

## 分裂酵母を用いたヘテロクロマチン形成・維持機構の解明

●村上洋太

京都大学ウイルス研究所がんウイルス部門

### 〈研究の目的と進め方〉

ゲノムにコードされる遺伝情報の発現や、ゲノムの複製・分配・組換えといったゲノムの維持機構の制御において染色体の高次構造が重要な役割を果たしている。なかでも、ヘテロクロマチン構造がゲノム全体の遺伝子発現に積極的に関与することが示されつつあった。また、染色体の維持に重要なセントロメアやテロメア領域もヘテロクロマチン構造を取っていて、その構造がそれぞれの領域の機能に重要であることがわかった。従ってゲノムの機能発現の全体像を知るためには、ヘテロクロマチンの形成・維持機構を理解することが必須と考えた。

申請者は複製開始点に特異的に結合し複製に必須の複合体であるORC (Origin Recognition Complex)、及び哺乳類細胞のセントロメア特異的なDNA結合蛋白質のCENP-Bの分裂酵母ホモログ(Cbh)について解析をおこなってきた。今までにORCがmating locusのCENP-Bがセントロメアのヘテロクロマチン構造の形成・維持にかかわることを示唆する結果を得ていた。mating locusのヘテロクロマチン形成に重要な領域はセントロメアに存在するrepeated配列と高い相同性を示し、双方のヘテロクロマチン形成は共通のメカニズムを使っている可能性が強い。これらの結果をもとに、本研究では、分裂酵母のORC及びCENP-Bホモログがセントロメア・mating locusのヘテロクロマチンにおいて果たす役割を明らかにすることを通して、ヘテロクロマチン構造の形成・維持機構の一端を明らかにすることを目的とした。

### 〈研究開始時の研究計画〉

(1) ORC, Cbhのゲノム上、特にヘテロクロマチン領域での結合部位の決定

A) 蛋白質とDNAの間にクロスリンクをかけた後、Cbh蛋白質、Orc蛋白質に対する抗体で免疫沈降を行いそれぞれの蛋白質の結合DNAを単離する方法 (chromatin immuno-precipitation法、CHIP法) を用いて、得られたDNAをPCRや、セントロメア、mating locusの領域を含むDNAチップを用いて解析する。

B) 蛍光抗体染色法やFISHを使い、既知のヘテロクロマチン関連蛋白質(Swi6等)との共局在を検討する。

(2) ORC, Cbhのヘテロクロマチン形成における必要性  
CbhやORCのサブユニットのTs株の単離をおこない、これを用いて以下の解析をおこなう。

A) セントロメア領域のクロマチン構造への効果をセントロメア、mating locus領域での転写のサイレンシングを指標に検討する。さらにクロマチン構造の変化をヌクレアーゼ感受性を用いて検討する。また、既知のヘテロクロマチン形成に関与する遺伝子の変異株との遺伝的相互作用や、局在に対する影響の検討をおこなう。

B) セントロメア、mating locusの機能との関連を、Ts変異の染色体分配やmatign switchingへの影響を指標に検討をおこなう。

### 〈研究期間の成果〉

(1) Cbhのヘテロクロマチン形成の関わり

分裂酵母に3つあるCbhのうちabp1が実際にセントロメアヘテロクロマイチンに結合することをCHIP方で示すとともに (計画1-A)、破壊株を使った解析から3つのCbhがともにヘテロクロマチン特異的なヒストン修飾を介してセントロメアヘテロクロマチン形成さらにセントロメア機能に関与することを示した (計画2-A, B)。 (成果 2)

(2) ORCとヘテロクロマチン

ORCのサブユニットの一つOrc5のTs株を単離した (計画2)。その後の解析でORCが複製だけでなくチェックポイント機能やG2/M期の進行など核内イベントに広く関わることを示した。 (成果 5、投稿中)

(3) ヘテロクロマチン維持とCAF1

計画外であるが研究期間内にOrc5と相互作用する因子をTwo Hybrid screening をおこない複製に共役するクロマチンアセンブリー因子CAF1のサブユニットpcf1を単離した。その後の解析によりCAF1がヘテロクロマイチンの維持に機能することを明らかにしている (投稿準備中)

(4) 新規ヘテロクロマチン関連変異株の単離

これも計画外であったが研究期間内に分裂酵母のヘテロクロマチンに欠損を示す新規変異株のスクリーニングの単離を開始した。期間内に変異株の単離には至らなかったが、その後、スクいくつかの変異株を単離した。その中には脱ユビキチンかにかかわる遺伝子の変異株やRNAポリメラーゼIIの変異株があった。RNPポリメラーゼIIの変異株の詳細な解析から、RNAi依存的なヘテロクロマチン形成に置いて、RNAポリメラーゼIIが中心的な役割をになうことを明らかにした (成果 4)

### 〈国内外での成果の位置づけ〉

(1) 高等真核細胞のHP1を基本とするヘテロクロマチンをもつ出芽酵母ではヘテロクロマチン形成をうながすDNA結合タンパク質の報告があったが、我々のCbhの報告はHP1型ヘテロクロマチンの場所を決めるDNA結合タンパク質の最初の報告であり、いくつかのreviewに取り上げられるなど注目を集めた。その後、さらに他のヘテロクロマチン形成にかかわるDNA結合タンパク質が報告され、このようなメカニズムの普遍性が確認されている。

(2) ORCは複製のみならず多くの染色体機能に関わることを示した点で貴重な成果である。

(3) ヘテロクロマチンの維持に関しては謎が多くその詳細はわかっていない。CAF1は状況証拠からヘテロクロマチンの維持に関わると想像されていたが、我々の結果はそれを直接示すものであり価値が高い。

(4) RNAiがヘテロクロマチン形成に関わることが近年示され大きな注目を集めているが、RNAiの契機となるnon-coding RNAの転写をどのRNAポリメラーゼがおこなうかはわかっていなかった。我々はそれがRNAポリメラーゼIIであることをしめすとともに、この研究計画の結果単離した変異株の解析からRNAポリメラーゼIIが転写反応とその後のnon-coding RNAのプロセシングの共役をおこ

なう中心的因子であることを示した。これはRNA代謝、クロマチン形成をはじめとする広い分野のけん急に一石をと怖じる物であり、その成果は多くのReviewで引用されている。

#### 〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

ORCがヘテロクロマチンにどのように関わるかを明確に示すことができなかった。これはORCが生育に必須なため条件致死変異株の単離をまず試みその解析をおこなったために、複製の機能の欠損とヘテロクロマチン関連の機能を分離して解析することが難しかったことによる。ヘテロクロマチンの表現形に的を絞ったスクリーニングをおこなうべきであった。

Cbhに関してはこれがヘテロクロマチン特異的ヒストン修飾に必要であることは示せたが、その分子メカニズムの解明にいたらなかった。相互作用因子のスクリーニングでも、そのメカニズムに関与する物が得られなかった。生化学的に相互作用因子を精製するなどより徹底的なアプローチをおこなう必要があるだろう。

ヘテロクロマチン変異株のスクリーニングを研究期間中に開始したが、思いのほか時間がかかった。これは、変異株単離後の原因遺伝子の相補性によるスクリーニングがヘテロクロマチン関連変異の場合エピジェネティックな性質などにより機能しなかったことによる。最終的にあらたな遺伝的マッピング法を開発し、原因遺伝子の解明に至ったが、その手法の開発に多くの時間がかかった。

#### 〈今後の課題〉

(1) Cbhの機能解明をおこなう必要がある。Cbhはセントロメアだけでなくすべてのヘテロクロマチンで機能する点で報告されている他のDNA結合タンパク質とは性質が異なりその機能に興味を持たれる。そのゲノム上での結合部位をChIP on chipできめるとともに相互作用因子を徹底的に探索する必要がある。

(2) ORCは他のグループによりヘテロクロマチン領域に密に結合することが示され、何らかの形でヘテロクロマチン形成や機能に寄与している可能性が高い。ヘテロクロマチン特異的に欠陥を示す変異株の単離がその機能解析の有効な手段となるだろう。

(3) CAF1についてはどの程度ヘテロクロマチン複製に関与するかが問題である。まずChIP on chipを使い複製フォークの進行とCAF1の局在の関係を明らかにする必要がある。

(4) RNAポリメラーゼIIとクロマチン形成に関する研究はこれからますますホットになることが予想される。我々の単離したRNAi依存的ヘテロクロマチン特異的に欠陥を示すRNAポリメラーゼIIの変異株を駆使して、その実態を明らかにしていくことが重要と考えている。

(5) ヘテロクロマチン形成にはまだ多くの未知の因子が関与しているのは明らかである。遺伝解析の容易な分裂酵母の利点を生かしてさらに新規変異株を単離を進めることが重要であろう。

#### 〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Kikuchi J., Iwahara J., Kigawa T., Murakami Y., Okazaki T., Yokoyama S., Solution structure determination of the two DNA-binding domains in the *Shizosaccharomyces pombe* Abp1 protein by a combination of dipolar coupling and diffusion anisotropy restraints, *J. Biomol. NMR* 22, 333-347 (2002)

2. Nakagawa H., Lee J-K. Hurwitz, J. Allshire, R. C., Nakayama J-I., Grewal S., Tanaka K. and Murakami Y., Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by promoting heterochromatin specific histone tail modifications, *Genes & Dev.* 16, 1766-1778 (2002)

3. Kato, H., Goro, D. B., Martienssen, R. A., Urano, T., Furukawa, K. and Murakami, Y., RNA polymerase II is required for siRNA generation and peri-centromeric heterochromatin formation in fission yeast, *Science* 309, 467-9 (2005)

4. Marchetti, M. A., Weinberger, M., Murakami, Y., Burhans W. C., and Huberman, J. A., Production of reactive oxygen species in response to replication stress and inappropriate mitosis in fission yeast, (2006) *J. Cell. Sci. in press*