

# アセチル化酵素複合体によるクロマチン構造抑制機構

## Regulation of Silenced Chromatin by the Acetyltransferase Complex

研究代表者 長田 茂宏 (大阪大学大学院薬学研究科・助手)

Shigehiro OSADA, Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Osaka University, Research Associate.

サイレンシングはプロモーターやDNAの塩基配列に依存しないクロマチン上の比較的広い範囲で起きる遺伝子発現の抑制機構である。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) においては、サイレンシング遺伝子座は接合型の決定に関与する遺伝子座 (*HML $\alpha$* , *HMRa*)、テロメア領域、rDNA リピート領域に存在する。Sas2 (Something About Silencing 2) タンパク質はサイレンシングに関与するヒストンアセチル化酵素複合体 (SAS 複合体) の活性サブユニットとして機能する。我々は Sas2p がクロマチン形成因子 *ASF1* (anti-silencing function 1) に依存して *HML $\alpha$*  領域に作用するが、*SIR1*, *SIR2* には依存しないことを示した。また、Sir2p の局在は *SAS2* により制御を受けることを示した。これらのことから、SAS 複合体の局在が Sir2p の局在を基底し、*HML $\alpha$*  サイレncing に関与する可能性を示した。

### Abstract

Silencing affects gene repression in a regional rather than promoter- or sequence-specific manner. In *Saccharomyces cerevisiae*, silenced loci include the *HML $\alpha$*  and *HMRa* mating-type loci, the telomere regions, and the ribosomal DNA repeats. Sas2p is a catalytic subunit of the SAS histone acetyltransferase complex. We revealed that the SAS complex was associated with the *HML $\alpha$*  locus, and *ASF1*, which encodes chromatin assembly factor Asf1p, but not *SIR1* and *SIR2*, was necessary for this localization. We also found that Sir2p association with *HML $\alpha$*  was partially dependent on *SAS2*. These data suggest that *ASF1*-dependent localization of the SAS complex may function in Sir2p association and be required for the *SIR1*-dependent *HML $\alpha$*  silencing.

### 1. 研究目的

真核生物の核内 DNA はヒストン八量体に巻き付いたヌクレオソームを基本単位としたクロマチンに存在する。生物が正常な生命活動を営むためには、遺伝子は適切な時期に適切な量発現する以外は正常に抑制されている必要がある。近年、エピジェネティクス (DNA の塩

基配列の変化を必要とせずに、細胞分裂を通じて次世代に伝えることができる遺伝子機能制御機構) による遺伝子発現制御機構の解明がすすめられている。エピジェネティクス制御のひとつとして、ヒストン修飾による制御が挙げられる。ヒストンの N 末端領域はリジン残基などを多く含み塩基性に富んでおり、アセ

チル化やメチル化などの様々な化学修飾を受ける。そして、その修飾の組合せにより、活性/不活性クロマチンなどの変換が起き、遺伝子機能が制御されている。一般にヒストンのアセチル化は遺伝子発現が活発に起きている活性クロマチンに参与し、脱アセチル化は不活性クロマチン形成に参与する。出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) の Sas2p はヒストンアセチル化酵素複合体 (SAS 複合体) の活性サブユニットとして機能する。出芽酵母には3種類のサイレンシング遺伝子座 (接合型の決定に参与する遺伝子座 (*HMLα*, *HMRa*), テロメア領域、rDNA リピート領域) が存在する。興味深いことに、*SAS2* 破壊によるこれらのサイレンシング遺伝子座に与える影響は異なる。即ち、*HMLα* 以外の遺伝子座に対しては、*SAS2* 破壊はサイレンシング作用を増強する。一方、*HMLα* の遺伝子に対しては、弱いながら遺伝子発現を活性化する。また、*SIR1* 破壊と組み合わせることにより、この活性化は増強される。つまり、Sas2p は *HMLα* に対しては遺伝子発現の抑制に働く。そこで、本課題においてはヒストンアセチル化酵素によるサイレンシング機構を解明するために *HMLα* サイレncingにおける Sas2p の役割の解明を試みた。

## 2. 研究経過

### 2.1 SAS 複合体局在に対する *ASF1* 破壊の影響

我々はこれまでに SAS 複合体はクロマチン形成因子 Asf1p と相互作用すること明らかにしている。また、*SAS2*, *ASF1* とともに *SIR1* 遺伝子破壊と組み合わせることにより、*HMLα* サイレncingが消

失するが、*asf1Δsas2Δ* 二重破壊株はそれぞれの遺伝子の単独破壊株とサイレンシング活性がほぼ同じであることから、これらの遺伝子は遺伝学的にも相互作用することを示している。また、SAS 複合体は *HMLα* 領域に存在する  $\alpha 1, \alpha 2$  遺伝子のプロモーター領域に局在することも明らかにしてきた。そこで Sas2p の局在に対する *ASF1* 破壊の影響をクロマチン免疫沈降法により解析した (図 1)。

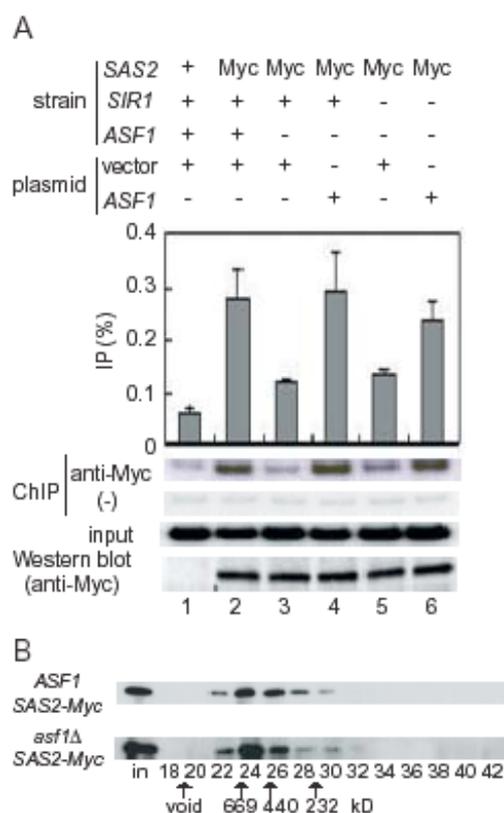


図 1. *ASF1* 破壊の Sas2p 局在に与える影響 (A) クロマチン免疫沈降法による Sas2p の局在の検討。用いた細胞株およびプラスミドをグラフ上に示した。免疫沈降物を鋳型にして、 $^{32}\text{P}$ -dCTP 存在下で PCR を行った。PCR 産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、ゲルを乾燥後オートラジオグラフィによりバンドを検出した。そして、そのバンドの放射活性を測定し、免疫沈降の割合をグラフに示した。これら

の細胞におけるSas2p-Mycの発現量をウエスタンブロット解析により調べた。(B) *ASF1* 破壊によるSAS複合体分子量に与える影響。図に示した細胞株から全細胞抽出液を調製し、ゲルろ過クロマトグラフィーにより分画した。各フラクションをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、抗Myc抗体によるウエスタンブロット解析を行った。

その結果、*ASF1* 破壊により、Sas2p 局在は減少した。この減少は *Asf1p* 発現プラスミド添加により回復したことから、Sas2p の局在は *ASF1* に依存することが示された。この現象は *SIR1* 破壊株においても同様に観察されたことから、Sas2p 局在は *SIR1* には依存しないと考えられた。また、*ASF1* 破壊は Sas2p の発現量、SAS 複合体のサイズに影響を与えないことも示した。

## 2.2 SAS 複合体局在領域

サイレンシング活性に必須である *Sir2p* は前述のすべてのサイレンシング遺伝子座に局在することが報告されている。これまでは、*HMLα*領域の $\alpha1$ ,  $\alpha2$  遺伝子のプロモーター領域における Sas2p 局在を解析してきた。そこで次に *HMLα*近傍領域における局在を検討した(図2)。その結果、Sas2p は *HMLα* 領域を含む、テロメアから少なくとも10から20 kbの広い範囲に局在することが示された。そして、この局在も *ASF1* に依存した。一方 *Sir2p* は *HMLα*領域を含む、テロメアから16.7 kbに存在する *CHA1* まで局在し(結果省略)、Sas2p と局在領域が異なることが明らかとなった。

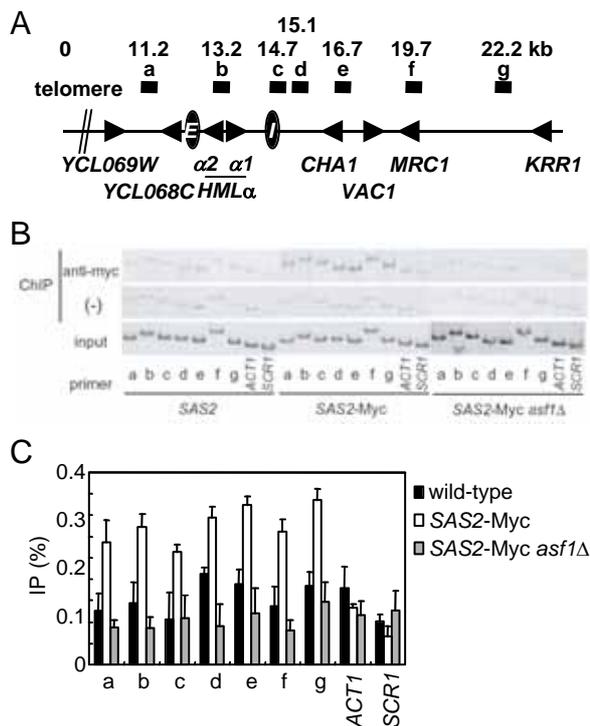


図2. *HMLα*近傍領域におけるSAS複合体の局在。(A)に示した位置のプライマーを用いてSas2p-Mycの局在を調べた(B)。その結果を図1と同様の方法でグラフ化した(C)。

## 2.3 SAS2破壊のSir2p局在に与える影響

*SAS2*破壊の*HMLα*サイレンシングに与える影響を調べる目的で、サイレンシング活性に重要な*Sir2p*局在について検討した。これまでの報告と同様に*Sir2p*は*HMLα*領域に局在することが示された。興味深いことにこの局在は*SAS2*破壊により減少し、*SIR1*破壊と組み合わせることによりさらに減少した。一方、テロメア近傍領域の*Sir2p*は*SAS2*破壊により増加していることが示された。また、*Sir2p*発現量は*SAS2*もしくは*SIR1*破壊の影響を受けないことも示した。

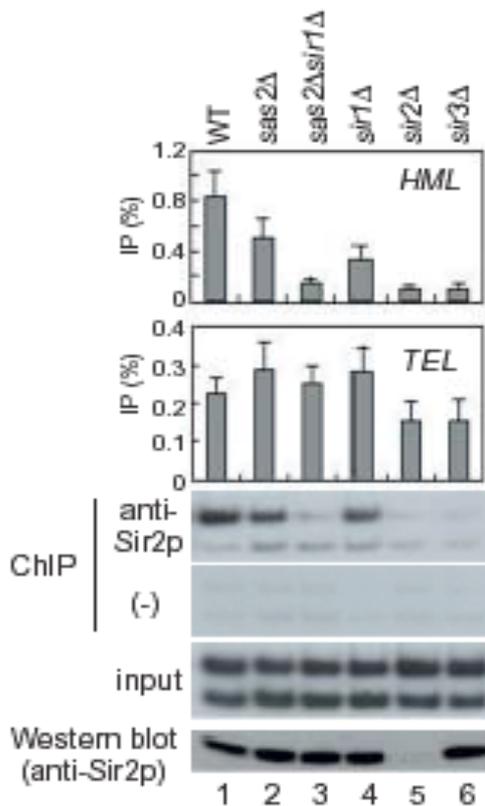


図3. SAS2破壊のSir2p局在に与える影響. 用いた細胞株をグラフ上に示した. 抗Sir2p抗体のクロマチン免疫沈降物を鑄型にし、HML $\alpha$ およびテロメア近傍領域のSir2p局在を解析し、図1と同様に示した。HMLはHML $\alpha$ 領域、TELは第6番染色体の末端から約7.5 kbの局在を示す。Sir2pの発現量をウエスタンブロット解析により調べた。

### 3. 研究成果

SAS複合体はHML $\alpha$ およびその近傍領域にASF1依存的に局在することが明らかとなった。また、HML $\alpha$ におけるSir2p局在はSAS2破壊により減少し、テロメア近傍領域の局在は増加した。このことから、SAS2破壊によりテロメア近

傍のSir2p局在が増加し、Sir2p発現量は変化しないことから、HML $\alpha$ におけるSir2p局在が減少したと考えられる。この現象はSIR1破壊により増強されることから、SAS2破壊によるHML $\alpha$ サイレンシングの消失は限られた量のSir2p局在の減少によると考えられた。

### 4. 今後の研究課題と発展

Asf1pは活性/不活性クロマチンともに局在するクロマチン形成因子と考えられているが、SAS複合体は不活性クロマチンのみ局在する。また、HML $\alpha$ 近傍領域のSas2p局在が示されたが、Sas2p局在特異性を示す機構は明らかでない。ひとつの可能性として、活性クロマチンに存在するAsf1pに相互作用する因子がSas2p局在を妨ぐ機構が考えられる。今後、Asf1pに相互作用する因子を解析することにより、さらに詳細なサイレンシング活性の分子機構が明らかになると考えられる。

### 5. 発表論文リスト

酵母の活性・不活性化クロマチンドメイン  
長田茂宏  
*エビジェネティクス*、(佐々木裕之編) pp. 61-70. シュプリンガー・フェアラーク東京、2004年

Chromatin assembly factor Asf1p-dependent occupancy of the SAS histone acetyltransferase complex at the silent mating-type locus HML $\alpha$ .  
Osada, S., Kurita, M., Nishikawa, J., and Nishihara, T.  
*Nucl. Acids Res.*, 2005 (印刷中)