H2B からなる二量体の機能不全に依るのか、を区別できるか？」という問題提起を行い、後者の機能不全に依るとの実験的証拠を得ることに成功した (論文2)。その内容は、平成26年1月24日付けの科学新聞に記事として紹介された。

[4] 成果資料

- (1) Satoshi Kawashima, Yu Nakabayashi, Kazuko Matsubara, Norihiko Sano, Takemi Enomoto, Kozo Tanaka, Masayuki Seki and Masami Horikoshi “Global analysis of core histones reveals nucleosomal surfaces required for chromosome bi-orientation” *EMBO J.* 30, 3353-3367, 2011(の3人とともに corresponding authors)
- (2) Yu Nakabayashi, Satoshi Kawashima, Takemi Enomoto, Masayuki Seki and Masami Horikoshi “Roles of common subunits within distinct multisubunit complexes” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 111, 699-704, 2014(の2人とともに corresponding authors)