

# 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 大阪大学 大学院薬学研究科 助手 長田 茂宏  
Graduate School of Pharmaceutical Sciences,  
Osaka University, Research Associate, Shigehiro OSADA

真核生物の遺伝子は細胞の核の DNA に存在する。DNA 分子は非常に長く、核内ではヒストンタンパク質に巻き付いて、クロマチンと呼ばれる凝縮した構造をしている。生物が正常に生きていくためには、クロマチンが弛緩し、遺伝情報の担い手である遺伝子が正常に発現する必要がある。遺伝子は必要な時期に、必要な場所でのみ発現する以外は、ほとんどの遺伝子はクロマチン内で抑制されている。近年、ヒストン修飾が遺伝子発現制御に重要であることが明らかにされている。そこで、ヒストン修飾酵素によるクロマチン構造変換を解析した。その結果、クロマチン形成因子が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の局在を基底し、遺伝子発現が抑制されることが明らかとなった。

### Abstract

Eukaryotic DNA is packaged into a nucleoprotein structure known as chromatin, consisting of DNA and histones. This structure is able to regulate access of the cellular factors, which are important for transcription, replication, repair, and recombination, to DNA. Many multiprotein complexes can modify chromatin. One of the most studied of these complexes is the histone modifying complexes, which posttranslationally modify histones. In this study, we showed that the histone acetyltransferase activity of the SAS complex is required for the gene silencing. Furthermore, we revealed that recruitment of the SAS complex to the silent loci was important to form the repressive chromatin.

### 1. 研究目的

生命活動は正常な遺伝子発現により制御されており、その異常は癌などの疾患、細胞・個体の異常・死を引き起こす。遺伝子発現の多くは転写の段階で制御されており、多くの転写調節因子が解析されてきた。真核生物の DNA は核においてヌクレオソーム(ヒストンに DNA が巻付いた構造)を基本としたクロマチン構造をとり、その内部の遺伝子は通常抑制状態にある。転写反応が起こるためには、この高次構造体が(部分的に)破壊され、DNA がほどけた状態になる

ことが必要である。このようなクロマチン上で起きる反応の制御にはヒストンの修飾が重要であり、なかでもヒストンのアミノ末端領域をアセチル化するヒストンアセチル化酵素(histone acetyltransferase, HAT)の転写制御における役割が注目されている。HAT の多くは酵母からヒトに至るまで保存されている因子が多い。

MYST (MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2, and TIP60) acetyltransferase ファミリーに属する因子は様々な生命現象に関与するとして注目されている。多くの HAT は複合体として機能し、活性制

御にサブユニットが必要不可欠であることも明らかにされつつある。MYST ファミリーのひとつである酵母 Something about silencing 2 (SAS2) はクロマチン構造を介したサイレンシングに重要な因子として、遺伝学的手法により単離された。サイレンシングとは遺伝子の種類に関係なく、ゲノム上の位置に依存したゲノム DNA の広範囲に及ぶ転写の抑制状態である。これまでの解析により、Sas2 は Sas4, Sas5 とともに SAS 複合体を形成し、Sas2 のアセチル化酵素活性が接合に必要なことを明らかにしている。本研究においては、Sas2 の標的遺伝子を明らかにし、Sas2 の酵素活性がクロマチン構造に与える影響を解析した。また、SAS 複合体が局在するためにはクロマチン形成因子が必要であることを明らかにした。

## 2. 研究経過

### 2.1 HML 座に存在する遺伝子 2 の発現

*sas2* 単独破壊株もしくは *sir1* 単独破壊株は接合活性を示すが、*sas2sir1* 遺伝子二重破壊株は接合活性を示さない。野生株においてサイレンシングにより発現が抑えられている HML 座に存在する 2 遺伝子の産物は接合に重要な遺伝子の発現を制御している。そして、HML サイレncing 活性と接合活性の相関性は高い。そこで、2 発現をノザンプロット解析により調べた (Fig. 1A)。*sas2sir1* 遺伝子二重破壊株において、接合活性を示さない *sir4* 破壊株と同様の 2 発現が観察された。*sas2*, *sir1* 遺伝子それぞれの単独破壊株は二重破壊株ほどではないが、若干の発現が測定された。このことから、

2 発現は接合活性と完全に一致することが明らかとなった。

次に、このサイレンシングに Sas2 の HAT 活性が必要であるかについて検討した (Fig. 1B)。*sas2sir1* 二重破壊株に野生型 Sas2 を発現させたところ、2 発現が再び抑制された。次に HAT

活性を欠いた M1 変異型の Sas2 を *sas2sir1* 二重破壊株に発現させたが、2 発現は抑制されなかった。このことは Sas2 の HAT 活性がサイレンシングに必要であることを示唆している。また、この結果も接合活性と完全に一致することが明らかとなった。

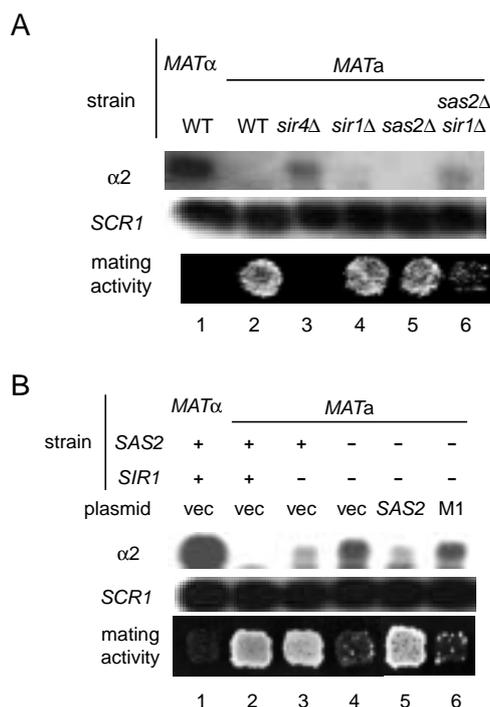


Fig. 1. Derepression of  $\alpha 2$  expression and non-mating phenotype in *sas2* deletion strain in combination with null allele of *SIR1*. (A) RNA was hybridized by Northern blotting to probes specific for either the  $\alpha 2$  or *SCR1* genes. Qualitative mating assay was performed by patches, which were replica plated to a lawn of  $\alpha$  cells. (B) A *sas2sir1* double deletion strain was transformed with a plasmid carrying the wild-type or the mutant form of the *SAS2* gene under the control of its own promoter.

## 2.2 標的遺伝子のクロマチン構造の変化

2 遺伝子発現を調べた細胞株から核を単離し、MNase 処理後に調製した DNA を鋳型として、特異的なプライマーを用いたプライマー伸長法により、2 遺伝子のクロマチン構造を解析した。これまでに報告されているように、*sir4* 破壊により、2 遺伝子の転写開始点を含むヌクレオソームのヒストンが不安定になり、クロマチンの弛緩が観察された。*sas2sir1* 遺伝子二重破壊株において、*sir4* 破壊株と同様のクロマチン構造の部分的な弛緩が同程度に観察された。この結果は、2 発現および接合活性と完全に一致していた。これらの結果から、*sas2sir1* 遺伝子の破壊による接合活性の消失は、2 遺伝子領域のクロマチン構造弛緩により誘導された 2 遺伝子の発現によると考えられた。

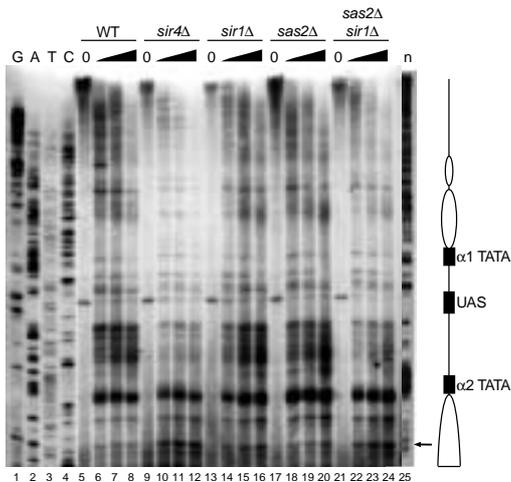
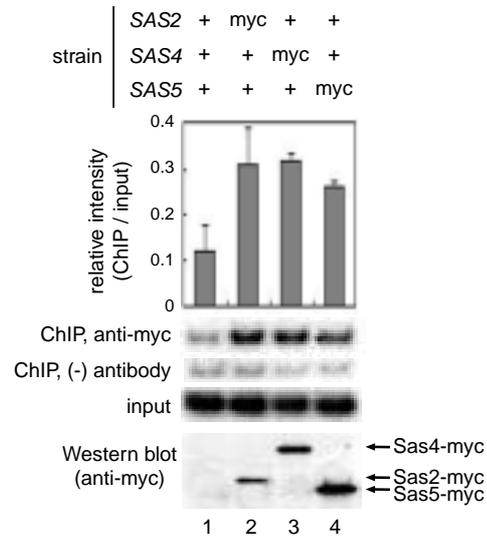


Fig. 2. High resolution MNase mapping of the  $\alpha 2$  gene.

## 2.3 SAS 複合体の標的遺伝子座への局在

*Sas2* の 2 遺伝子の発現抑制機構のひとつとして、SAS 複合体の標的遺伝子領域の局在が考えられる。そこで、クロマチン免疫沈降法により、*in vivo*における SAS 複合体の HML 座の局在について検討した。野生株と Myc エピトープタグが付加した *Sas2* を発現する細胞株から、クロマチン分画を調製し、DNA を超音波により

## A



## B

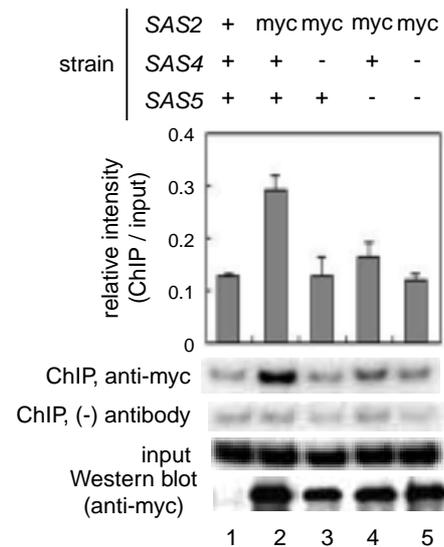


Fig. 3. The SAS complex occupancy at the promoter of the  $\alpha 2$  gene. (A) Recruitment of subunits of the SAS complex to the promoter of the  $\alpha 2$  gene is detected by the ChIP assay. (B) *SAS4* and/or *SAS5* are required for the recruitment *Sas2* to the promoter of the  $\alpha 2$  gene.

切断後、抗 Myc 抗体による免疫沈降を行った。沈降物から精製した DNA を鋳型として、2 遺伝子のプロモーター領域を PCR により増幅した。

その結果、野生株に比べて、Sas2-Myc を発現する細胞株の方が、約 3 倍 DNA が増幅され、Sas2 が *HML* 座に局在することが明らかとなった (Fig. 3A)。同様の方法により、Sas4、Sas5 Myc エピトープタグを発現する細胞を用いて、局在を検討した。これらの因子の発現量は異なったが、すべての Sas タンパク質が *HML* 座に局在することが示された。これらの結果から、SAS 複合体が *HML* 座に局在する可能性が示唆された。そこで、*sas4*、*sas5* 単独もしくは二重破壊株における Sas2 の局在を検討した (Fig. 3B)。その結果、これらの遺伝子の破壊により、Sas2 の発現量に変化はなかったが、Sas2 の局在が失われた。このことは Sas2 が SAS 複合体として *HML* 座に局在することを意味している。

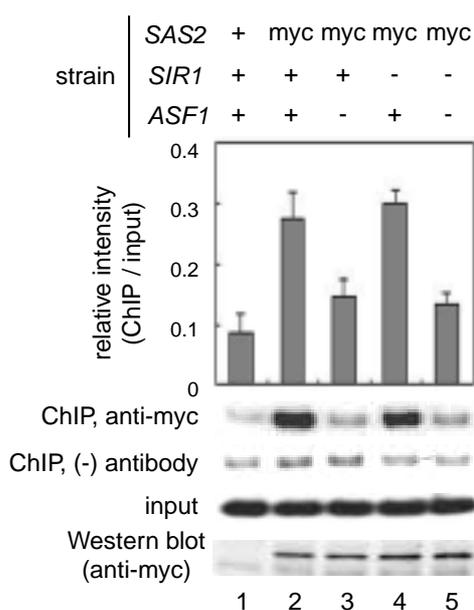


Figure 4. Sas2 occupancy at the promoter of the  $\alpha 2$  gene is dependent on chromatin assembly factor *ASF1*.

次に、SAS 複合体の *HML* 座における局在に影響を与える因子について検討した。サイレンシングに重要である因子 *SIR1* もしくは *SIR2* 遺伝

子の破壊は、SAS 複合体の局在に影響を与えなかった (結果省略)。これまでに我々はクロマチン形成因子である *Asf1* が SAS 複合体と相互作用し、*ASF1* は SAS 遺伝子と同様の経路でサイレンシングに関与することを明らかにしている。そこで、SAS 複合体の局在に対する *asf1* 破壊の影響を検討した (Fig. 4)。その結果、*asf1* 破壊により、SAS 複合体の *HML* 座への局在は失われた。この現象は *SIR1* に依存していなかった。

### 3. 研究成果

Sas2 の HAT 活性は *HML* 座の抑制クロマチン構造に重要であることを明らかにした。また、この抑制構造には、クロマチン形成因子 *Asf1* を介した SAS 複合体の *HML* 座への局在が必要であることも明らかとなった。

### 4. 今後の課題と発展

本研究は下等真核生物である酵母をモデル生物として用いている。クロマチン構造は、下等から高等真核生物において保存されており、遺伝子発現制御において重要である。酵母 Sas2 の HAT 活性および SAS 複合体局在の抑制クロマチン形成における重要性は高等真核生物の遺伝子発現抑制機構解明に役立つと考えられる。現在、Sas2 の哺乳類に対応する因子の解析を進めている。

### 5. 発表論文リスト

Chromatin assembly factor dependent recruitment of the SAS histone acetyltransferase complex is required for silencing at mating type locus *HML* $\alpha$ . (投稿準備中)