

氏 名 Rahayu, Anisa Fitri

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 2462 号

学位授与の日付 2023 年 9 月 28 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 Characterization of the role of Chp2/HP1 in
heterochromatin assembly in fission yeast

論文審査委員 主 査 青木 一洋
基礎生物学コース 教授
中山 潤一
基礎生物学コース 教授
坪内 知美
基礎生物学コース 准教授
田上 英明
名古屋市立大学 大学院理学研究科 准教授

Summary of Doctoral Thesis

Name in Full : Rahayu, Anisa Fitri

Title : Characterization of the role of Chp2/HP1 in heterochromatin assembly in fission yeast

(分裂酵母のヘテロクロマチン形成における Chp2/HP1 の役割の解明)

Heterochromatin protein 1 (HP1) is an evolutionarily conserved chromosomal protein that maintains a transcriptionally inert chromatin structure. HP1 family proteins share a basic structure consisting of an N-terminal disordered region, a chromodomain (CD), a disordered middle region called the hinge, and a C-terminal chromo shadow domain (CSD). The CD recognizes histone H3 lysine 9 methylation (H3K9me), a hallmark of heterochromatin, to target heterochromatic loci, while the CSD forms a dimer to provide an interacting surface for other chromosomal proteins. In some HP1 homologs, the CSD is important for heterochromatin targeting or nucleosome binding. HP1 proteins are therefore often referred to as crosslinker or adaptor proteins.

The fission yeast *S. pombe* is an excellent model organism to study the molecular mechanisms underlying heterochromatin assembly because, like higher eukaryotes, its heterochromatin is marked by di- or tri-methylation of histone H3K9 (H3K9me_{2/3}) and it expresses two HP1 proteins, Swi6, and Chp2. While Swi6 is abundantly expressed and plays a dosage-dependent role in heterochromatin formation, Chp2 is expressed at low levels but plays a distinct role in the heterochromatin assembly. Chp2 recognizes H3K9me via the CD and recruits the Snf2/HDAC repressor complex (SHREC) via the CSD. Among the SHREC components, Chp2 interacts with the chromatin remodeler module protein, Mit1, and this interaction is thought to mediate the recruitment of the entire SHREC. Chp2 also plays a critical role in maintaining the subnuclear localization of the mating-type region. In addition, Chp2, but not Swi6, is tightly associated with a chromatin-enriched nuclear fraction independently of Clr4, which is thought to be related to their distinct roles. However, how the distinct function of Chp2 contributes to the formation of a fully repressed chromatin state remains incompletely understood. To gain insight into the distinct function of HP1 proteins, I focused on *S. pombe* Chp2 and investigated its biochemical properties, in particular its DNA binding ability, and tried to identify Chp2-specific interacting partners by affinity purification.

To characterize the interaction between Chp2 and Mit1, I performed yeast two-

hybrid assay and found that the N-terminus of Mit1 is critical for the interaction with Chp2. This conclusion is also supported by a structural study by another group that identified a CkIvV motif (residues 9-13) at the N-terminus of Mit1 that interacts with the dimerized Chp2-CSD and also showed that the Mit1 I11R mutation (Mit1^{I11R}) disrupts the interaction with Chp2. Using this knowledge, next, I generated *S. pombe* cells expressing Mit1^{I11R} and examined the chromatin association of Chp2 by chromatin fractionation assay. Interestingly, I found that Chp2 in the chromatin-enriched fraction was not affected by *clr4*Δ or *mit1^{I11R}* mutation, suggesting that Chp2 is tightly associated with a chromatin-enriched fraction independent of Clr4 and Mit1, and uses a different mechanism(s) for this association.

HP1 proteins bind to DNA or RNA via the hinge region, and this activity is thought to be involved in their stable chromatin binding. While a similar activity has been demonstrated for Swi6, it has not been clear whether Chp2 has DNA-binding ability and, if so, which domain contributes to the binding. To investigate the relationship between the tight chromatin association of Chp2 and its DNA-binding ability, I prepared recombinant proteins for each Chp2 and Swi6 domain and performed electrophoretic mobility shift assays (EMSAs). I found that Swi6 binds DNA primarily with its hinge, whereas the hinge and CSD of Chp2 exhibit robust DNA-binding activities. Since DNA-binding activity associated with the CSD has not been so described in other HP1 proteins so far, this activity involving the Chp2-CSD may contribute to Chp2-specific function. To further characterize the DNA-binding activities of Chp2, I introduced amino acid substitutions and found that a cluster of basic amino acid residues KRRRSR (residues 271-276) in the hinge and QKK (residues 320-322) at the N-terminus of the CSD cooperatively contribute to the DNA-binding activities of Chp2.

To investigate the importance of DNA binding in Chp2 *in vivo*, I generated *S. pombe* strains expressing mutant Chp2 defective in DNA binding and examined their effect by monitoring the silencing state of a marker gene inserted into a heterochromatic region in the mating type locus. Interestingly, I found that cells expressing mutant Chp2 containing combined mutations of the hinge and the mutations in the N-terminus of CSD showed a silencing defect, suggesting that the DNA-binding activities of the hinge and the N-terminus of CSD are important for the silencing at heterochromatic regions, and that these activities cooperate to maintain the silencing function of Chp2 *in vivo*. To further investigate the effect of the DNA-binding activities of Chp2 on its localization to heterochromatic regions, I performed chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays

and found that Chp2 mutants lacking DNA-binding activities exhibited reduced association at heterochromatic regions, suggesting that the DNA-binding activities of Chp2 are required for its stable association with heterochromatic regions.

Next, I tested whether the DNA-binding activities of Chp2 were involved in its tight chromatin association. Interestingly, I found that mutants Chp2, which lack DNA-binding activities, were still tightly associated with the chromatin-enriched fraction, suggesting that Chp2 uses multiple modes in addition to the H3K9me2/3 recognition, DNA-binding activities, and the interaction with Mit1 to maintain stable association with chromatin. While Mit1 has been identified as a Chp2 interacting partner, it is possible that other interacting partner(s) mediate the Chp2-chromatin association. To identify novel interacting partner(s) of Chp2, I generated *S. pombe* strains expressing Chp2 with a tandem affinity purification (TAP) tag and performed affinity purification. Mass spectrometry analysis identified a number of novel Chp2 binding partners, including importin/karyopherin family proteins, RNA polymerase II components, factors involved in DNA replication/repair, and the H3K9 methyltransferase Clr4. This mass spectrometry analysis also identified potential phosphorylation sites on Chp2.

Although the physical interaction between HP1 proteins and H3K9 methyltransferases has been identified in other organisms, it remains unclear whether Chp2 or Swi6 interacts directly with Clr4. Since Clr4 has been identified as one of the Chp2 binding partners, I decided to comprehensively investigate the relationship between Chp2 and Clr4. I performed yeast two-hybrid assay and found that although Chp2 only weakly interacts with Clr4, it robustly interacts with either the N-terminus or C-terminus of Clr4, suggesting that intra- or intermolecular interaction of Clr4 itself may be related to the interaction with Chp2. Interestingly, ChIP experiments revealed that the levels of H3K9me2 at heterochromatic regions are reduced in cells expressing mutant Chp2 defective in the DNA binding, suggesting that the physical interaction between Chp2 and Clr4 contributes to the read-and-write mechanisms underlying heterochromatin assembly.

Taken together, these results suggest that the cooperative DNA-binding activities of Chp2 are critical for its function in heterochromatin assembly. Furthermore, this study reveals the novel interacting partners of Chp2 and the functional link between Chp2 and Clr4. Thus, these results have important implications for the distinct function of HP1 proteins and the molecular mechanisms underlying higher-order chromatin assembly.

博士論文審査結果

^{Name in Full}
氏名 Rahayu, Anisa Fitri

^{Title}
論文題目 Characterization of the role of Chp2/HP1 in heterochromatin assembly in fission yeast

真核生物の染色体に存在するヘテロクロマチンは、染色体の機能やエピジェネティックな遺伝子発現制御に必須な構造である。ヘテロクロマチンにはヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9me) が存在し、進化的に保存された Heterochromatin protein 1 (HP1) がこの修飾を認識して結合することで、高次のクロマチンが形成されている。HP1 は、N 末端にクロモドメイン (CD)、C 末端にクロモシャドウドメイン (CSD) を持ち、これらが二次構造を持たないヒンジ領域によって連結されている。また多くの真核生物は、複数の HP1 アイソフォームを発現しており、それらの協調的な役割が示唆されている。分裂酵母 *Schizosaccharomyces pombe* は、高等真核生物と同様に、ヘテロクロマチンに H3K9me が存在し、2 種類の HP1 アイソフォーム、Swi6 と Chp2 を発現していることから、ヘテロクロマチン形成の分子機構や、HP1 の機能を理解する上で優れたモデル生物である。Swi6 は発現量が高く、量依存的な役割を果たすのに対して、Chp2 は発現量が低く Swi6 とは異なる役割を果たしていると考えられている。またこれまでの研究から、Chp2 が CSD を介してクロマチンリモデリング因子 Mit1 と結合し、Mit1 を含む Snf2/HDAC リプレッサー複合体 (SHREC) をリクルートすること、また Chp2 は Swi6 とは異なり、H3K9me 非依存的にクロマチンに結合することが明らかにされている。しかし、Chp2 のどのような性質が、Chp2 特異的な機能に寄与しているのか不明であった。

そこで出願者は、分裂酵母の Chp2 に注目し、その生化学的性質、特に DNA 結合能と Chp2 の機能との関係、また Chp2 特異的な相互作用因子の単離同定を試みた。まず、Chp2 が Mit1 のどの領域と相互作用しているか明らかにするために、酵母ツーハイブリッドアッセイを行い、Chp2 が Mit1 の N 末端領域と相互作用することを明らかにした。一方、Chp2 と Mit1 の構造学的解析をした別のグループによって、Chp2 が二量体化した CSD を介して Mit1 の N 末端 (C9-V13) と結合すること、また Mit1 の I11 の変異 (I11R) によって、Chp2 との相互作用が消失することが明らかにされた。この知見に基づいて、変異 Mit1 (Mit1^{I11R}) を発現する分裂酵母株を作製し、クロマチン分画法によって Chp2 のクロマチン結合を調べた結果、Chp2 は H3K9me を消失した *clr4Δ* 株と同様に、*mit1^{I11R}* 株においてもクロマチンに強固に結合したままであることを見出した。これらの結果から、Chp2 は H3K9me の認識、Mit1 との結合とは独立した機構でクロマチンに結合していることが示唆された。

HP1 はヒンジ領域を介して DNA や RNA と結合し、この活性が HP1 の安定なクロマチン結合に寄与していると考えられている。そこで出願者は、Chp2 の DNA 結合能と Chp2 特異的な機能との関連に着目した。Chp2 と Swi6 について、それぞれの全長と各ドメイン

のリコンビナントタンパク質を調製し、ゲルシフトアッセイ (EMSA) によって DNA 結合能の有無を調べた。その結果、Swi6 は主にヒンジ領域を介して DNA と結合するのに対し、Chp2 はヒンジに加えて CSD も強い DNA 結合活性を示すことがわかった。CSD を介した DNA 結合は、これまで他の HP1 タンパク質では報告されておらず、Chp2 の CSD が関与するこの活性は、Chp2 特異的な機能に寄与している可能性がある。Chp2 の DNA 結合活性の特徴をさらに明らかにするために、DNA 結合に関与する候補のアミノ酸残基に変異を導入して解析したところ、ヒンジ内に存在する塩基性アミノ酸残基のクラスター (KRRRSR、271-276 残基) と CSD の N 末端 (QKK、320-322 残基) が協調的に Chp2 の DNA 結合活性に寄与していることが分かった。Chp2 の持つ DNA 結合活性の細胞内での重要性を調べるため、DNA 結合活性を欠失した変異型 Chp2 を発現する分裂酵母株を作製し、ヘテロクロマチンに挿入したマーカー遺伝子のサイレンシングアッセイによってその影響を調べた。その結果、ヒンジと CSD の変異を組み合わせた変異 Chp2 を発現させた細胞では、サイレンシングの異常が観察された。また、クロマチン免疫沈降法によって Chp2 の局在を調べたところ、DNA 結合活性を欠損した変異型 Chp2 では、ヘテロクロマチン領域への結合が減少することがわかった。以上の結果より、Chp2 のヒンジと CSD の N 末端による DNA 結合活性は、Chp2 の安定的なヘテロクロマチン局在に協調的に関与し、Chp2 のサイレンシング機能に重要であることが明らかになった。

さらに出願者は、Chp2 の DNA 結合活性が Chp2 自身の強固なクロマチン結合に関与しているかどうかを調べた。興味深いことに、DNA 結合活性を失った変異型 Chp2 でもクロマチンと強固に結合していることが分かった。この結果は、Chp2 のクロマチン結合には、H3K9me の認識、DNA 結合活性、Mit1 との相互作用だけではなく、他の分子機構が関与することを示唆している。そこで出願者は、Chp2 の過剰発現株を構築し、アフィニティー精製によって、Mit1 以外の相互作用因子の同定を試みた。精製標品を質量分析した結果、インポーチン/カリオフィリンファミリータンパク質、RNA ポリメラーゼ II 構成因子、DNA 複製に関与する因子、H3K9 メチル基転移酵素 Clr4 など、多数の新規 Chp2 相互作用因子が同定され、さらに Chp2 の潜在的なリン酸化部位が明らかになった。出願者はさらに、Chp2 の相互作用因子として新たに同定された Clr4 に着目し、酵母ツーハイブリッドアッセイによって相互作用に関わるドメインの探索を行った。その結果、Chp2 は全長の Clr4 に対しては弱い相互作用しか示さないものの、Clr4 の N 末端あるいは C 末端のいずれかと強固に相互作用することが分かった。これらの結果は、Clr4 自身の分子内あるいは分子間相互作用が、Chp2 との相互作用に関係している可能性を示唆している。DNA 結合が欠損した変異型 Chp2 を発現させた細胞では、ヘテロクロマチン領域における H3K9me のレベルが減少していることから、Chp2 と Clr4 の物理的相互作用が、ヘテロクロマチン領域の H3K9me を維持する機構に寄与していることを示唆している。

以上の出願者の研究は、Chp2 の協調的な DNA 結合活性が、ヘテロクロマチン形成における Chp2 の機能に重要であることを見出したものである。さらに本研究は、Chp2 の新たな相互作用因子を明らかにし、Chp2 と Clr4 の機能的つながりを明らかにした。したがって、これらの結果は、HP1 アイソフォームの異なる機能と、高次クロマチン形成の基盤となる分子メカニズムの理解に重要な示唆を与えるものである。以上を鑑み、出願者の本研究は、博士の学位を授与するに相応しいと審査委員会は評価した。