

S 期進行モニターの分子解明

久留米大学 分子生命科学研究所 細胞工学研究部門
高山 優子

1. はじめに 緒言 目的 背景 序論

染色体不安定性による染色体数の変化は、癌やダウン症などの疾患に直結します。最近、私はヒストンがS期限定に発現することが、染色体の安定な維持に重要であることを報告しました (Takayama et al., 2010)。ヒストン遺伝子を強制的にS期以外でも発現させると、染色体の不均衡分配がおこり、細胞が致死になることが分かりました。この結果は、染色体維持のためにヒストン発現は厳密にコントロールされていることを意味しています。ヒストン発現調節機構の1つとして「ヒストン発現」と「DNA複製進行」がお互いの進捗状況をモニターすることが知られています。残念ながら、ヒストン発現調節についての研究知見が乏しく、この分子メカニズムは解明されていません。そこで、「ヒストン発現」と「DNA複製進行」の2つのイベントがどのようにモニターされ情報共有をするのか、その分子メカニズムを明らかにすることを目的としました。

S (Synthesis) 期はその名前の由来にもあるように、DNA複製が行われます。DNA複製により新生DNA鎖ができ、その新生鎖を折りたたむ時に多量のヒストンが必要となります。また、S期以外の時期にヒストンを強制発現させDNA複製とuncoupleにすると、細胞が致死になることが古くから知られています (Meeks-Wagner and Hartwell, 1986)。そのため教科書では、「DNA複製時に多量のヒストンが必要となることから、S期にヒストンの発現量が増加しなければならず、DNA複製とヒストン発現は共役している」と解説されています。また、DNA複製が阻害されるとヒストン発現が抑制されることから、この2つのイベントはお互いに連絡を取り合いながらS期進行をモニターしていると考えられます。しかし、S期進行をモニターする分子機構はこれまで明らかになっていません。

私は、ヒストン転写因子がS期終了にともないSCFユビキチン・プロテアソーム経路によって分解されることを明らかにしました (Takayama et al., 2010)。このような転写因子の分解制御が、ヒストン転写因子をS期に限定し、ヒストン発現がS期にのみ活性化するために重要な仕組みであることが分かりました。興味深いことに、同じSCFユビキチン・プロテアソーム経路によってDNA複製酵素アクセサリ因子の活性調節が行われるとの報告があります (Mamnun et al., 2006)。これらの結果は、SCFを介してヒストン発現とDNA複製が関連していることを強く示唆しています。

このように、ヒストン転写因子とDNA複製関連因子が同じSCFユビキチン・プロテアソーム経路で活性調節されることから、SCF複合体とDNA複製の関連性を明らかにできれば、ヒストン発現とDNA複製の共役をモニターしている分子機構が解明できるのではないかと考えました。

2. 方法

研究材料は、DNA組換え実験や細胞周期の同調実験が容易である分裂酵母を用いました。

SCF複合体・ヒストン転写因子・DNA複製関連因子などを個々に見分けるために、エピトープタグ付けを行いました。免疫沈降を行うときのためにFlag・Myc・HAタグを、顕微鏡下での細胞観察のために蛍光タンパク質であるGFPやCherryのタグを導入しました。細胞周期の同調には、cdc25温度感受性の導入やヒドロキシン尿素 (HU) 処理を行いました。

蛍光タンパク質の細胞内局在の検討には、In situ chromatin binding 法 (Kearsey et al., 2000) を用いて行いました。また、生化学的なアプローチにはchromatin fraction assay法 (Sadaie et al., 2008) を使用しました。

ヒストンやマーカー遺伝子の転写量を測定するために、ホットフェノール法でRNAを調製し、定量RT-PCR法を行いました。このとき、ヒストン遺伝子は重複遺伝子であるため、1遺伝子の転写量を正確に測定するために、Realtime PCRで転写量を算出しました (Takayama and Takahashi, 2007)。

タンパク質が結合しているDNA配列を定量するために、細胞をホルマリン固定後、特異的な抗体で免疫沈降し、共沈してきたDNAをPCRにより定量する、クロマチン免疫法 (ChIP, (Takayama et al., 2008) を用いました。この時、沈降DNA量の比較にはRealtime PCRを用い、全ゲノムに対しての免疫沈降したDNAの割合で評価しました。

3. 結果 研究成果

ヒストン転写因子・SCF・DNA複製因子の核局在観察

ヒストン転写因子Ams2とSCFまたは、DNA複製関連因子であるDNA polymerase α やMcl1との核局在を二重蛍光染色により検討しました。S期初期（HU arrest細胞）やS期中期（HU release後 20 min）の細胞では、Ams2・SCF複合体・DNA複製関連因子は核内で複数のドットを形成しており、その多くは共局在していました。驚いたことに、DNaseI処理によりクロマチンDNAを分解してもこれらのドットは消失することはありませんでした。しかし、Ams2やDNA複製関連因子はDNAに結合することが報告されています。そこで、chromatin fraction assay法により生化学的アプローチで確認しました。単純なDNA結合タンパク質はDNaseI処理前には不溶性分画に存在しますが、DNaseI処理後可溶性分画に移行します。Ams2はDNaseI処理前後ともに不溶性分画に存在していたことから、DNA非依存的にドット形成は維持されていることが示唆されました。

つぎに、この核局在が各因子間で依存関係にあるのかを確認しました。Ams2破壊株内でのSCF複合体・DNA複製関連因子の核内局在を観察しましたが、野生株と同様にドットを形成していました。また、SCFのサブユニットであるF-boxタンパク質の欠失細胞やDNA複製関連因子の温度感受性変異株においても、Ams2の核内局在に大きな変化は見られませんでした。この結果から、ヒストン転写因子Ams2はSCFだけでなくDNA複製因子と核内で共局在しており、その局在は独立して起きていると考えられます。

ヒストン転写因子とSCFのクロマチン結合時期の解析

ヒストン発現とSCFの関連を調べるために、SCF-Mycタグとcdc25変異を導入した細胞を同調培養し、時間経過(15分)ごとにSCFのクロマチン結合の変化を、chromatin fraction assay法で調べました。このとき、ヒストン発現の目安としてヒストン転写因子Ams2のクロマチン結合をマーカーとして使用しました。Ams2はG1後期からS期にかけてクロマチン分画のみに存在していました。対して、SCFは細胞周期を通して、可溶性分画とクロマチン分画の両方に存在し、S期にわずかであるがクロマチン分画存在量の増加が認められました。さらに、ヒストン遺伝子へのAms2、SCF結合時期を特定するために、クロマチン免疫沈降法(ChIP)により解析しました。Ams2はG1後期からS期にかけてヒストン遺伝子プロモーター上に結合しており、これはヒストン発現と一致していました。残念ながら、SCFはnegative controlと優位差がでず結論できませんでした。

ヒストン発現とDNA複製フォーク進行の関連

ヒストン発現がDNA複製フォーク進行到着に影響を受けるかどうかを検討するために、ヒストンプロモーターを持ったGFP遺伝子を複製開始領域(ARS)近傍および遠方に導入した細胞を作成しました。Cdc25温度感受性による細胞同調後、各時間経過の細胞からRNAを調製し、RT-PCRによりGFP mRNA量の定量を行いました。興味深いことに、ARS近傍に挿入したGFP遺伝子発現は、遠方に挿入したGFP遺伝子発現より早期に終了することが分かりました。同時に、ヒストン転写因子Ams2のプロモーターへの結合時期をChIP法で解析しましたが、ARS近傍ヒストンプロモーターと遠方のそれで結合時期に大きな違いは見られませんでした。

4. 考察 まとめ

ヒストン発現とDNA複製の共役をモニターしている分子機構の解明を目指し、始めにヒストン転写とDNA複製に関与する因子間の関係に注目して研究を行いました。

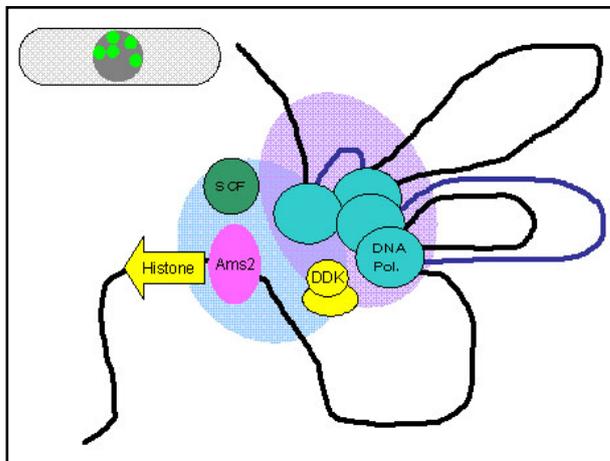
ヒストン転写因子Ams2はG1-S期にかけてヒストンプロモーター上に結合し、S期進行と共に乖離していくことがChIPにより確認できました。さらに、ARSから近傍および遠方にヒストンプロモーターをもつマーカー遺伝子を持たせると、近傍のマーカー遺伝子は遠方のマーカー遺伝子より早期に発現が抑制されました。この結果は、ヒストン遺伝子発現と複製フォーク進行が密接に関連していることを示しており、実験的に証明できるモデル系ができたと思います。今後、さらにこのモデルをブラッシュアップして、研究を進めていきたいと思っています。

今回は、残念ながら、SCFやDNA複製関連因子のヒストンプロモーター上への結合タイミングを調べることはできませんでした。その理由は、タグ融合タンパク質の免疫沈降率が良くない、または直接的なDNA結合でないか非常に弱い結合であるためにChIP法では確認できない可能性があります。今後は、複製フォーク進行を遅延するような処置により検出できないか、検討していきたいと思っています。

DNA複製はreplication factoryと呼ばれる核内fociで行われていると報告されています。今回、ヒストン転写因子Ams2やAms2たんぱく質分解を制御するSCF(ユビキチンリガーゼ)やDDK(S期キナーゼ)が、S期に核内ドットを形成しており、replication factoryと非常に近傍に存在することが観察されました。また、Ams2破壊株においてもDNA複製関連因子やSCF、DDKの核内ドットは形成可能

であることから、これらの因子のドット形成にAms2は必要ないといえます。

それぞれの因子は数個のドットを形成しますが、そのすべてのドットが近傍に存在しているかどうかは、今回の顕微鏡観察では結論することができませんでした。今後は、さらに解像度の高い顕



微鏡観察を行う予定です。また興味深い結果として、DNaseI処理後もこれらのドットは分解しないことから、DNA非依存的に存在していると考えられます。さらにAms2やSCFの核内ドットを生化学的アプローチでも確認しましたが、やはりDNaseI処理後も不溶性分画に濃縮してくることから、やはりDNA非依存的に核内に存在していることが確認されました。現在、核内にドット形成を裏打ちする「足場」が存在するのではないかと考えています（図参照）。今後は、この「足場」の分子的解明およびその存在意義について調べていきたいと思

図 核内ドット模式図

Ams2、SCF、DNA複製関連因子は核内にドットを形成する（左上部、緑丸）。

複製ファクター（紫網かけ）とヒストン関連ドット（水色網かけ）が非常に近傍に存在すると考えられる。

5. 発表論文、参考文献

Kearsey, S. E., Montgomery, S., Labib, K., and Lindner, K. (2000). Chromatin binding of the fission yeast replication factor mcm4 occurs during anaphase and requires ORC and cdc18. *Embo J* 19, 1681-1690.

Mamnun, Y. M., Katayama, S., and Toda, T. (2006). Fission yeast Mc11 interacts with SCF^{Pof3} and is required for centromere formation. *Biochem Biophys Res Commun* 350, 125-130.

Meeks-Wagner, D., and Hartwell, L. H. (1986). Normal stoichiometry of histone dimer sets is necessary for high fidelity of mitotic chromosome transmission. *Cell* 44, 43-52.

Sadaie, M., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Arisaka, F., Tanaka, K., Shirahige, K., and Nakayama, J. (2008). Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol Cell Biol* 28, 6973-6988.

Takayama, Y., Mamnun, Y. M., Trickey, M., Dhut, S., Masuda, F., Yamano, H., Toda, T., and Saitoh, S. (2010). Hsk1- and SCF^{Pof3}-dependent proteolysis of *S. pombe* Ams2 ensures histone homeostasis and centromere function. *Dev Cell* 18, 385-396.

Takayama, Y., Sato, H., Saitoh, S., Ogiyama, Y., Masuda, F., and Takahashi, K. (2008). Biphasic incorporation of centromeric histone CENP-A in fission yeast. *Mol Biol Cell* 19, 682-690.

Takayama, Y., and Takahashi, K. (2007). Differential regulation of repeated histone genes during the fission yeast cell cycle. *Nucleic Acids Res* 35, 3223-3237.