

「エピジェネティクスの制御と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書
－平25年度終了研究課題－

研究総括 向井 常博

1. 研究領域の概要

本研究領域は、エピジェネティクスの制御と生命機能の解明という視点をもった研究を対象とします。より詳しくは、エピジェネティクスの制御機構の解明、様々な生命現象とエピジェネティクスの関わり、エピジェネティクスの多様性や異常がかかわる疾患の解析を対象とします。それらの研究を通してエピジェネティクスの生命機能としての分子基盤を明らかにする事で、細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出を目指します。

具体的な研究内容としては、1)動植物を問わずさまざまなモデル生物を用いてエピジェネティクスの制御機構をいろいろな角度から追求し、明らかにする、2)エピジェネティクスの個体差・多様性を探るとともに、エピジェネティクスの異常にもとづく疾患の解析を行なう、3)エピジェネティクスの解析や制御に資する技術の開発を行う、といった課題が考えられます。

2. 事後評価対象の研究課題・研究者名

件数：9件

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 事前評価の選考方針

選考の基本的な考えは下記の通り。

- 1) 選考は、「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域に設けた選考委員10名の協力を得て、研究総括が行う。
- 2) 選考方法は、書類選考、面接選考及び総合選考とする。
- 3) 選考に当たっては、さがけ共通の選考基準(URL: <http://www.jst.go.jp/pr/info/info666/shiryou4.html>)の他、以下の点を重視した。

研究課題の実績はあまりないが、チャレンジながら期待し、採択した課題

- ①「エピジェネティクス制御の多様性進化」、
- ②「哺乳類細部を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」。

4) 事前評価の選考の経緯

一応募課題につき領域アドバイザー・外部評価者(該当ない場合は削除)10名が書類審査し、書類選考会議において面接選考の対象者を選考した。続いて、面接選考および総合選考により、採用候補課題を選定した。上記選考を経た課題の内、大挑戦型審査会(書類選考会議)へ1課題を推薦した。

選 考	書類選考	面接選考	採択数			
			12件	内 訳	3年型	11件(1件)
対象数	155件	25件			5年型	1件

()内は大挑戦型としての採択数。

備考:

- 1)平成22年度採択課題のうち、以下は今年度事後評価対象としない。

・牧 信安研究者、

研究期間が5年で、今年度終了しないため。今年度は中間評価を実施する(中間評価結果:



・岩田敦研究者

大挑戦型として採択され、期間延長審査の結果、2年間延長することが決まったため。

・斎藤 都暁研究者

最先端・次世代研究開発支援プログラムに採択され、研究を中断したため。

・夏目 やよい研究者、

ライフイベントにより研究を一時中断し、終了年度がずれるため。

4. 研究実施期間

平成22年10月～平成26年3月(3年型) 平成22年10月～平成28年3月(5年型)

5. 領域の活動状況

領域会議: 7回

研究総括(または技術参事)の研究実施場所訪問: 14回

6. 事後評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(研究報告会、領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(事後評価の流れ)

平成25年7月および平成26年2月; 評価会開催

平成26年3月; 研究総括による事後評価

平成26年3月; 被評価者への結果通知

7. 事後評価項目

(1) 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

(2) 得られた研究成果の科学技術への貢献

8. 評価結果

総論

評価対象者は9名である。アドバイザーによる評価結果は、顕著な成果1、目標通りの成果2、満足できるレベル6、成果不十分ならびに努力不十分は0である。その中のいくつかを取り上げる。一つは、染色体の分離に重要な役割を果たすセントロメアの話である。高等動物を用いた系で、ネオセントロメアを誘導する染色体工学技術を世界にさきがけ開発することに成功した。いままで謎に包まれていた染色体のセントロメアの解明が一挙に進むことが期待される(Developmental Cell 2013 ほか)。

最後に最も光っている課題として、研究課題「腸内共生系におけるエピジェネティックな免疫修飾」を取り上げる。この発見は、マウス及びヒト腸内細菌の代謝産物である「酪酸」が、宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで T 細胞の分化誘導が行われ、その結果炎症性腸疾患の発症を防ぐことにつながることを示したことである(Nature 2013)。つまり、「酪酸」という環境因子が、エピゲノム修飾に関する新たなパラダイム形成を引き起こし、ヒト炎症性腸疾患の病態解明、診断マーカーとしての応用、あるいは治療法の開発につながる可能性をもたらした。

1. 飯田哲史 研究者「Immortal DNA 機構解明への挑戦」

評価結果:

損傷の少ないゲノムの維持機構として提唱されている鋳型 DNA 鎖選択型の染色体分配現象について、鋳型鎖選択的にコピー数の増幅が起る出芽酵母の rDNA 領域をモデルとして検討した。その結果、rDNA 増幅染色体は母細胞に特異的に分配されることが分かり、その過程にエピジェネティック機構が働いていることが明らかになった。一般的に、鋳型 DNA 鎖は損傷が蓄積しにくいと信じられている。ところが、DNA 修復に伴う DNA 合成が鋳型 DNA 鎖において極めて高頻度かつ染色体領域特異的に起きていることが分かり、全く新しい現象の発見につながった。

出芽酵母をモデルとした研究において、染色体選択に rDNA 領域がエピジェネティックに関わっていることを

明らかにしたが、今後その機構について明らかにする必要がある。一方、新たに発見された鋳型 DNA 鎖修復は特定領域に起るので、突然変異を予測可能な現象として捉えられるというパラダイムシフトを引き起こす。この現象の生物学的意味や制御機構について理解が進むのを期待する。とりわけ高等生物での解析、分化や疾患の発症につなぐことができれば社会的インパクトは大きい。

2. 磯野 協一 研究者「細胞運命に関わるポリコーム群制御の切り換え機構」

評価結果:

ポリコーム群が細胞核内で形成するポリコームボディー(PcG body)と呼ばれる構造体に着目し、PcG body による遺伝子抑制の普遍性とそれに作用するシグナル制御の解明を試みた。その結果、PcG body 制御モデルが細胞レベルのみならず個体発生レベルでも普遍的に適用されることが分かった。ついでポリコーム群 Phc2 のリン酸化は PcG body 形成には影響しなかったが、リン酸化の遺伝子抑制ならびに DNA 修復機能への関与の可能性を示した。

ポリコーム群による遺伝子発現の抑制機構として、PcG body 制御モデルの普遍性を明らかにした功績は大きい。さらに DNA 損傷に応答した Phc2 リン酸化およびそのリン酸化が抑制的効果を発揮し得るという結果は、遺伝情報維持とエピジェネティック制御の機能的リンクの端緒を開くものであり、今後の分子メカニズムの解明を期待する。その一方、PcG body 形成を制御する分子機構は未解決のままであり、分化やがん化などでの遺伝子発現スイッチングの仕組みを明らかにするためにもその解明は急務である。

3. 菅野 達夫 研究者「RNA シグナルを介した DNA のメチル化の分子機構の解明」

評価結果:

RNA によって引き起こされる DNA メチレーション(RdDM)の分子メカニズムに関して、初期段階の分子機作を明らかにするために遺伝学的手法を用いて解析を進めた。そのために構築した系が有効に働くことは確かめることができたが、突然変異誘起処理により RdDM が起きなくなった変異体の取得、解析までは至らなかった。サブテーマの tasiRNA に関しては、tasiRNA を含む小分子 RNA が TAS 遺伝子領域のメチル化に関与していることを明らかにした。

RdDM の分子メカニズムを解明するための遺伝学のアプローチを行った。当初計画したエタノール誘導系が有効に働かないため、あらたな系の構築に時間を費やし当初の目的のところまで到達できなかった。計画を立てる時点で慎重に検討することが望ましい。今後研究環境の事情が許せば、所期の目的を達成すべく RdDM の開始ステップを含めた RdDM の分子機構の全体像を解明することを期待する。一方 TAS 遺伝子に関しては、TAS 経路と RdDM 経路のクロストークなど興味深い成果を得ることができた。

4. 北野 潤 研究者「エピジェネティクス制御の多様性と進化」

評価結果:

表現型可塑性とエピジェネティクス制御の進化に関しては、表現型可塑性に関わる遺伝子が同定され、当該遺伝子のエピジェネティクスに関しては緒についたところである。種分化とエピジェネティクス制御に関しては、雑種不妊に関して候補遺伝子がヒストン結合能において分化を示すことが明らかになりつつある。

課題のスタートに当たりイトヨの全ゲノム解読初め、複数の課題に関わる原因遺伝子の解明のためにゲノム解析、QTL 解析など精力的に進めた。その結果、多くの候補遺伝子が同定されると共に種分化に関して DNA/クロマチン結合能に関わるものが明らかになりつつあり、生物多様性の進化にエピジェネティクスが重要な役割を果たしている可能性を示唆した。イトヨにおける遺伝子操作法が確立したので、今後近縁種間でのエピジェネティック分化と種分化の関係、さらに表現型可塑性とエピジェネティクス制御の進化に関しても、当初の目的を達成することを期待する。

5. 近藤 豊 研究者「がんの組織多様性に関わるエピジェネティクス可塑性とその制御機構」

評価結果:

膠芽腫から樹立した幹細胞(GSC)の血清による分化誘導は分化⇌脱分化の関係にあり、この過程にポリコーム複合体(PRC2)が関与することを示し、がん細胞の浸潤には PRC2-H3K27me3 が必須であることを明らかにした。ついで、lincRNA の一つが PRC2 のリクルートメントに重要であること、この RNA を抑制することでがん幹細胞の増殖が抑制されることを見出した。さらに、脳腫瘍発症モデルマウスを用いた解析では、エピジェネティ

ック異常が膠芽腫の形成を引き起こすことを示した。

がんの組織多様性に関わるエピジェネティクスの可塑性に関して、様々な角度から PRC2 の関与が重要であることを示した。特に脳腫瘍幹細胞の解析から、がん細胞のエピゲノム制御について lincRNA の関与はじめ新たな知見を見出し多くの成果を得た。このテーマ全体に関しては、今後がんのエピゲノム変化の作用と機構についてその統合的理解に向けた作業仮説が必要であろう。今後 lincRNA の機能の分子機構をさらに明らかにし、将来的にはがん治療につながるような研究に発展させることを期待したい。

6. 西村 泰介 研究者「DNA メチル化の下流で働く作用メカニズムの解明」

評価結果:

DNA メチル化の下流で作用する候補遺伝子 MOM1 の突然変異体に着目して、その抑圧変異体を探索する方法で、DNA メチル化の下流で作用する候補遺伝子群を探索し、同定した。その中の一つ、*smom3* に着目し遺伝子解析を進めた結果、SMOM3 は CG メチル化、あるいは非 CG メチル化の下流で、ヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する因子であることが分かった。*smom3* 遺伝子の構造解析により、リボソーム RNA のアデニンをメチル化する酵素のメチル化活性ドメインに似たドメインを持つことが分かった。植物以外に真核生物でもこのドメインを持つタンパク質が存在することを明らかにした。

DNA メチル化下流で抑制する因子を同定し、その機構を明らかにすることをめざし一定の成果を得ることができたことは評価したい。そのために構造解析、遺伝学的解析、細胞学的解析などはなされたが、機能解析は不十分であり、今後とも生化学的に明らかにすることを期待したい。また、ほかの候補遺伝子の同定も進め、全体像が明らかになることを期待している。

7. 長谷 耕二 研究者「腸内共生系におけるエピジェネティックな免疫修飾」

評価結果:

マウスおよびヒト腸内細菌の代謝産物である酪酸は、*Foxp3* 遺伝子のヒストンアセチル化を促進することで制御性 T 細胞の分化を促すことを明らかにした。さらに実験的大腸炎モデルを用いて、酪酸摂取により制御性 T 細胞が増え、大腸炎の炎症が改善されることを示した。

このことは代謝産物の酪酸が宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで、T 細胞の制御性 T 細胞への分化誘導を行い、その結果炎症性腸疾患の発症を防ぐ役割があることを示している。なお、制御性 T 細胞増殖と DNA メチル化関連については今後より包括的な研究を期待する。今回の発見は、環境因子によるエピゲノム修飾に関する新たなパラダイムの形成につながるものであり、ヒト炎症性腸疾患の病態解明、診断マーカーとしての応用、あるいは治療法の開発にも役立つことが期待される。

8. 堀 哲也 研究者「セントロメアを規定する新規エピジェネティックマーカーの探索と同定」

評価結果:

ニワトリ DT40 細胞を用い、染色体工学技術を利用してネオセントロメアを誘導する技術確立した。一つは、セントロメアを人為的に欠損させた細胞集団からネオセントロメア細胞を得る方法である。この手法で得たネオセントロメアの解析から、セントロメアの形成は、DNA 配列に依存しない特有なエピジェネティックなメカニズムで制御される可能性を示した。一方、これと並行してセントロメア構成タンパク質を異所局在させることで、人工的に任意の場所にセントロメアを誘導できるシステムの構築にも成功した。また、試験管内再構成によりセントロメアクロマチン構造の解明も試みた。

高等動物を用いた系で、ネオセントロメアを誘導する染色体工学技術を世界にさがけ開発することに成功し、いままで謎に包まれていた染色体のセントロメアの解明が一举に進むことが期待される。今後セントロメア領域特異的ヒストン修飾のセントロメア形成及び維持における役割、CENP-A がエピジェネティックマークとしてセントロメア形成・維持において重要な役割をもつ点など、セントロメアを規定し、活性なセントロメアを形成する仕組みの解明に向け、さらに研究を深めることを期待したい。

9. 山口 雄輝 研究者「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」

評価結果:

ヒストン mRNA に特異的な 3' プロセシング装置の 1 つである U7 snRNA を標的とすることで、すべてのヒストン mRNA の 3' 末端を正確に切断し、ヒストン mRNA の 3' 末端の構造を明らかにした。

カルヒストンの発現を一挙にノックダウンして、外来ヒストンで相補することをめざした。一過性のトランスフェクション実験では問題なかったが、内在性 U7 snRNA の働きを安定的に阻害する方法については構築中である。一方レスキュー用外来ヒストンの安定的発現については、発現レベルはまだ低いが発現する細胞株を樹立することができた。また、今回の課題を提案する契機になったサブテーマとして、ヒストン H2B モノユビキチン化の機能解析を行った。その結果ユビキチン化 H2B と選択的に相互作用する因子を複数同定した。さらに、それらの因子とユビキチン化 H2B が snRNA 遺伝子上で協働して、同遺伝子の転写とプロセッシングを制御していることを明らかにした。

メインテーマについては、内在性 U7 snRNA の働きを安定的に阻害する方法の確立、ならびに安定で高レベルの外来ヒストンの発現など努力は認めるが、多くの技術的な挑戦が残っており、まだ十分な進捗が得られたとはいえない。解決に向け様々な試行錯誤を重ねていると思うが、チャレンジングな課題として採択したので所期の目的を達成すべく引き続き努力されることを期待する。そして当初の予定通り、UbH2B の効果を逆遺伝学的解析により調べて欲しい。

9. 評価者

研究総括 向井 常博 西九州大学 学長

領域アドバイザー(五十音順。所属、役職は平成26年3月末現在)

牛島 俊和 国立がん研究センター・上席副所長
 角谷 徹仁 国立遺伝学研究所総合遺伝研究系・教授
 金児-石野 知子 東海大学健康科学部 教授
 古関 明彦 理化学研究所 統合生命医科学研究センター グループディレクター
 佐々木 裕之 九州大学生体防御研究所 所長
 白髭 克彦 東京大学分子細胞生物學研究所 教授
 眞貝 洋一 理化学研究所 眞貝細胞記憶研究室 主任研究員
 田島 正二 大阪大学蛋白質研究所エピジェネティクス研究所 教授
 中西 理 独立行政法人医薬基盤研究所 部長
 広瀬 進 国立遺伝学研究所 名誉教授

...

(参考)

件数はいずれも、平成 26 年3月末現在。

(1) 外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	5	48	53
口 頭	25	21	46
その他	18	2	20
合 計	48	71	119

(2) 特許出願件数

国 内	国 際	計
0	0	0

(3) 受賞等

- ・飯田 哲史 : 第6回リバネス研究費キャリアー ライフサイエンス賞(H23. 3)
日本遺伝学会 2013年度 Best Paper 賞(H24. 12)
- ・岩田 淳 : 日本神経学会 学術研究部門賞(H24. 5)
- ・北野 潤 : 平成23年度科学技術分野の文部科学大臣表彰 若手科学者賞(H23. 4)
- ・長谷 耕二 : 2010年度日本免疫学会 研究奨励賞(H22. 12)

2011年度(財)日本ビフィズ菌センター 研究奨励賞(H23. 6)
・山口 雄輝 :2010年度手島精一記念研究賞(H22. 2)
東工大挑戦的研究賞(H23. 10)

(4)招待講演
国際 15件
国内 7件

別紙

「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域 事後評価実施 研究課題名および研究者氏名

(3年型)

研究者氏名 (参加形態)	研究課題名 (研究実施場所)	現職(平成26年3月末現在) (応募時所属)	研究費 (百万円)
飯田 哲史 (兼任)	Immortal DNA 機構解明への挑戦 (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 助教 (同上)	57
磯野 協一 (兼任)	細胞運命に関わるポリコーン群制御 の切り換え機構 (理化学研究所)	理化学研究所 上級研究員 (同上)	40
菅野 達夫 (専任)	RNAシグナルを介したDNAのメチル化 の分子機構の解明 (農業生物資源研究所)	科学技術振興機構さきがけ研究者 (アイルランド国立大学ゴールウェイ校 リサーチアソシエイト)	40
北野 潤 (兼任)	エピジェネティクス制御の多様性と進化 (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 特任准教授 (東北大学大学院 助教)	40
近藤 豊 (兼任)	がんの組織多様性に関わるエピジェネ ティクス可塑性とその制御機構 (愛知県がんセンター研究所)	愛知県がんセンター研究所 部長 (愛知県がんセンター研究所 室長)	40
西村 泰介 (兼任)	DNA メチル化の下流で働く作用メカニ ズムの解明 (名古屋大学生物機能開発利用研究 センター)	科学技術振興機構さきがけ研究者 (ジュネーブ大学 上級研究員)	40
長谷 耕二 (兼任)	腸内共生系におけるエピジェネティック な免疫修飾 (理化学研究所)	東京大学医科学研究所 特任教授 (理化学研究所 上級研究員)	48
堀 哲也 (兼任)	セントロメアを規定する新規エピジェネ ティックマーカーの探索と同定 (国立遺伝学研究所)	国立遺伝学研究所 助教 (同上)	40
山口 雄輝 (兼任)	哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝 学的解析技術の開発 (東京工業大学大学院)	東京工業大学大学院 教授 (東京工業大学大学院 准教授)	40

研究報告書

「Immortal DNA 機構解明への挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 飯田 哲史

1. 研究のねらい

多細胞生物のみならず単細胞生物においてもしばしば観察される非対称な細胞分裂機構は、多様な細胞を生み出すだけでなく未分化な状態を維持する機構として、幹細胞を作製・制御するために重要です。例えば高等真核生物に見られる成体幹細胞は、非対称な細胞分裂によって成体幹細胞自身と分化した細胞の二種類を生み出します。こうして維持された成体幹細胞は、分裂回数が限られている体細胞に比べ、遥かに多くの非対称な細胞分裂を経ても未分化維持・老化の抑制を行っているだけでなく、がん化などの細胞分裂に伴う染色体損傷や変異によって引き起こされる異常も抑える仕組みをもっていると考えられています。成体幹細胞が細胞分裂を繰り返してもゲノム中に残る変異を最小限にする可能性として 1970 年 John Cairns によって“Immortal DNA strand 仮説”が提唱されました。この仮説では、DNA 二本鎖をそれぞれ鋳型とした半保存的な DNA 複製によってつくられる姉妹染色分体のうち、変異が入りにくい DNA 鎖を鋳型にした姉妹染色分体のみが常に選択されて幹細胞側に分配され幹細胞ゲノムの安定性を維持するとしています。近年の染色体観察技術の向上により、この仮説を支持するような鋳型 DNA 選択型の染色体分配の現象の報告が様々な生物種・細胞種において報告される一方で、この現象を否定する報告も多数あり、鋳型 DNA 選択型の染色体分配が実際に起こっている現象なのかは不明です。もし一見同質に見える姉妹染色分体の一方の鋳型 DNA が選択されるエピジェネティックな現象が本当であるならば、その制御機構を明らかにすることはエピジェネティックスの新たな制御機構の発見につながることで期待されます。

現在、鋳型 DNA 選択型の染色体分配は様々な非対称分裂が見られる多細胞の高等真核生物を中心に細胞生物学的手法を用いて観察されています。しかし、一般に二倍体でゲノムサイズが大きく、染色体構造が複雑な高等真核生物モデルでは、細胞学的手法をもちいても大まかな染色体挙動を同定することしかできていませんでした。鋳型 DNA 選択型の染色体分配研究において問題となっている現象を明らかにするために、ゲノムサイズが小さく一倍体で染色体構造がシンプルな出芽酵母をモデルとして、鋳型 DNA 鎖選択型の染色体分配現象の探索と高速シーケンサーを用いた染色体解析技術の開発を目的としました。

2. 研究成果

(1) 概要

出芽酵母の XII 番染色体上にあるリボゾーム RNA 遺伝子リピート領域(以下、rDNA リピート)では、細胞周期の DNA 複製期において鋳型 DNA 鎖特異的な DNA 二重鎖切断が起こること、姉妹染色体のうち特定の鋳型 DNA 鎖を持つ一方で組換え修復機構により rDNA リピートのコピー数が増加すると考えられています。本研究では、一方の鋳型 DNA 鎖由来の染色体

の挙動を追える現象であるrDNAリピートの増幅機構に着目し、鋳型 DNA 鎖選択型の染色体制御機構のモデルとして研究を行いました。また、鋳型 DNA 鎖依存的な染色体分配を考える上で Immortal DNA strand 仮説の重要な点である成体幹細胞における非対称分裂については、出芽酵母の“出芽”による細胞増殖様式に着目し、一つの母細胞が非対称分裂によって小さな“娘細胞”と大きな“母細胞”に分かれる際にどちらの鋳型 DNA 鎖をもった XII 番染色体が分配されるのかについて解析を行いました。

出芽酵母の細胞周期を同調し、rDNA リピート増幅を誘導した場合、母細胞側にリピートが増幅した染色体とリピート数が変化しない染色体のうちどちらが選択的に分配されるかを調べた結果、母細胞側にリピートが増幅した XII 番染色体が選択的に分配されることが明らかとなりました。また、XII 番染色体のセントロメアを不活化した場合、他の染色体と異なり rDNA をもつ XII 番染色体は母細胞側に偏って蓄積することを見出しました。このことは、rDNA リピート自体に母細胞に偏って分配する機構が存在する可能性を示唆しています。実際に、rDNA ユニット中に母細胞側に残りやすくする機能領域の存在が明らかとなりました。

DNA 複製前後において鋳型 DNA 鎖側には損傷が蓄積しにくく修復による DNA 合成がほとんど起こらないという仮定は、DNA の半保存的複製機構の後支えによって、DNA 複製・修復機構の研究において検証されていないながらも常識となっています。Immortal DNA strand 仮説も、鋳型 DNA 鎖では損傷が蓄積しにくく修復が必要ないという前提の上に成り立っています。そこで、実際に鋳型 DNA 鎖の修復が通常起きていないのかを検証するため、高速シーケンサーを用いた一細胞周期における鋳型 DNA 鎖修復の定量技術を確立し、出芽酵母の一細胞周期における鋳型 DNA 鎖修復のゲノムワイドで網羅的な定量を行いました。その結果、これまで想定されていなかった鋳型 DNA 鎖の修復が染色体領域特異的に極めて高頻度で起こっているという全く新しい現象を見出しました。

(2) 詳細

研究テーマ A 「出芽酵母 rDNA をモデルとした鋳型 DNA 鎖選択型染色体分配機構解析」

出芽酵母の rDNA では、rDNA ユニット内の RFB 領域に結合する因子 Fob1 の発現を誘導することで組換え依存的な rDNA リピート増幅を一方の姉妹染色体(DNA 複製時のリーディング鎖を新生する染色体)にのみ誘導することができます。そこで、細胞周期を間期である G1 期に同調した娘細胞で Fob1 の発現を誘導し、一細胞周期まわしたのち母細胞を分離しリピートが増幅した染色体が蓄積しているかをパルスフィールド電気泳動によって調べたところ、母細胞特異的にリピートが増幅した rDNA が分配されていることが明らかにしました。つぎに、どのような機構によって母細胞に増幅した rDNA リピートが分配されるのかを明らかにするために、rDNA ののっている XII 番染色体のセントロメアをガラクトース誘導型プロモータにより一過的に不活化し、分配されない染色体が母細胞と娘細胞のどちらに偏って蓄積するかを調べました。セントロメアの不活化によって、他の染色体では娘細胞側に一定の割合で染色体が蓄積するのにに対し、すべての細胞で XII 番染色体は母細胞側に偏って蓄積することを見出しました。このことは、組換えが起きた XII 番染色体を母細胞側に rDNA を引き止める機構がある可能性を示唆していました。そこで、rDNA ユニット内に母細胞側に引っ張る機能領域がある可能性を考え、rDNA 一ユニットをもったプラスミドの分配を母細胞側に偏らせる領域の探索を行いました。その結果、rDNA の 25SrRNA 遺伝子領域内に母細胞側に偏って分配する配列が存

在することが明らかとなりました。この DNA 断片に作用し、rDNA の非対称分配を行う因子を探索するために、約 4,800 の遺伝子破壊株ライブラリを用いて非対称な分配によって起こる rDNA 依存的なプラスミドの不安定性を解消する変異体のスクリーニングを行いました。その結果、DNA 修復機構、細胞周期制御、ミトコンドリアなど様々な細胞機能に関連する 145 遺伝子破壊株において rDNA プラスミド特異的な不安定化が解消されていることを見出しました。このことは、染色体の特定領域に作用し、母細胞特異的に非対称に染色体を引っ張る作用をもつ機構が存在していることを強く示唆しています。

研究テーマ B 「高速シーケンサーを用いた網羅的な鋳型 DNA 鎖修復定量技術の確立」



図 1. 高速シーケンサーを用いた網羅的な鋳型 DNA 鎖修復定量法の概略

一細胞周期を考えた際、DNA の鋳型鎖を検出するには新生 DNA 鎖のみを標識し、新生 DNA 鎖の挙動から鋳型 DNA 鎖の挙動を類推する方法が有効だと考えられてきました。しかし、鋳型 DNA 鎖側で DNA 修復による鋳型 DNA 鎖側での DNA 合成が起きていないという前提で鋳型 DNA 鎖の挙動を類推するためには、実際に鋳型 DNA 鎖側で DNA 修復による DNA 創成が高頻度で起きていないことを確認する必要があります。そこで、出芽酵母を用いて、間期 G1 期から次の G1 期まで一細胞周期だけ新生 DNA 鎖を標識し、ゲノム DNA を断片化・高速シーケンス用のライブラリ化を行い、新生 DNA 鎖ライブラリを精製しその配列を網羅的に高速シーケンサーで決定し、各染色体領域における新生 DNA 鎖配列の出現頻度を算出することで、DNA 複製に加えて起こる鋳型 DNA 鎖での新規の DNA 合成頻度を“鋳型 DNA 鎖修復”として定量する方法を確立しました(図 1)。

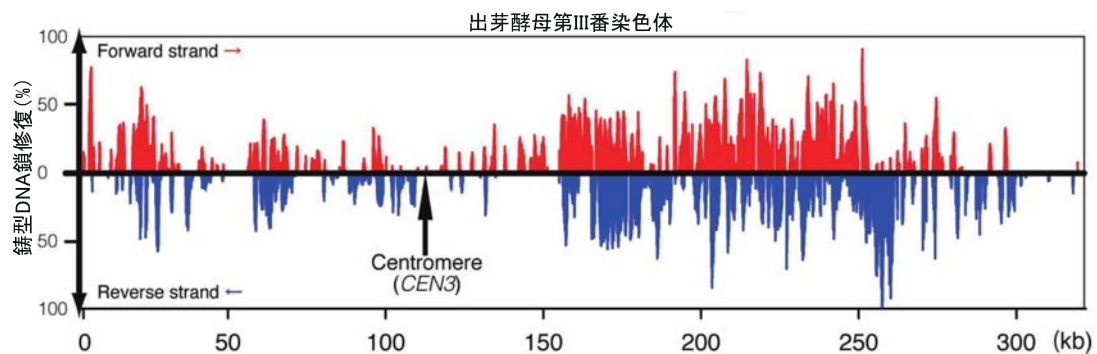


図 2. 出芽酵母第Ⅲ番染色体全体における鋳型 DNA 鎖修復頻度。上方向赤線:Watson 鎖・Forward 鎖、下方向青線:Crick 鎖・Reverse 鎖、横軸:染色体左腕末端からの距離(kbase)を示す。

この方法は、これまで定量 PCR などを用いて定量するには困難であった最大約 2 倍の変化を新生 DNA 鎖断片の出現頻度を計数するデジタルなデータで定量することにより極めて精度の高い定量性を確保しました。実際に、出芽酵母ゲノム全体における鋳型 DNA 鎖修復の頻度

について解析を行った結果、驚くべきことに、鋳型 DNA 鎖特異的な DNA 修復が 100%に近い極めて高い頻度で起こる染色体の特定の領域が複数クラスターを形成するように存在していることを見出しました(図 2)。このことは、これまで DNA 損傷が通常の細胞周期においてある程度ランダムに低頻度で起きていると考えられていたのが、実際には染色体の特定領域で極めて高頻度で起こるイベントであることを強く示唆しています。この鋳型 DNA 鎖修復による新規の DNA 合成は、一細胞周期あたり総量で全ゲノムの 10%にも及んでおり、染色体維持の機構が通常の細胞周期においても積極的に極めて活発に機能しているという新しい概念を提案する研究となりました。

3. 今後の展開

Immortal DNA strand 仮説が出芽酵母というモデルで解析できるかに挑戦する研究を行ったことで、染色体中に母細胞側に引き止められるような機能をもつ領域が存在する可能性が示唆されました。今後は、この領域に直接作用し核小体を構成する染色体の分配を担う因子の解析を行い、母細胞にのみ rDNA が増幅した染色体が分配されるという新しいタイプの鋳型 DNA 鎖特異的な染色体分配機構の研究を展開する予定です。

本研究課題で新たに見出した鋳型 DNA 鎖修復は、通常の細胞周期においても非常に活発にゲノムに内在性の DNA 損傷が特定の染色体領域蓄積していることを示しています。これまで、DNA 損傷は低頻度にランダムにゲノムに導入され、ほとんど蓄積することなく迅速に DNA 修復機構により修復されると考えられてきました。しかし、鋳型 DNA 鎖に DNA 損傷が残存しその後の細胞周期において染色体上のイベントを制御しているという可能性は、DNA 損傷自体が新しいエピジェネティックなマークとして機能しているというアイデアにつながると期待されます。DNA 損傷は、修復不全により遺伝子変異や染色体異常の原因となることがわかっています。DNA 損傷が特異的に蓄積する領域をヒトを含めた様々な生物種・細胞種で明らかにすることは、加齢に伴う疾病の原因となる遺伝子変異や染色体異常の原因となるメカニズムにせまる研究に発展すると期待しています。そこで、今後は様々な DNA 損傷がゲノム中に蓄積する動態を網羅的に定量解析する技術の開発を行い、「ゲノム損傷の蓄積動態の研究」として展開する予定です。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究の成果は、当初目標としていた鋳型 DNA 鎖選択型の染色体分配機構の分子メカニズムを踏み込んだ形で解明するものとは異なったものになりました。しかし、踏み込んだ研究が展開出来なかった理由である“安定な鋳型 DNA 鎖”という常識として考えられてきた前提を覆して“極めて動的な鋳型 DNA 鎖”を示す研究成果を得た点は、エピジェネティクスの新たな制御機構として DNA 損傷蓄積機構というアイデアを提供する研究として評価できると考えています。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

損傷の少ないゲノムの維持機構として提唱されている鋳型 DNA 鎖選択型の染色体分配現象について、鋳型鎖選択的にコピー数の増幅が起る出芽酵母の rDNA 領域をモデルとして検討した。その結果、rDNA 増幅染色体は母細胞に特異的に分配されることが分かり、その過程にエピジェネティック機構が働いていることが明らかになった。一般的に、鋳型 DNA 鎖は損傷が蓄積しにくいと信じられている。ところが、DNA 修復に伴う DNA 合成が鋳型 DNA 鎖において極めて高頻度かつ染色体領域特異的に起きていることが分かり、全く新しい現象の発見につながった。

出芽酵母をモデルとした研究において、染色体選択に rDNA 領域がエピジェネティックに関わっていることを明らかにしたが、今後その機構について明らかにする必要がある。一方、新たに発見された鋳型 DNA 鎖修復は特定領域に起るので、突然変異を予測可能な現象として捉えられるというパラダイムシフトを引き起こす。この現象の生物学的意味や制御機構について理解が進むのを期待する。とりわけ高等生物での解析、分化や疾患の発症につながることができれば社会インパクトは大きい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Iida, T., Iida, N., Tsutsui, Y., Yamao, F. and Kobayashi, T., “RNA interference regulates the cell cycle checkpoint through the RNA export factor, Ptr1, in fission yeast.”, *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 427, 143–147.
2. Iida, N., Yamao, F., Nakamura, Y., and Iida, T*, “Mudi, a web tool for identifying mutations by bioinformatics analysis of whole-genome sequence”, *Genes Cells.* 2014 in press

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 0 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 飯田哲史, 中嶋映里香, 小林武彦
“出芽酵母 *S. cerevisiae* における環状 rDNA 分子(ERC)の分配機構”, 第 44 回 酵母遺伝学フォーラム年会 (2011. 9) 福岡県・九州大

2. Iida, T., Iida, N., Nakashima, E., Sese, J., Nakamura, Y. and Kobayashi, T.
“Repair? Frequent events on yeast genome.”, Message from yeast to Epigenetics, 国際シンポジウム (2013. 9) 福井県・あわら温泉(招待講演)

3. 飯田哲史, 飯田直子, 中嶋映理香, 瀬々潤, 中村保一, 小林武彦
“出芽酵母の鋳型 DNA 鎖修復機構” 日本遺伝学会第 85 回大会 (2013. 9) 神奈川県・慶応大
4. 飯田哲史, 飯田直子, 中嶋映理香, 瀬々潤, 中村保一, 小林武彦
“出芽酵母の鋳型 DNA 鎖修復機構” 日本遺伝学会 (2013) Best Paper 賞 受賞
5. 飯田哲史, 飯田直子, 中嶋映理香, 瀬々潤, 中村保一, 小林武彦
“酵母をとらえてみたゲノム維持の素顔” 第 36 回日本分子生物学会年会 (2013. 12) 兵庫県・

神戸ポートアイランド（招待講演）

研 究 報 告 書

「細胞運命に関わるポリコーン群制御の切り換え機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研 究 者: 磯野 協一

1. 研究のねらい

ポリコーン群と呼ばれるクロマチン作用タンパク質因子は、発生やがん化など様々な細胞系譜の決定に深く関わっている。ポリコーン群の機能は遺伝子発現に対して抑制的で、ヒストン H3K27トリメチル化 (H3K27me3) やヒストン H2A モノユビキチン化 (H2Aub1) を触媒することやクロマチン高次構造変換を誘導することが知られている。次世代シーケンサーを用いたゲノムワイド解析では、ポリコーン群が発生・分化や細胞増殖に関わる遺伝子群を標的とし、それを“可逆的”に抑制していることが示された。このことは、適正なシグナルに応答して遺伝子発現が切り換わるようにポリコーン群の機能が制御されていることを示している。しかしながら、ポリコーン群による遺伝子抑制とその可逆性についての分子メカニズムは解明されていない。確かに、ゲノムワイド解析は不活性化遺伝子座上でのポリコーン群および H2Aub1、H3K27me3 の存在を表しているが、その一方で、活性化状態の遺伝子座上でもそれらは有意に検出されている。したがって、ポリコーン群の遺伝子座への局在は抑制のための必要条件ではあるが十分条件ではない。

我々はポリコーン群が細胞核内で形成する PcG body と呼ばれる構造体に注目してきた。一連の解析により、マウス胚繊維芽細胞 (MEF) において PcG body は、不活性化状態の標的遺伝子座上に存在し、クロマチン凝集と遺伝子抑制に重要であること示していた。PcG body 形成は、その構成成分 Phc2 の持つ自己重合活性に依存することも突き止めていた。さらに興味深いことに、PcG body 形成と Phc2 のリン酸化が相関していることにも気づいた。これらの結果にもとづいて、PcG body 形成の促進とその解体が、ポリコーン群標的遺伝子の発現スイッチングに直結し、それにはリン酸化シグナルが関与していると推察した。したがって、ポリコーン群による細胞の運命コントロールを理解する一環として本研究では、まず PcG body による遺伝子制御の普遍性を明示し、そして PcG body 形成を制御する分子機構を解明することを目的とした。加えて、PcG body のサイズ制御も調査した。

2. 研究成果

(1) 概要

ポリコーン群遺伝子抑制機能に作用するシグナル制御を解明するために PcG body を実験対象とした3つの研究テーマ、A「PcG body 制御モデルの普遍性の証明」、B「リン酸化によるポリコーン群機能制御の解明」、C「PcG body のサイズ制御の解明」を提案した。テーマ A では、胚発生過程においても PcG body が重要な役割を果たしていることを示した。テーマ B では、Phc2 のリン酸化部位を同定し、その意義を調査しているところである。テーマ C でサイズ制御に関わると期待していた Phc2 の HD1 ドメインからはポジティブな結果は得られなかったが、PcG body の安定化と遺伝子抑制に重要であることを示した。

(2) 詳細

研究テーマ A「PcG body 制御モデルの普遍性の証明」

培養細胞レベルで PcG body 形成による遺伝子抑制モデルを提唱していた。このモデルの普遍性を検証するために胚発生過程の組織を使って、PcG body 形成と *Hoxb* 遺伝子領域のクロマチン状態との関係を調査した。まず発生 9.5 日胚において *Hoxb* クラスターの 3' 側にある *b3* や *b4* 遺伝子は頭部では発現していないが尾部では発現している、一方、5' 側に位置する *b13* 遺伝子は胚全体で不活性であることを定量的 PCR によって確認した。この結果はこれまでの報告に一致する。これら発現状態と PcG body との相関を調べるために発生 9.5 日胚の頭部間充織と尾部間充織の Immuno-DNA-FISH 解析をおこなった。DNA-FISH 用プローブとして *b3/4* を含む領域と *b13* 領域を用い、Ring1b 抗体によって PcG body を検出した。3 次元画像解析の結果、頭部領域では PcG body、*b3/4* 領域、*b13* 領域は共局在しており、尾部では *b3/4* 領域と *b13* 領域は離れた位置にあり、*b13* 領域にのみ Ring1b シグナルが重なっていた。一方、PcG body 形成不全となる Phc2-SAM 点変異マウス胚の頭部領域では、*b3/4* 領域と *b13* 領域との 2 点間距離は野生型と比べ大きくなっていたが、尾部では同程度であった(図 1)。発現に関して、*b4* および *b13* は点変異型頭部で脱抑制していたが、尾部では変化していなかった。これらの結果は、PcG body 形成が *Hoxb* 領域のクロマチン凝集と発現抑制にリンクしていることを示した。したがって、PcG body 制御モデルは細胞レベルのみならず胚発生過程の遺伝子制御にも適用されていることが明らかとなった。なお、尾部で *b13* が抑制されているのは、PcG body 制御とは別の分子機構に依存していると考えられる。この結果の一部は、非公開データとして論文に記載された(Isono et al., Dev Cell 2013)。

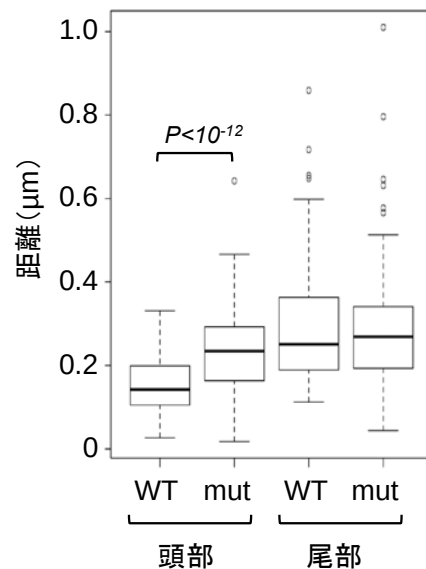


図1 *Hoxb3/4*と*b13*領域との2点間距離
野生型(WT)とPhc2-SAM点変異型(mut)
の9.5日胚切片で計測した。

研究テーマ B「リン酸化によるポリコーム群機能制御の解明」

PcG body 形成不全となる Phc2-SAM 点変異型細胞では、Phc2 の脱リン酸化が確認されていた。そこで Phc2 リン酸化とポリコーム群機能は相関関係にあると考えた。その調査のためにヒト培養細胞で安定的あるいは一過的に強制発現させたマウス Phc2 のリン酸化部位を同定した(横浜市立大学・木村弥生先生との共同研究)。その結果として合計 8 カ所のリン酸化部位を決定したが、当該部位の点変異型 Phc2 を用いた実験からどのリン酸化部位も PcG body 形成には不必要であることがわかった。そこで別角度から Phc2 リン酸化の意義を追求した。

一般的に刺激応答的に起こるリン酸化に生理学的意義が見いだされている。そこで安定発現した Phc2 ではリン酸化されていないが、細胞にとってストレスである一過的強制発現した Phc2 でリン酸化される部位に着目した。配列コンセンサスから 1 つのリン酸化部位が DNA 損

傷応答に関わる ATR/ATM/DNA-PK の標的であることが示唆された。最近、DNA 損傷応答とポリコーン群との関係が報告されている。それは DNA 損傷部位にポリコーン群が集積するという現象であるが、その意義はまだ明らかにされていない。Phc2 リン酸化がその解明の端緒となると考え、調査を進めた。期待通り、新規に作成した Phc2 リン酸化部位特異的抗体を用いた実験から Phc2 は DNA 損傷誘導的に活性化される ATM によってリン酸化されることが示唆された(図 2A)。またそのリン酸化 Phc2 は PcG body にも検出されることから、ポリコーン群機能に影響を与える可能性が示された(図 2B)。Phc2 リン酸化の役割をより良く理解するために、当該アミノ酸部位の点変異マウスを作製した。点変異ホモマウスは、メンデルの法則に従って生まれるため少なくとも胚発生は正常であると考えられる。このことは ATM ノックアウトマウスでさえ生存可能であることから予想された結果である。しかし ATM ノックアウトマウスは不稔性であることから Phc2 点変異マウスの稔性については確認する必要がある。生殖は DNA 損傷との闘いである。Phc2 点変異マウスの生殖組織での異常は十分に考えられる。現在、Phc2 リン酸化のポリコーン群遺伝子抑制機構および DNA 修復機構への貢献を調査しているところである。

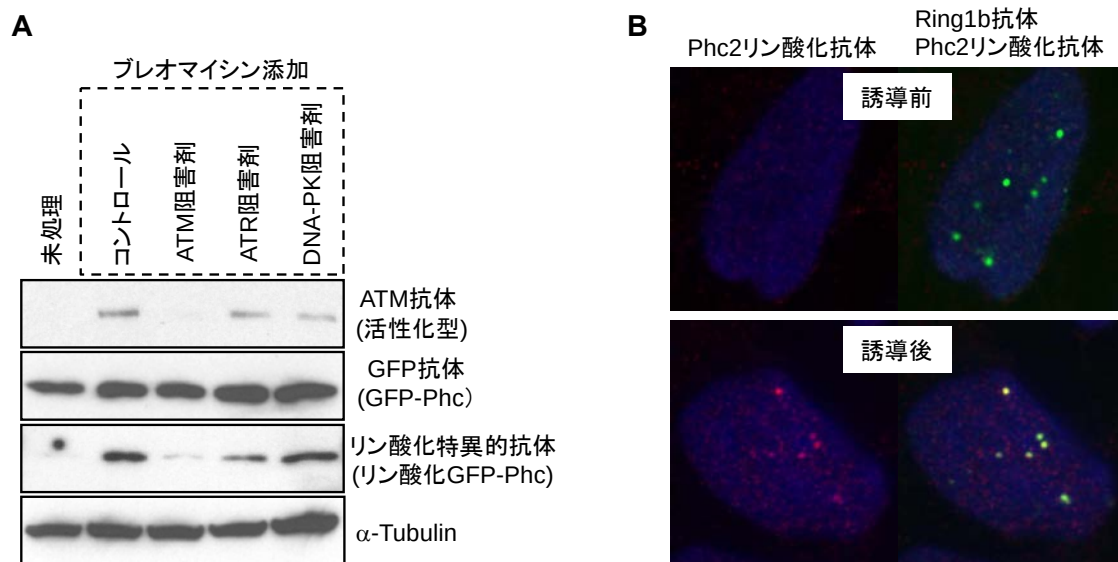


図2 DNA損傷誘導によるPhcリン酸化

- (A) GFP-Phc発現HeLa細胞にDNA損傷誘導剤ブレオマイシンを添加。30分後に表示の抗体によるウェスタン解析。阻害剤処理はブレオマイシン添加の2時間前から。
- (B) U2OS細胞の抗体免疫染色実験。ブレオマイシン添加後30分でリン酸化Phc2がPcG body (Ring1b抗体で標識)で検出されるようになる。

本件の別アプローチとして、キナーゼ siRNA ライブラリを持ち用いたスクリーニングをおこなった。そのスクリーニングでは、GFP-Phc2 を発現するヒト培養細胞での PcG body 形態を指標とした1次スクリーニングに続き、2次スクリーニングとしてMEFにおけるポリコーン群標的遺伝子 *Cdkn2a* 遺伝子の発現変化を追跡した。その結果として、細胞周期関連およびエネルギー代謝系のキナーゼが顕著に同定された。この結果の重要性は十分に認識しているが、時間配分の関係で本研究をここで一時的に中断した。

研究テーマ C「PcG body のサイズ制御の解明」

Phc2-SAMドメインの重合は'head-to-tail'型であるが、それを反映した PcG body は一定の大きさで存在している。この事実は、SAM 重合度合いが適切に制御されていることを示唆している。Phc2 の N 末にある保存配列 HD1 ドメインを欠いた変異型を発現させると、PcG body が巨大化することから(図 3A)、HD1 が SAM 重合にネガティブに働いていると期待した。また HD1 ドメインのコード領域を含まない Phc2 転写産物もデータベース登録されており(AK128821)、さらにそれに相当する分子量の Phc2 を免疫沈降法によってマウス胚から検出することができた。その低分子 Phc2 は HD1 領域を認識する抗体ではウエスタン検出できないことから、確かにそれは HD1 欠損型と判断した。したがって、Phc2 HD1 欠損型は生理的条件下で存在し、HD1 を含む完全型と競合あるいは協調しながら PcG body のサイズを適切にしていると考えた。この仮説を証明するために完全型 Phc2 の開始コドンに変異を入れたノックインマウスを作製した。ホモマウス胚の免疫沈降実験から、完全型は消失し、HD1 欠損型は残っていることを確認した(図 3B)。ホモマウス個体は、ポリコム群機能不全に特徴的な背骨後方化異常を示した。ホモ胚由来 MEF の PcG body を免疫蛍光染色により可視化してみたところ、期待に反して PcG body の巨大化は起こっておらず、むしろ *Phc2*^{-/-}細胞と同じく PcG body の縮小が観察された(図 3C)。この PcG body の縮小は、その成分バランスが崩れたことが原因であると考えられる。なぜなら HD1 は Ring1b や Mel18 との直接的な結合ばかりでなく Ring1b/Cbx2 相互作用にも重要であるからである(図 3B; Isono et al., Dev Cell 2013 の Fig. S3)。したがって、HD1 ドメインは PcG body を安定化させることで遺伝子抑制に貢献していることが示唆された。Phc2 HD1 欠損型の役割は不明であるが、少なくともポリコム群による遺伝子抑制には必ずしも必要でないことがわかった。本研究結果は、当初の仮説に従うものではなかったが HD1 ドメインの機能的重要性については示すことができた。Phc2 にはもう一つの保存配列である FCS ドメインが存在するが、その点変異型は PcG body 形成に影響しなかった。したがって、SAM 重合には自己制御能はなく、他の因子によって制御されていると考えられる。

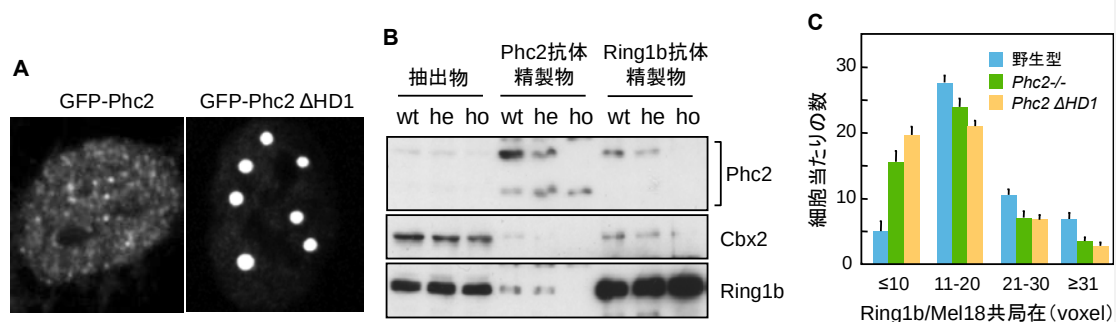


図3 Phc2 HD1ドメインの機能解析

(A) GFP-Phc2およびそのHD1欠損型を安定に発現したHeLa細胞のライブ画像。

(B) 野生型(wt)、*Phc2* ΔHD1ヘテロ(he)、ホモ(ho)胚の免疫沈降実験。Phc2およびRing1b免疫沈降産物からPhc2、Cbx2、Ring1bをウエスタン検出。Phc2バンドの上段は完全型Phc2、下段はHD1欠損型Phc2を表す。ホモ胚では完全型Phc2(上段バンド)が欠失している。

(C) PcG bodyにおけるRing1b/Mel18共局在の3次元画像解析。野生型、*Phc2*^{-/-}、*Phc2* ΔHD1ホモ細胞(各n=13)においてRing1bとMel18が共局在する領域のトップ50の体積を算出した。*Phc2*^{-/-}、*Phc2* ΔHD1細胞では共局在レベルが下方にシフトしている。

3. 今後の展開

研究テーマ A

Phc2-SAM 点変異由来 MEF では PcG body はほぼ完全に消失する。しかしながら、本研

究で観察した胚組織切片では、PcG body と言えるほどの大きさの Ring1b foci を多数検出した。この foci は Phc2 非依存的に形成される構造体として 4 次元環境下では維持されるのかもしれない。最近、Ring1b は Cbx2/4 や Phc1/2 を含まないが RYBP を含む複合体としても存在することが報告されている。Phc2-SAM 変異で観察された Ring1b foci はそのような Ring1b-RYBP 複合体を表しているのかもしれない。もしそうなら、この発見は現在理解されていない“Ring1b/Cbx/Phc 複合体と Ring1b-RYBP 複合体の機能的相違”の説明に役立つと考える。また、なぜ Ring1b-RYBP 複合体が SAM 重合を介さずに PcG body 様構造体をとれるのかも興味深い。今後は、この観点から Phc2-SAM 点変異マウスを有効活用していきたい。

研究テーマ B

DNA 損傷応答機構にポリコーム群がどのように貢献しているか？ これは DNA 情報維持とエピジェネティクスとのコラボレーションの1つとして世界的に注目されている。本研究で発見した DNA 損傷誘導的な Phc2 リン酸化を解析することで DNA 損傷応答におけるポリコーム群の役割を解明できると信じている。また DNA 損傷部位でのポリコーム群集積も一種の PcG body である。この集積に Phc2 リン酸化が関与することも期待される。

キナーゼ siRNA スクリーニングから得られたエネルギー代謝に関わるキナーゼは、ポリコーム群によるがん化のメカニズムに関与している可能性がある。今後は、この観点から研究を再開したいと思う。

研究テーマ C

PcG body のサイズ調節、言い換えれば、Phc2-SAM 重合の制御には、Phc2 HD1 ドメインによって自己制御されているという仮説を立て解析を進めたが、その仮説は否定された。したがって、他のポリコーム群あるいは非ポリコーム群分子によって制御されていると考えられる。研究テーマ B で実施したキナーゼ siRNA スクリーニングによって同定されたキナーゼは、その目的因子となるかもしれない。この観点から研究を進めたいと思う。

本研究では、Phc2 HD1 ドメインが PcG body の安定化を介してポリコーム群抑制機能に貢献しているということを遺伝学および生化学的に示すことができた。この成果を論文にまとめたいと思う。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、PcG body 形成を介した遺伝子発現制御を主流として位置づけ、その分子メカニズムを PcG body 形成に関わるシグナルや因子の同定によって説明しようとした。まだ直接的な証拠を掴んでいないが、その候補となるリン酸化部位やキナーゼを同定することができた。今後の展開次第で、目的を達成することもできるし、さらに当該リン酸化の生理学的意義も示すことができると信じている。特に、DNA 損傷応答する Phc2 リン酸化やポリコーム群機能に関与すると期待されるエネルギー代謝系キナーゼの同定は、がん治療の観点からも非常に興味深い。発生学的に PcG body による遺伝子制御を再現できたこと、その解析から Phc2-SAM 非

依存的な PcG body 様構造体の可能性を示したこと、また、Phc2 HD1 ドメインの重要性を提示できたことも評価に値すると思う。反省すべき点は、結果的に 3 つの研究テーマを関連づけられなかったことである。時間配分と重要度を考慮し取舍選択をしていれば、本研究期間内に「PcG body 形成を介した遺伝子発現制御」の本質に迫れたかもしれない。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ポリコム群が細胞核内で形成するポリコムボディー(PcG body)と呼ばれる構造体に着目し、PcG body による遺伝子抑制の普遍性とそれに作用するシグナル制御の解明を試みた。その結果、PcG body 制御モデルが細胞レベルのみならず個体発生レベルでも普遍的に適用されることが分かった。ついでポリコム群 Phc2 のリン酸化は PcG body 形成には影響しなかったが、リン酸化の遺伝子抑制ならびに DNA 修復機能への関与の可能性を示した。

ポリコム群による遺伝子発現の抑制機構として、PcG body 制御モデルの普遍性を明らかにした功績は大きい。さらに DNA 損傷に応答した Phc2 リン酸化およびそのリン酸化が抑制的効果を発揮し得るという結果は、遺伝情報維持とエピジェネティック制御の機能的リンクの端緒を開くものであり、今後の分子メカニズムの解明を期待する。その一方、PcG body 形成を制御する分子機構は未解決のままであり、分化やがん化などでの遺伝子発現スイッチングの仕組みを明らかにするためにもその解明は急務である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kondo T, Isono K, Kondo K, Endo TA, Itohara S, Vidal M, Koseki H. RING1 activates Meis2 by mediating interaction of its promoter with a tissue-specific enhancer. *Dev Cell* (in press)
2. Isono K, Endo TA, Ku M, Yamada D, Suzuki R, Sharif J, Ishikura T, Toyoda T, Bernstein BE, Koseki H. SAM domain polymerization links subnuclear clustering of PRC1 to gene silencing. *Dev Cell* 26, 565–577 (2013).

(2) 特許出願

なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

磯野協一 「Role of Phc2 phosphorylation in PcG-mediated gene repressions」、日本エピジェ

ネティクス研究会、奈良(2013 年 6 月)

磯野協一 「遺伝子サイレンシングにおけるポリコーム群 Phc2 リン酸化の役割」、第 35 回日本分子生物学会、博多(2012 年 12 月)

Isono K. “Gene silencing by the in vivo dynamics of Polycomb repressive complex PRC1” The 25th Mouse Molecular Genetics Meeting, Pacific Grove, CA(2012 年 10 月)

Isono K. “Roles of Phc2 polymerization in Polycomb repressive functions” The 10th International Society for Stem Cell Research, Yokohama (2012 年 6 月)

磯野協一 「Gene silencing by the dynamics of Polycomb group complexes」、第 44 回日本発生生物学会、沖縄(2011 年 5 月)

著作物

磯野協一 「ポリコーム群による遺伝子抑制とエピジェネティック治療への貢献、遺伝子医学 MOOK、25、37-42 (2013)

プレスリリース

「細胞の運命を左右する新しい分子メカニズムの一端を解明」

2013 年 10 月 1 日 理化学研究所発表

研究報告書

「RNA シグナルを介した DNA のメチル化の分子機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 3 月～平成 26 年 3 月

研究者: 菅野 達夫

1. 研究のねらい

近年、多くの真核生物で RNA 干渉等の RNA シグナルを介した「RNA サイレンシング」と呼ばれるエピジェネティックな遺伝子発現抑制機構の研究が広く、深く行われている。「RNA サイレンシング」とは、RNA 分子によってその RNA 分子と相補性を持つ遺伝子の発現を抑制するエピジェネティックな遺伝子発現制御機構の一つであり、植物においては、21 あるいは 22 塩基の microRNA (miRNA) あるいは miRNA によって切断された RNA から生じる 21 塩基の trans-acting small interfering RNA (tasiRNA) による標的 RNA 分解経路といった転写後調節による遺伝子発現抑制経路ならびに本研究のテーマである、24 塩基の small interfering RNA (siRNA) による標的 DNA 領域上のシトシンのメチル化を介した RNA-directed DNA Methylation (RdDM) と呼ばれる転写調節による遺伝子発現抑制経路の分子機構がよく研究されている。

これまでの研究により RdDM の分子機構は、他の RNA サイレンシング経路とも共通するいくつかのタンパク質の機能ホモログに加えて、植物特異的な DNA-dependent RNA polymerase 複合体である Pol IV および Pol V 等、種々のタンパク質が同定され、その全体像が明らかになりつつある。しかしながら、現在同定されている RdDM 機構に関与するタンパク因子は(1) RNA シグナル (siRNA) 生合成に関与するものか、(2) siRNA 生合成後、ターゲットとなる DNA 領域にメチル化を導入するステップで機能するものであり、現在のところ、RdDM の開始時においてこの 2 つのステップがどのようにつながっているのか、つまり「siRNA-タンパク複合体はどのようにしてターゲットとなる DNA 領域を見つけるのか？」というステップ (RdDM 初期段階) にどのようなタンパク質が必要なのかはよく分かっていない。

本研究では、RdDM の初期段階における分子機構に関与するタンパク質の同定と植物体において RdDM 機構が果たす役割について、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) をモデル植物として用い、遺伝学的手法および生化学的手法によって明らかにしていくことを目的として研究を遂行した。

2. 研究成果

(1) 概要

RNA シグナルを介した DNA のメチル化 (RNA-directed DNA methylation: RdDM) 現象は、RNA 分子を介したエピジェネティックな遺伝子発現抑制 (RNA サイレンシング) 機構のひとつで、二本鎖 RNA が二本鎖 RNA 特異的リボヌクレアーゼによって分解され生成される 24 塩基の small interfering RNAs (siRNA) によって、その siRNA と相同性を持つ DNA 領域に存在するシトシン残基に *de novo* のメチル化が導入される現象である。

これまでに、シロイヌナズナを用いた遺伝学的、逆遺伝学的解析により RdDM の分子機

構に関与する種々のタンパク質が同定されてきたが、siRNA を含む Silencing Effector Complex がどのようにして標的となる DNA 領域にリクルートされるのかは依然として分かっていない。

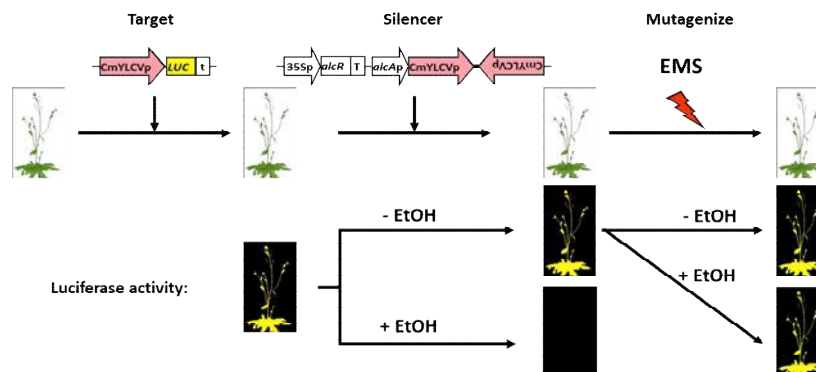
現在までに RdDM の分子機構に関与するタンパク質を検索する目的で行われてきた変異株のスクリーニングは、RdDM を既に起こしている植物体を変異処理し RdDM が解除された変異株を解析するというものである。このような手法は siRNA の生成あるいは de novo のメチル化を導入するステップの変異株を取得するには有効であるが、すでに RdDM を起こした後の植物体を変異処理しているが故に、RdDM の開始のステップに関与する変異株を取得するのに適しているとは言えない。

本研究では、誘導型のプロモーターを利用し、ターゲットとなる DNA 領域と相補性を持つ siRNA の発現を人為的に制御することによって、RdDM を起こす前の植物体に突然変異誘起処理を施し、スクリーニングによって RdDM が起きなくなった変異株を取得・解析することにより、RdDM の初期段階に関与するようなタンパク質を単離し、RdDM の分子機構の全体像を解明していくことを目的とした。

2 つ目の研究として、シロイヌナズナゲノム上で恒常的に発現している TAS 遺伝子座(これらの遺伝子の転写産物が分解されて tasiRNA となることから TAS 遺伝子と呼ばれている)に DNA のメチル化が導入されており、このメチル化には tasiRNA 生合成経路に必要なタンパク質因子および RdDM 経路に必要なタンパク質因子が必要であること、すなわち tasiRNA 生合成経路と RdDM 経路間のリンクを明らかにした。

(2) 詳細

研究テーマ A「RdDM の初期段階における分子機構に関与するタンパク質の同定のための形質転換シロイヌナズナ株の確立」



本研究の流れを示した図

本実験系では Cestrum yellow leaf curling virus プロモーターを (CmYLCVp) を RdDM によるメチル化のターゲットプロモーターとしてレポーター遺伝子の発現に用いた。CmYLCVp プロモーターはシロイヌナズナの植物体において恒常的に働くプロモーターであるため、後の変異株単離の過程において、さまざまな成長段階あるいは器官におけるスクリーニングが可能と考えられる。このプロモーターの下流にレポーター遺伝子としてルシフェラーゼをコードする遺伝子を融合した遺伝子カセットをシロイヌナズナに形質転換を行い、ターゲット株を得た。このターゲット株に対し、サイレンサーコンストラクトとしてアルコール誘導型プロモーターあるいは

ホルモン誘導型プロモーター(図ではアルコール誘導型プロモーターを用いたコンストラクトのみを示した)の下流にCmYLCVpを逆位反復配列の形で接続したコンストラクトを形質転換し、二つのトランスジューを持つ二重形質転換シロイヌナズナを作成した。この二重形質転換体では、サイレンサー由来の小分子 RNA 存在下でターゲットプロモーターのメチル化が誘導され、ルシフェラーゼ活性の減少が観察された。

研究テーマ B「TAS 遺伝子座における DNA メチル化分子機構の解析」

植物では miRNA によって切断された RNA から生じる 21 塩基の trans-acting small interfering RNA (tasiRNA) によって tasiRNA と相補性を持つ標的 RNA が分解される経路が存在している。tasiRNA は 21 塩基の小分子 RNA であり、RdDM を誘導すると考えられている 24 塩基の小分子 RNA とは異なる。一方、現在公開されているシロイヌナズナエピゲノムマップ上では恒常的に発現している TAS 遺伝子座(これらの遺伝子の転写産物が分解されて tasiRNA となることから TAS 遺伝子と呼ばれている)にシトシンのメチル化が導入されている。そこで、このメチル化がどのような経路によって誘導されるのかを tasiRNA 生合成経路に欠損を持つ種々の変異株および RdDM 経路に欠損を持つ種々の変異株を用いて解析した。その結果、そのメチル化には tasiRNA 生合成経路に由来する二本鎖 RNA および RdDM 経路に必要なタンパク質因子が必要であること、さらにはいくつかの Dicer の変異株を用いた解析により、おそらく 24 塩基のみならず 21 あるいは 22 塩基の小分子 RNA でも DNA のメチル化を誘導できることを明らかにし、これらの結果を論文発表した。

3. 今後の展開

誘導型のプロモーターを利用し、ターゲットとなる DNA 領域と相補性を持つ siRNA の発現を人為的に制御できる植物体に突然変異誘起処理を施すことが可能となっており、スクリーニングによって RdDM が起きなくなった変異株を取得・解析することにより、RdDM の開始のステップに関与するタンパク質因子を取得することができると考えられる。現時点で、「siRNA-タンパク複合体はどのようにしてターゲットとなる DNA 領域を見つけるのか？」というステップ(RdDM 初期段階)にどのようなタンパク質が必要なのかは依然としてよく分かっておらず、本研究から展開される研究成果は RdDM 分子機構の全体像を知る上で重要な知見をもたらすと考えられる。

植物において RNA 分子を介した DNA のメチル化現象はトランスポゾンや反復配列の発現抑制、種々のストレスに対する応答機構および植物の形態形成等多岐にわたってその関与が示唆されており、その分子機構の解明の重要性は、エピジェネティクスによる遺伝子発現調節機構を知るという基礎生物学的見地のみならず新しいバイオテクノロジーの開発の可能性を探るといった応用生物学的見地から見ても明らかである。

4. 評価

(1) 自己評価

RdDM 初期段階の分子機構の解明、具体的には RdDM 初期段階における分子機構に関与するタンパク質因子を遺伝学的手法によって単離・解析するという本研究の狙いに対して、上

述の結果は今後すべての研究の礎となる部分である。ただ、誘導をかけなくても小分子 RNA が生成してしまう等の事柄により、形質転換体の確立に終始してしまったのは残念である。せめてスクリーニングまではしたかったというのが本当の気持ちである。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

RNA によって引き起こされる DNA メチレーション(RdDM)の分子メカニズムに関して、初期段階の分子機作を明らかにするために遺伝学的手法を用いて解析を進めた。そのために構築した系が有効に働くことは確かめることができたが、突然変異誘起処理により RdDM が起きなくなった変異体の取得、解析までは至らなかった。サブテーマの tasiRNA に関しては、tasiRNA を含む小分子 RNA が TAS 遺伝子領域のメチル化に関与していることを明らかにした。

RdDM の分子メカニズムを解明するための遺伝学的アプローチを行った。当初計画したエタノール誘導系が有効に働かないため、あらたな系の構築に時間を費やし当初の目的のところまで到達できなかった。計画を立てる時点で慎重に検討することが望ましい。今後研究環境の事情が許せば、所期の目的を達成すべく RdDM の開始ステップを含めた RdDM の分子機構の全体像を解明することを期待する。一方 TAS 遺伝子に関しては、TAS 経路と RdDM 経路のクロストークなど興味深い成果を得ることができた。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kanno, T., Yoshikawa, M. and Habu, Y. (2013) Locus-Specific Requirements ofDDRComplexes for Gene-Body Methylation of TAS Genes in Arabidopsis thaliana. Plant Mol. Biol. Rep., 31, 1048-1052.
2. Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., Nishimura, T. (2012) DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. Plant Cell Physiol., 53, 766-784.
3. Naumann, U., Daxinger, L., Kanno, T., Eun, C., Long, Q., Lorkovic, Z.J., Matzke, M., Matzke, A.J. (2011) Genetic evidence that DNA methyltransferase DRM2 has a direct catalytic role in RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis thaliana. Genetics, 187, 977-979.
4. Kanno, T., Habu, Y. (2011) siRNA-mediated chromatin maintenance and its function in Arabidopsis thaliana. Biochim Biophys Acta., 1809, 444-451.
5. Yoshikawa, M., Kanno, T., Habu, Y. (2011) Two types of RNA silencing in plants: Post-transcriptional gene silencing and transcriptional gene silencing. Cell Technology, 30, 706-711.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

Dec. 2013: 36th Annual meeting of the molecular biology society of Japan (Kobe JAPAN;
Invited speaker)

Dec. 2012: 35th Annual meeting of the molecular biology society of Japan (Hakata JAPAN;
poster and oral presentation)

Jun. 2012: Seminar at Tokyo University of Agriculture and Technology (Tokyo, Japan)

May 2011: Seminar at National Institute of Agrobiological Sciences (Ibaraki, Japan)

Mar. 2011: 52nd Annual meeting of the Japanese society of Plant Physiology (Miyagi, Japan;
Invited speaker)

研究報告書

「エピジェネティックス制御の多様性と進化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成22年10月～平成26年3月

研究者: 北野 潤

1. 研究のねらい

本研究の目的は、野外動物集団を用いて、エピジェネティックス制御の集団間変異の進化的意義、及び、その進化遺伝機構を解明することである。具体的には、まず、野外に生息するトゲウオ科魚類のイトヨを中心に、表現型可塑性を示す集団と示さない集団について、エピジェネティックス制御の違いをまず明らかにし、次いで、QTL 解析やトランスジェニック法などを駆使して、表現型可塑性とエピジェネティックス制御の進化の分子機構の解明を目指す。表現型可塑性とは、同一の遺伝型の個体が周囲の環境に合わせて表現型を変化させることであり、生物が新規環境や環境変動に応答する際に重要な戦略の1つである。この課題には、回遊するイトヨと河川残留イトヨを利用し、塩分濃度や日長変化に対する応答性の違いを解析する。

ついで、性染色体転座を起こしている地域集団を用いることによって、ネオ性染色体の進化がゲノムのメチル化、低分子 RNA 発現などのエピジェネティックス制御に与える影響を明らかにする。申請者は、本課題採択以前に、日本海と太平洋のイトヨが性染色体転座(Y 染色体と常染色体の融合)によって性染色体の構造が異なっていることを発見していた。これら二種のイトヨを利用することで、この課題に迫る。また、種分化、特に近縁種間での雑種異常におけるエピジェネティックス分化の役割を明らかにする。既述の日本海と太平洋のイトヨは、人工的に交雑すると雑種オスが不妊になること(一方方向の交配のみで、また、雑種メスは正常)も明らかにし、さらに QTL マッピングを行って雑種不妊や交配行動の違いの原因遺伝子が性染色体上に存在していることも発見していた。そこで、この雑種不妊の現象にエピジェネティックス分化が関わっているか否かを検討する。

性染色体転座や表現型可塑性は、ヒトにおいても普遍的に見られる重要な現象であることから、これらの研究成果は、野外生物のみならずヒトをも含む生物のエピジェネティックス制御の進化機構の理解に対して大きく貢献すると期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

まず、本研究課題実施の際に必要な基盤情報を整えることを目的として、日本と北米の回遊型と河川型の複数のイトヨについて、全ゲノムを解読した。また、イトヨと同じトゲウオ科に属するトミヨを比較研究のモデルとして確立した上で、論文に報告した。

ついで、研究テーマ(A)に関連して、日長変化で発現変動を示す遺伝子として TSHB2 を、塩分刺激で変動を示す遺伝子としていくつかの神経ペプチドや下垂体ホルモンを同定した。これらのシス領域について DNA メチル化やヒストン修飾を現在解析している。これらの TSHB2 や神経ペプチドの機能を解析するために TALEN によるノックアウトの系や tol2 を用いたトランスジェニックの系を無事立ち上げることができた。

研究テーマ(B)に関しては、まず、性染色体融合が、どの程度普遍的な現象であるのかを明らかにするために、複数の分類群について X 染色体-常染色体融合が起こった種、Y 染色体-常染色体融合が起こった種の数のカウントし、その成果を論文二報に発表した。ついで、日本海イトヨと太平洋イトヨの雌雄 5 個体ずつについて HiSeq2000 を用いてゲノムを解読し、転座領域におけるゲノム上の特徴を明らかにし、論文に投稿した。また、低分子 RNA 発現と性染色体との関係も明らかにし論文に報告した。日本海と太平洋のイトヨの間で観察される雑種オスの不妊について、候補遺伝子を同定し、これらの機能的分化について生化学的に解析するとともに、トランスジェニックを作出した。

(2) 詳細

研究テーマ A「表現型可塑性の分子遺伝機構」

まず、本課題実施の際に必要な基盤情報を整えることを目的として、日本と北米の回遊型と河川型の複数のイトヨについて、全ゲノムを解読した。HiSeq2000 を用いて一集団当たり数十倍以上のカバレッジで解読し、貴重な基盤情報を得た。これらについて、ヘテロ SNP の頻度や自然選択がかかったらしき遺伝子について同定した(Yoshida et al. PLOS Genetics 印刷中)。

また、イトヨと同じゲウオ科に属するトミヨを比較研究のモデルとして確立し、論文報告した(Ishikawa et al. 2013 Journal of Evolutionary Biology)。北海道東部に生息する 3 種のトミヨ(汽水型トミヨ、淡水型トミヨ、エゾトミヨ)について、表現型分化や生殖隔離機構を明らかにした。エゾトミヨ、淡水トミヨ、汽水トミヨの隠蔽 3 種は生殖的に隔離されており、同所生息域でも淡水トミヨと汽水トミヨ間の雑種のみがごく稀に採集される程度であった。これら 3 種は河川の上流から下流にかけて生息域をうまく住み分けて共存しており、摂餌器官や浸透圧耐性能も大きく異なっていた。一方で、鱗板(体の側面の骨化組織)の変異は、単純な上流-下流勾配にそった変異はみられず、また、その遺伝基盤は近縁のイトヨ属とは異なる遺伝子で決定されていることが明らかになった。イトヨ属では、Eda 遺伝子が鱗板をコントロールしていることが既に知られているが、トミヨ属では Eda 遺伝型と鱗板表現型に相関は全く見られなかった。

これらの基盤情報を整えながら、まず、日長応答性の異なる回遊型と河川型のイトヨについて、日長を変化させた時に回遊型のみで変動を示す遺伝子として甲状腺刺激ホルモン(TSH)を同定した(Kitano et al. 2010 Current Biology; Ishikawa et al. 未発表)。TSH は糖タンパクであり、他の下垂体ホルモンと共通のアルファ鎖と TSH に特異的なベータ鎖(TSHB)からなる。魚類は全ゲノム重複の結果、二つの TSHB 遺伝子を持つが、このうち TSHB2 遺伝子がより顕著な日長変動を示す。また、カナダの回遊型と河川型のイトヨの F1 雑種のアリル特異的発現解析の結果、TSHB2 のシス領域の変化が集団間の反応の違いの原因であること、また、この領域に強い分岐自然選択圧がかかっていることを明らかにした。

ついで、塩分耐性の異なる回遊型と河川型のイトヨについて、塩分濃度を上昇させた時に回遊型でのみ有意に変動する遺伝子として神経ペプチドや下垂体ホルモンの遺伝子をいくつか同定した(Ishikawa et al. 未発表)。また、塩分耐性の違いに関わる原因遺伝子を同定するた

めに、カナダの回遊型と河川型のイトヨについて F2 雑種を作出し現在 QTL マッピングの最中である。

これらの TSHB2 や神経ペプチドの機能を解析するために TALEN によるノックアウトの系や tol2 を用いたトランスジェニックの系を無事立ち上げることができた。

最後に、これらの遺伝子の上流について DNA メチル化の集団間や環境間の違いをバイサルファイトシーケンス法で解析中である。

研究テーマ B「性染色体転座とエピジェネティクス」

まず、性染色体融合が、どの程度普遍的な現象であるのかを明らかにするために、複数の分類群について X 染色体-常染色体融合が起こった種、Y 染色体-常染色体融合が起こった種の数のカウントした。その結果、魚をはじめとする多くの分類群では Y 染色体-常染色体融合が X 染色体-常染色体融合に比して多く (Kitano & Peichel, Environmental Biology of Fishes 2012)、哺乳類のみが例外的に、両方の融合をほぼ同程度に起こすことを見いだした (Yoshida & Kitano, Evolution 2012)。さらに、哺乳類において X 染色体-常染色体融合を持つ種と Y 染色体-常染色体融合を持つ種を比較した結果、X 染色体と常染色体の融合は中部動原体染色体を多く持つ哺乳類で起こりやすく、Y 染色体と常染色体の融合は末端動原体染色体を多く持つ哺乳類で起こりやすいことを世界で初めて見いだした。また、X 染色体と常染色体の融合には、メスが卵子を形成する減数分裂の過程に、どのような形の染色体が卵子に伝達されやすいか (メス減数分裂ドライブ; female meiotic drive) が強く影響しているのではないかという仮説を提唱し、米国進化学会誌 Evolution に掲載された (Yoshida & Kitano, Evolution 2012)。

ついで、転座領域におけるゲノム上の特徴を明らかにするために、日本海イトヨと太平洋イトヨの雌雄 5 個体ずつについて HiSeq2000 を用いて解読された全ゲノム配列の解析を行った。その結果、転座をおこし、組み換えが X と Y で抑制されている領域において、neo-X 染色体と neo-Y 染色体の間で配列レベルでの分化が生じており、アミノ酸置換を起こす変異も多数蓄積していることなど、新しい知見を得ることができ、現在論文を投稿中である (Yoshida et al. 未発表)。さらに、雑種で見られるエピジェネティクス異常を解析するために、雑種を作出し、様々な発達段階の試料を採取し凍結保存した。

ネオ性染色体におけるエピジェネティクス制御を明らかにするために、性染色体の量的補償を解析した結果、一部の遺伝子には量的補償が見られたが、染色体全体が修飾されて補償されているという傾向は見られなかった。現在、この成果についても投稿中である。また、低分子 RNA を解析し、ネオ性染色体において特徴的な低分子 RNA の発現パターンの有無を解析したが、顕著な傾向は見られなかった (Kitano et al. 2013 BMC Genomics)。

近年、エピジェネティクス機構が近縁種間で分化することによって、近縁種間での生殖隔離 (つまり種分化) が進化する例がモデル動物で報告されている。これまでに同定された雑種異常の原因遺伝子の多くは DNA/クロマチン結合分子であり、雑種において、本来ではない染色体部位に結合することが異常の原因であると報告されている。また、これら原因遺伝子は近縁種間で急速進化が見られ、同義置換率に比して非同義置換率が高い ($K_a/K_s > 1$) ことが報告されている。

そこで、雑種不妊についてエピスタシスを組み込んだモデルを用いて QTL 解析を行った結果、X 染色体上の 2 カ所に雑種不妊の原因遺伝子座があり、これらの相互作用でほぼ完全に雑種不妊が説明できることが明らかになった。さらに具体的な雑種不妊の原因遺伝子を絞り込むために、まずは日本海イトヨと太平洋イトヨ両種の雌雄 5 個体ずつについて HiSeq2000 を用いて全ゲノムを解読した。1 個体平均 80 倍以上のカバレッジで、89%以上の領域について配列を決定した。その結果、QTL 領域内に、同義置換率に比して非同義置換率が高く、精巢で発現が確認されており、DNA/クロマチン結合能が示唆される遺伝子として 4 個の有力な雑種不妊の候補遺伝子を同定した。これらの遺伝子について遺伝子クローニング(太平洋型と日本海型の両型について)を行い、tol2 のベクターに組み込み、現在トランスジェニックイトヨを作成の上、育成中である。これによって、太平洋型イトヨの精巢発達に異常をもたらすような日本海型イトヨの遺伝子を同定する。また、ヒストンを含めたタンパク相互作用の生化学的解析を行っており、候補遺伝子の一つの遺伝子については、日本海型と太平洋型でヒストンへの結合能が変化しているという生化学的な実験結果も得られた。

3. 今後の展開

雑種不妊や表現型可塑性の候補遺伝子を同定することに成功したので、これらのノックアウトやトランスジェニックを利用して遺伝子の機能を *in vivo* で解析する。その上で、表現型可塑性の遺伝子については、当該遺伝子領域の DNA メチル化やヒストン修飾、関連する転写因子との関わり等を明らかにすることで、当初の目的であるエピジェネティックス制御の近縁集団間での分化を解明する。雑種不妊に関しても、既に、候補遺伝子がヒストン結合において分化を示すことが明らかになりつつあるので、この分子機構をさらに追求することで、近縁集団間でのエピジェネティックス分化を種分化の関係を解明する。

4. 評価

(1) 自己評価

研究の当初の狙いに向かって着実に近づいており、数年以内にその目標を達成できるところまで来ていることから、十分に成功であったと評価する。具体的には、表現型可塑性の遺伝子については、候補遺伝子を同定することに成功し、現在は当該遺伝子領域の DNA メチル化やヒストン修飾、関連する転写因子との関わり等を明らかにする段階に入っている。また、雑種不妊に関しても、既に、候補遺伝子がヒストン結合能において分化を示すことが明らかになりつつあり、この分子機構をさらに追求することで、近縁集団間でのエピジェネティックス分化と種分化の関係を解明できると期待される。ネオ性染色体の研究に関しては、既に国際誌に論文を複数報告しており、現在、一報も改訂中である。

イトヨの複数集団のゲノム配列、ゲノム編集技術によるノックアウト、Tol2 を用いたトランスジェニック等は、今後の私の研究室の発展に欠かせない基盤情報と技術であり、3年でこれらの基盤を十分に整備できたことも大成功であった。また、エピジェネティックスとは違う異分野で研究していた私にとって、エピジェネティックスに関する多くの知識を習得できたこと、研究の進め方に関して専門のアドバイザーから適切なコメントを要所で頂けたことは今後の研究者とし

ての人生の大きな糧になることから、成功であったと評価する。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

表現型可塑性とエピジェネティクス制御の進化に関しては、表現型可塑性に関わる遺伝子が同定され、当該遺伝子のエピジェネティクスに関しては緒についたところである。種分化とエピジェネティクス制御に関しては、雑種不妊に関して候補遺伝子がヒストン結合能において分化を示すことが明らかになりつつある。

課題のスタートに当たりイトヨの全ゲノム解読初め、複数の課題に関わる原因遺伝子の解明のためにゲノム解析、QTL 解析など精力的に進めた。その結果、多くの候補遺伝子が同定されると共に種分化に関して DNA/クロマチン結合能に関わることが明らかになりつつあり、生物多様性の進化にエピジェネティクスが重要な役割を果たしている可能性を示唆した。イトヨにおける遺伝子操作法が確立したので、今後近縁種間でのエピジェネティック分化と種分化の関係、さらに表現型可塑性とエピジェネティクス制御の進化に関しても、当初の目的を達成することを期待する。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Yoshida, K. and **Kitano, J.** The contribution of female meiotic drive to the evolution of neo-sex chromosomes. *Evolution* (2012) 66: 3198–3208
2. **Kitano, J.**, S.C. Lema, J.A. Luckenbach, S. Mori, Y. Kawagishi, M. Kusakabe, P. Swanson, and C.L. Peichel. Adaptive divergence in the thyroid hormone signaling pathway in the stickleback radiation. *Current Biology* (2010) 20: 2124–2130.
3. Ishikawa, A., Takeuchi, N., Kusakabe, M., Kume, M., Mori, S., Takahashi, H., and **Kitano, J.** Speciation in ninespine sticklebacks: reproductive isolation and phenotypic divergence among cryptic species of Japanese ninespine stickleback. *Journal of Evolutionary Biology* (2013) 26: 1417–1430
4. **Kitano, J.**, Yoshida, K., and Suzuki, Y. RNA sequencing reveals small RNAs differentially expressed between incipient Japanese threespine sticklebacks. *BMC Genomics* (2013) 14:214
5. **Kitano, J.**, and Lema, S. C. Divergence in thyroid hormone levels between juveniles of marine and stream ecotypes of the threespine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Evolutionary Ecology Research* (2013) 15: 143–153

(2) 特許出願

なし

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演(国際)

Okazaki Biology Conference at Okazaki (2012 March 21)

Annual Meeting of the Society for Molecular Biology and Evolution at Kyoto (2011 Jul 27)

学会発表(国内)

2012 年、2013 年日本遺伝学会

2012 年分子生物学会

2011 年、2013 年 日本動物学会

2012 年日本進化学会

学会発表(海外)

2011 年 Meetings for the American Fisheries Society

2012 年 Stickleback Conference 2012

2013 年 European Society for Evolutionary Biology

受賞

2011 年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞

著作物

Ishikawa, A., and Kitano, J. (2012). Ecological genetics of thyroid hormone physiology in humans and animals. In: *Thyroid Hormones* (N. K. Agrawal Ed.) p.37-50, InTech

森 誠一・北野 潤 (2012) ドルフ・シュルター 適応放散の生態学(日本語訳). 京都大学学術出版会

北野 潤・河田雅圭 (2012) 自然選択の直接観察. 第 13 章 エコゲノミクス —遺伝子からみた適応— (シリーズ 現代の生態学 7) 日本生態学会(編集) 共立出版

北野 潤 (2011) イトヨの行動遺伝学. 第 6 章 行動遺伝学入門—動物とヒトの“こころ”の科学— 小出剛・山元大輔(編集) 裳華房

研究報告書

「がんの組織多様性に関わるエピジェネティクス可塑性とその制御機構」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 近藤 豊

1. 研究のねらい

がんは日本において死亡原因の第一位を占める疾患である。特に組織多様性を示す腫瘍が少なからず存在し、高転移能、高浸潤能、治療抵抗性をもった細胞群が腫瘍内に存在すると、現在の治療法では根治に至ることがきわめて困難となる。

近年のマイクロアレイやシーケンス技術の進歩により、個々のがん症例における詳細なエピゲノム異常の網羅的な評価が可能となった。遺伝子変異に加えてエピゲノムの変化は、発がんの様々な過程に関与しており、発がん機構の理解、がんの分類、診断マーカーの開発などに多くの情報をもたらした。しかし一方で、周囲環境に適応してがんが細胞の表現形を変化させ、組織多様性を獲得していく際に変化するエピゲノム情報についてはほとんど解明されていない。我々はがんが腫瘍内に治療感受性や転移能の異なる細胞集団を獲得する背景に、幹細胞様がん細胞(がん幹細胞)の存在とそのエピジェネティクス制御機構が鍵となると考え、ヒト膠芽腫のがん幹細胞(Glioma Stem cell, GSC)の分化誘導モデルを樹立した。GSCの分化誘導時に変化するエピゲノムの網羅的解析とその制御に関わるシグナルネットワークの包括的解明を試みた。さらに発がん初期の腫瘍が高悪性度の腫瘍に変化するエピジェネティックな過程を解析するため Mosaic Analysis with Double Markers (MADM)法を利用した Nf1、p53 欠損-脳腫瘍発症マウスモデルを用いて解析した。このモデルでは、Nf1 と p53 がホモ接合型欠失した細胞のみ緑色に蛍光を発する特徴を持っており、早期のがん細胞から高悪性度のがん細胞に変化する過程を追うことが可能である。

本研究では、がん細胞がエピジェネティクス可塑性を利用して、周囲環境との相互作用から組織多様性を獲得し、高悪性度の腫瘍に変化していく機構を明らかにすることを目的とした。さらにその分子基盤を標的とした、小分子化合物によるエピジェネティクスの人為的な制御を目指した。がんの可塑性を制御する新規化合物の同定はエピジェネティクス治療の可能性を拡大するばかりでなく、がん治療法としての新しい作用点を築くことが期待できる。

2. 研究成果

(1) 概要

がん細胞には様々なエピジェネティクス異常が蓄積している。このうちヒストン修飾による遺伝子発現制御機構は可逆性が高い。ポリコームタンパク複合体 2 (polycomb repressive complex, PRC2) は、構成タンパクであるヒストンメチル化酵素 EZH2 を介してヒストン H3 リシン 27 のトリメチル化 (H3K27me3) 修飾を誘導する。PRC2-H3K27me3 は、胚性幹細胞(ES 細胞)の分化制御に関わっており、発生分化過程に重要な役割を果たしている。がん細胞では EZH2 の発現亢進や遺伝子変異に伴う機能異常がしばしばみられ、また H3K27me3 の修飾異常が様々な遺伝子領域で観察される。

がん組織には ES 細胞や体性幹細胞などの幹細胞に見られる自己複製能と多分化能という二つの特徴を持つがん幹細胞が、がん組織の中に存在する。可塑性を持ったがん細胞は、周囲環境に適応し増殖・浸潤すると考えられるが、その背景には、動的で可塑性のあるエピゲノム制御が重要な働きをしている可能性が高い。がん細胞の可塑性は組織の多様性に関わり、腫瘍内に高い転移能・浸潤能を伴った細胞集団を形成することにつながる。

我々は、がんが組織多様性を形成する背景に、がん幹細胞の存在と可塑性の高いエピゲノム機構、特に PRC2-H3K27me3 が関与すると考え、腫瘍内で多彩な組織像を呈するグリオブラストーマ(GBM)に着目して解析を進めた。

解析には、GBM 症例から樹立したがん幹細胞(GSC)を用いた分化誘導モデルと、Mosaic Analysis with Double Markers (MADM)法を利用した Nf1、p53 欠損-脳腫瘍発症マウスモデルを用いて、以下の4つのテーマについて研究を行なった。

- A. がん幹細胞の可塑性に関わる基盤的データの構築
- B. がん幹細胞の分化を制御するエピゲノム機構の解析
- C. EZH2(H3K27 メチル化酵素)の阻害剤の探索
- D. 脳腫瘍発生マウスモデルを用いた、脳腫瘍形成に関わるエピゲノム解析

がんの組織多様性の制御に関わるエピゲノム可塑性の制御機構を明らかにし、がん治療を画期的に変革する新しい治療の開発につなげたいと考え研究を展開した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「がん幹細胞の可塑性に関わる基盤的データの構築」

1. 脳腫瘍がん幹細胞(GSC)の樹立および分化誘導

GBM 3症例から、GSC を樹立した。GSC を血清存在下の分化誘導培地で培養すると、細胞はディッシュの底に接着し、形態を紡錘状に変化させる (Serum exposed brain tumor cell、以下 S-BTC)。これら紡錘状細胞では、Nestin の発現低下、および分化マーカーである GFA P、 β -tubulin III(Tuj1)、OSP(oligo-specific protein)の誘導が観察された。興味深いことに GSC を血清で刺激すると、24 時間以内に EZH2 および EED、SUZ12 が核内へ顕著に流入することを見出した。PRC2 は分化誘導時のエピゲノム変化に関与する可能性が示唆された。さらに GSC から S-BTC への変化は可逆性のある変化であり、分化 $\rightleftharpoons$ 脱分化の関係にあることを見出した。

2. GSC の分化誘導時におけるエピゲノム変化

GSC から S-BTC に変化する過程におけるエピジェネティクス変化について、3 患者から樹立した 3 株の GSC を用い、クロマチン免疫沈降-マイクロアレイ法(ChIP-chip 法)により H3K27me3 の標的遺伝子を解析した。その結果、GSC と S-BTC の共通標的 193 遺伝子、GSC 特異的 H3K27me3 標的 19 遺伝子(Nanog, Wnt1 etc.)、S-BTC 特異的 H3K27me3 標的 105 遺伝子(BMP5 etc.)を同定した(GSC 3 株で共通)。

3. GSC のがん形質を制御する PRC2-H3K27me3

GSC において EZH2、Nanog、Wnt1 の抑制もしくは BMP5 の過剰発現は、血清刺激による GSC の分化誘導および Brain Slice Culture による GSC の浸潤能を阻害した。

H3K27me3 修飾による遺伝子制御は GSC の腫瘍進展の過程で重要な役割を演じていると考え、GSC での EZH2 の阻害による腫瘍形成能への影響について解析した。EZH2 を含む PRC2 複合体を阻害する小分子化合物 3-Deazaneplanocin A (DZNep) もしくは shRNA による EZH2 の阻害により、細胞増殖の抑制と分化誘導の阻害が確認された。さらに EZH2 阻害による抗腫瘍効果は、NOD-scid マウスを用いた xenograft モデルでも観察された。

以上の結果からがん幹細胞が周囲環境に適応して浸潤する際に、PRC2-H3K27me3 によるエピジェネティック機構は必須であり、その際に EZH2 の細胞内局在が重要な役割を演じていると考えた (*Cancer Res* 2013)。

研究テーマ B 「がん幹細胞の分化を制御するエピゲノム機構の解析」

1. EZH2 の細胞内局在に関わる解析

EZH2 には nuclear localization signal or sequence (NLS) が存在する。この領域を欠失変異させた EZH2 発現コンストラクトを作成して GSC に遺伝子導入し、その分化誘導に与える影響を解析した。NLS 欠失 EZH2 を過剰発現させた GSC では、血清刺激により EZH2 は核内に移動せず、分化誘導も阻害された (Tuj1 陰性、GFAP 陰性)。

2. がん幹細胞の分化過程における非翻訳 RNA の網羅的解析

GSC から S-BTC の変化過程で発現変動する RNA をマイクロアレイ、および RNA-sequencing で解析した。

① がん幹細胞の分化過程に関わる micro-RNA(miR)の解析

GSC の 2 株で S-BTC に分化誘導時に共通して増減する miR をそれぞれ 12、63 個同定した。各 miR について in silico で標的遺伝子の検索を行ない、神経分化に関わる遺伝子を標的とし、且つ PRC2-H3K27me3 で制御される miR-1275 を同定した。miR-1275 は、神経髄鞘の形成に必須なタンパクである Oligodendrocyte Specific Protein (OSP/CLDN11) の発現制御に関わっており、GSC の分化誘導時には H3K27me3 による miR-1275 の発現抑制と OSP/CLDN11 の発現上昇が誘導されることを見出した (*JBC* 2012)。

② GSC 分化誘導時における lncRNA の発現解析

長鎖非翻訳 RNA (large non-coding RNA, lncRNA) の一部は、ヒストン関連タンパク等の複数のタンパクの結合の足場 (scaffold) となり、標的遺伝子領域にリクルートされることによりその領域における転写を制御することが報告されている。すなわちどの領域のエピゲノムを特異的に変化させるかの機序について明らかにできる可能性があると考えた。GSC 2 株を用いて分化誘導時における lncRNA の発現変動を RNA-sequencing 法で解析した。共通して発現が増減する lncRNA をそれぞれ 181、170 遺伝子同定した。

これらの lncRNA のうち polycomb タンパクとの結合が報告されている linc-A についての解析を進めた。

③ GSC 分化誘導時における linc-A の役割

linc-A に対する阻害を、siRNA を用いて行った結果、pluripotent-associated genes および neural stem cell (NSC) markers (Nanog, SOX2, Nestin, CD15) の低下と共に sphere の崩壊が観察された。

次に linc-A が enrich される DNA 領域を網羅的に解析するため、5-Bromo-UTP (BrUTP)

標識 linc-A RNA を合成し細胞内に導入した後、抗 BrdU 抗体を用いた BrU-ChIP-chip を行なった。GSC 2 株で共通して 630 遺伝子領域で linc-A の enrichment が観察された。ジーンオントロロジー解析から、特に神経分化に関わる遺伝子領域で enrich されていた。linc-A が結合する DNA 領域のヒストン修飾を解析した結果、多くの領域で H3K27me3 修飾が見られた。さらに linc-A のノックダウンにより、同領域の H3K27me3 修飾の解除が観察された。linc-A と EZH2 および SUZ12 の結合をウェスタンブロットで確認した。

以上の結果から、GSC の分化誘導時には linc-A—PRC2 による遺伝子制御が重要な役割を果たしていると考えた。

研究テーマ C 「EZH2 (H3K27 メチル化酵素) の阻害剤の探索」

H3K27me3 標的遺伝子のプロモーターを SEAP 遺伝子上流に組み込んだベクターを前立腺がん細胞株に導入し、PRC2-H3K27me3 を阻害する化合物のスクリーニングするシステムを開発した。本アッセイ系は PRC2 の阻害剤のみではシグナルの上昇が乏しいため、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (trichostatin A) と組み合わせることで感度を上げるための最適化を行なった。15,000 の小分子化合物のスクリーニングを行い 10 の候補化合物を同定したが、いずれも true hit ではなかった。

研究テーマ D 「脳腫瘍発生マウスモデルを用いた、脳腫瘍形成に関わるエピゲノム解析」

発がん初期の腫瘍が高悪性度の腫瘍に変化する過程に関わるエピゲノムを解析するため Mosaic Analysis with Double Markers (MADM) 法を利用した Nf1、p53 欠損-脳腫瘍発症マウスモデルを用いた。このモデルでは、p53 と Nf1 がホモ接合型欠失した細胞が緑色に蛍光を発するため、前がん細胞から高悪性度のがん細胞に変化する過程を追うことが可能である。

1. 正常脳神経細胞の樹立および MDAM マウスモデルからの腫瘍細胞の樹立

正常神経細胞のエピゲノム変化を観察するため E15.5 の胎生マウスより Neural Stem Cell (NSC) を樹立した。また MADM マウスの P8 より immunopanning 法を用いて OPC 様前がん細胞を樹立し、さらに P150 (腫瘍形成後) の細胞を樹立した。

2. MDAM マウスモデルから樹立した腫瘍細胞のエピゲノム解析

ChIP-chip 法を用いて、P8 と P150 細胞の H3K4me3 標的遺伝子、H3K27me3 標的遺伝子、および RNA polymerase II (Pol II) 結合領域の解析を行った (全 25,840 遺伝子)。P8 では H3K4me3 修飾を認める遺伝子は 3,473 遺伝子、H3K27me3 修飾は 1,720 遺伝子であり、P150 では H3K4me3 修飾は 4,921 遺伝子、H3K27me3 修飾は 2,318 遺伝子であった。両方の修飾を受ける bivalent 遺伝子は、P8 では 100 遺伝子であるのに対して、P150 では 796 遺伝子と多く認め、P150 はより未分化な状態の細胞が増殖していた。

二次性膠芽腫の発がんには中枢神経系細胞の分化異常が寄与すると予測されており、我々はエピゲノム異常による分化異常が膠芽腫形成に重要な役割を果たしていると考えた。腫瘍形成後 (P150) では腫瘍形成前 (P8) と比較して、多くの神経分化に関わる遺伝子が H3K27me3 修飾を受けており、p53、Nf1 異常に続くエピジェネティクス異常が、中枢神経系細胞の分化や発達を抑制することで膠芽腫の形成を引き起こすことが示唆された。

3. 今後の展開

動的にがん細胞を制御するエピゲノム機構についての見解を得つつある。エピゲノムの遺伝子への書き込みには、幹細胞ニッチを含めた細胞外環境からのシグナルを含め複雑な要素が関わっていると予測される。幹細胞ニッチからのシグナルによるエピゲノム関連タンパクの制御や非翻訳 RNA とエピゲノム修飾タンパクとの相互作用、さらにゲノム情報との相互作用などエピゲノムの書き込みに及ぼす作用とその機構について統合的に解明を試みる。今後の研究展開は以下の方向で行う。

A. がん幹細胞の分化を制御するエピゲノム機構の解析

現在がん幹細胞の周囲環境シグナルと非翻訳 RNA により制御されるエピゲノム誘導の機序を明らかにしつつある。マウスモデルやヒトがん幹細胞モデル等を用いて解析する。

B. PRC2-H3K27me3 修飾に関わるパスウェイを阻害する化合物の探索

今回のプロジェクトで、PRC2-H3K27me3 を阻害する化合物のスクリーニングするシステムを開発した。本システムは別のプログラムでさらに多くの化合物スクリーニングに応用が可能であった。複数のヒット化合物が得られており、詳細に解析を行なっている。

本研究プロジェクトを推進し、EZH2/PRC2 を介した H3K27me3 修飾はがん幹細胞の維持のみならず、その進展・増殖過程に深く関与していると考えた。本研究から、腫瘍形成過程における新たなエピジェネティクスの関わりを明らかにするとともに、エピジェネティクスを標的とした新しいがんの治療法の可能性が見出すことができた。可塑性をもって様々に変化するがん細胞を標的とするためには、エピゲノムを何らかの形でフリージングすることが必要であると考え。よりがん細胞特異的な治療法の開発を目指し研究を発展していきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

一般に固形がんの組織内に見られる腫瘍細胞は分化度の異なる細胞が不均一に存在する。本研究ではこの組織多様性の背景に、がん組織中に存在する分化能をもったがん細胞が、外部からのシグナルに応じて核内のエピジェネティクスネットワークを再構築し、周囲環境に適応可能ながん細胞へと変化していくことによると考え、脳腫瘍幹細胞モデルを用いて解析を行った。がん幹細胞は可塑性を伴った細胞であることを明確に示すことができ、当初の目的の一部は解明できたと考える。さらに研究を進めていく過程で、非翻訳 RNA を介した新たなエピゲノム機構を明らかにすることができた。今後の遺伝子領域特異的なエピゲノム・リプログラミング法の解明の一助となる可能性を秘めており、研究の進展が期待できる。

また、がんの発生を考える上で、そのゲノム・エピゲノム異常の蓄積様式の解明は極めて重要である。本研究でMADMマウスモデルを使うことにより、p53 遺伝子、Nf1 遺伝子の欠失に続いて起こる普遍的なゲノム・エピゲノム異常の蓄積様式を少しずつ解明しつつある。そのような研究を進展できたことは評価できると考える。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

膠芽腫から樹立した幹細胞(GSC)の血清による分化誘導は分化⇔脱分化の関係にあり、この過程にポリコム複合体(PRC2)が関与することを示し、がん細胞の浸潤にはPRC2-H3K27me3が必須であることを明らかにした。ついで、lincRNAの一つがPRC2のリクルートメントに重要であること、このRNAを抑制することでがん幹細胞の増殖が抑制されることを見出した。さらに、脳腫瘍発症モデルマウスを用いた解析では、エピジェネティック異常が膠芽腫の形成を引き起こすことを示した。

がんの組織多様性に関わるエピジェネティクスの可塑性に関して、様々な角度からPRC2の関与が重要であることを示した。特に脳腫瘍幹細胞の解析から、がん細胞のエピゲノム制御についてlincRNAの関与ははじめ新たな知見を見出し多くの成果を得た。このテーマ全体に関しては、今後がんのエピゲノム変化の作用と機構についてその統合的理解に向けた作業仮説が必要であろう。今後lincRNAの機能の分子機構をさらに明らかにし、将来的にはがん治療につながるような研究に発展させることを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Natsume A, Ito M, Katsushima K, Ohka F, Hatanaka A, Shinjo K, Sato S, Takahashi S, Ishikawa Y, Takeuchi I, Shimogawa H, Uesugi M, Okano H, Kim SU, Wakabayashi T, Issa JPJ, Sekido Y, Kondo Y. Chromatin regulator PRC2 is a key regulator of epigenetic plasticity in glioblastoma. *Cancer Res.* 2013, 73, 4559–70.
2. Okamoto Y, Shinjo K, Shimizu Y, Sano T, Yamao K, Gao W, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Murakami S, Tanaka Y, Joh T, Sato S, Takahashi S, Wakita T, Zhu J, Issa JP, Kondo Y. Hepatitis Virus Infection Affects DNA Methylation in Mice with Humanized Livers. *Gastroenterology*. in press
3. Katsushima K, Shinjo K, Natsume A, Ohka F, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Kondo Y. Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 suppression via a polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *J Biol Chem.* 2012, 287, 27396–406 .
4. Okamoto Y, Sawaki A, Ito S, Nishida T, Takahashi T, Toyota M, Suzuki H, Shinomura Y, Takeuchi I, Shinjo K, An B, Ito H, Yamao K, Fujii M, Murakami H, Osada H, Kataoka H, Joh T, Sekido Y, Kondo Y. Aberrant DNA methylation associated with aggressiveness of gastrointestinal stromal tumour. *Gut.* 2012, 61, 392–401.
5. Shinjo K, Okamoto Y, An B, Yokoyama T, Takeuchi I, Fujii M, Osada H, Usami N, Hasegawa Y, Ito H, Hida T, Fujimoto N, Kishimoto T, Sekido Y, Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with distinct clinical characters of lung adenocarcinoma. *Carcinogenesis.* 2012, 33, 1277–85.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演・海外】

1. Kondo Y. 「Epigenomic Dysregulation in Cancer」 Epigenetic switch regulates plasticity of cancer stem cell in human glioblastoma. 6th Asian Epigenomics Meeting. 2011. Symposium.
2. Kondo Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with clinical outcome of lung adenocarcinoma. Sapporo Cancer Epigenetics Seminar of the A3 Foresight Program. 2011. Symposium.
3. Kondo Y. 「Genomic Instability and epigenetics」 Epigenetic networks regulate plasticity of cancer stem cell in glioblastoma. 13th Japanese-German Cancer Workshop. 2011. Workshop.
4. Kondo Y. 「Cancer Genomics and Epigenomics: Towards personalized cancer medicine」 Epigenetic regulatory network in plastic interconvertibility between tumor-initiating cells and non-tumor-initiating cells. US-Japan Cancer Genomics Workshop. 2011. Workshop.
5. Kondo Y. 「Epigenetics in Cancer」 Epigenetic plasticity contributing to establishment of tissue heterogeneity in glioblastoma. The 15th US-Japan Cellular and Gene Therapy Conference. Epigenetics in Cancer. 2012. Symposium.
6. Kondo Y. 「Epigenetics in Diseases」 Polycomb repressive complex 2-mediated epigenetic plasticity contributing to establishment of tissue heterogeneity in glioblastoma. The 3rd Shanghai International Conference of Epigenetics in Development and Diseases. 2012. Symposium.
7. Kondo Y. 「Biomarker in Cancer」 Translational Implications of Epigenetic Changes in Human Malignancies. 10th International Conference of the Asian Clinical Oncology Society. 2012. Symposium.
8. Kondo Y. Study of Aberrant DNA Methylation in Human Hepatocyte Chimeric Mice. International Symposium on Genetic Regulation and Targeted Therapy of Cancer and 3rd Symposium of A3 Foresight Program. 2012. Symposium.
9. Kondo Y. 「Translational Genomic Medicine」 Mechanistic Link between Hepatitis Viral Infection and Induction of Aberrant DNA Methylation in Human Hepatocyte Chimeric Mice. The 17th Japan-Korea Cancer Research Workshop. 2012. Workshop.
10. Kondo Y. 「Epigenetics and Cancer Cell States」 Epigenetic plasticity and its clinical implications in human neoplasia. 9th AACR-Japanese Cancer Association Joint Conference. 2013. Symposium.

【主要な学会発表】

1. Okamoto Y, Shinjo K, Kataoka H, Joh T, Tanaka Y, Fujii M, Murakami H, Osada H, Sekido Y, Kondo Y. Analysis of epigenetic alterations in mice with humanized liver after hepatitis virus infection. 102th American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2011. Poster.
2. Shinjo K, Kondo Y, Okamoto Y, Yokoyama T, Noriyasu U, Fujii M, Murakami H, Osada H, Sekido Y. Integrated analysis of genetic and epigenetic alterations reveals CpG island methylator phenotype associated with clinical outcome of lung adenocarcinoma. 102th American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2011. AACR-GlaxoSmithKline

Outstanding Clinical Scholar Award. Poster.

3. Katsushima K, Shinjo K, Ohka F, Fujii M, Osada H, Sekido Y, Natsume A, Kondo Y. Epigenetic regulation of miR-1275 through histone H3 lysine 27 trimethylation during human glioma stem-like cell differentiation. 103th American Association for Cancer Research Annual Meeting. 2012. Poster.
4. Natsume A, Katsushima K, Shinjo K, Ohka F, Hatanaka A, Ichimura N, Kondo Y. Epigenetic Plasticity Regulated by Polycomb Repressive Complex 2 in Human Glioblastoma. Gordon Research Conference “Cancer Genetics & Epigenetics” 2013. Poster.
5. Ohka F, Natsume A, Kondo Y. Loss of p53 and Nf1 and subsequent epigenetic alterations in glioblastoma mouse model. Gordon Research Conference “Cancer Genetics & Epigenetics” 2013. Poster.
6. Shinjo K, Okamoto Y, Tanaka Y, Issa JPJ, Kondo Y. Innate Immune System is Adequate for Induction of DNA Methylation after Hepatitis Viral Infection in Human Hepatocyte Chimeric Mouse. Gordon Research Conference “Cancer Genetics & Epigenetics” 2013. Poster.

【欧文総説、単行本等】

1. Shinjo K, Kondo Y. Clinical implications of epigenetic alterations in human thoracic malignancies: epigenetic alterations in lung cancer. *Methods Mol Biol.* 2012, 863, 221–39.
2. Okamoto Y, Kondo Y. General Mechanisms of Cancers -Genetic and epigenetic alterations in inflammation-related cancers-. Cho CH, Yu J. *From Inflammation to Cancer: Advances in Diagnosis & Therapy for Gastrointestinal and Hepatological Diseases.* World Scientific Publishing. 29–48. 2012.

研究報告書

「DNA メチル化の下流で働く作用メカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成23年4月～平成26年3月

研究者: 西村 泰介

1. 研究のねらい

DNA メチル化は哺乳動物と植物で共通に観察されるエピジェネティック修飾と呼ばれるクロマチン修飾の1つであり、DNA メチル化酵素の働きにより、DNA 複製後も、特に植物では次世代においても、その修飾パターンが維持される。プロモーター領域におけるDNA メチル化は遺伝子発現の抑制 (Transcriptional Gene Silencing, TGS) を引き起こすことが知られており、DNA メチル化のパターンが、遺伝子の発現パターンに密接に関連づけられると考えられている。これまで哺乳動物・植物を用いた研究により、確立・維持・解除と言った DNA メチル化の制御に関与する因子が次第に解明され、哺乳動物・植物間で共通の機構が少なからず存在することが明らかになっている。

このように、DNA メチル化自体の制御、つまり上流の作用メカニズムについては解明が進む一方で、下流の作用メカニズム、つまり DNA メチル化のシグナルがどのようにクロマチン構造に影響を与え、最終的に遺伝子の発現を変化させるのかは、哺乳動物、植物を通して、ほとんど明らかにされていない。しかしながら、エピジェネティック修飾やクロマチン構造の変化と遺伝子の発現制御の関連というエピジェネティクスの本質を理解する上で、この過程は解明されるべき課題であり、その全容の解明が待たれている。

未知の経路の新規因子の同定には、順遺伝学アプローチによる突然変異体の探索が非常に有効であるが、哺乳動物の DNA メチル化関連因子の突然変異体は、しばしば胚性致死の表現型を示し、遺伝解析が困難である。そこで本研究では、遺伝解析の容易なモデル植物シロイヌナズナを研究材料に用いて、DNA メチル化の下流に作用する候補因子の突然変異体を新規方法により選抜し、これらの候補因子を同定、解析することにより、DNA メチル化から遺伝子の発現制御までの作用メカニズムを明らかにすることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

シロイヌナズナの TGS 因子 MOM1 の突然変異体では、TGS は解除されるが DNA メチル化は変化しない。このことから MOM1 は DNA メチル化の下流で作用する因子の候補と考えられる。本研究ではさらに多くの下流候補因子を単離する事を目的に、*mom1* 突然変異体の抑圧変異体 *smom* を複数単離し、その内の *smom3* 突然変異体に特に着目して解析を行った。CG メチル化酵素の変異体 *met1* や非 CG メチル化酵素の二重変異体 *drm2 cmt3* では、それぞれ CG メチル化と非 CG メチル化が減少し、ヘテロクロマチン遺伝子の TGS が解除されるが、これらの変異体背景でさらに *smom3* 突然変異を導入すると、これらのヘテロクロマチン遺伝子の発現が再び抑制された。しかしこれらの遺伝子では発現が再抑制されているにも関わらず、DNA メ

チル化は減少したままであった。これらの遺伝解析結果から SMOM3 は DNA メチル化の下流でヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御していると予想される。原因遺伝子を同定した結果、*SMOM3* 遺伝子のコードするタンパク質は、原核生物のメチル化酵素の活性ドメインと似たドメインを持っていた。ヒトを含めた真核生物でも同様のドメインを持つホモログが見出されたが、真核生物での分子機能は明らかにされておらず、このタンパク質が遺伝子発現制御に関与する事が示されたのは本研究が初めてである。また DNA メチル化による遺伝子発現制御機構を持たない分裂酵母でもこのドメインを持つホモログが存在する。このホモログの遺伝子破壊株を作製して観察したところ、RNAi 経路に関与する因子の遺伝子破壊株で TGS が解除されたヘテロクロマチン遺伝子の発現を抑制した。この結果から *SMOM3* のヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御するという機能は分裂酵母と植物で保存されている事が示された。

(2) 詳細

下流因子の同定を目的とした順遺伝学的探索方法の1つとして、既知の DNA メチル化制御因子の突然変異体に対する抑圧変異体を探索する方法が考えられる。例えば、DNA メチル化維持酵素 Dnmt1 ホモログの欠失したシロイヌナズナ *met1* 突然変異体では、CG メチル化が減少し、ヘテロクロマチン遺伝子における TGS が維持できないが、再び TGS が維持されるようになる抑圧変異は、DNA メチル化の下流因子に誘発された突然変異であることが期待される。しかしながら *met1* のような CG メチル化が減少するような突然変異体では、生育に大きな影響が見られる上に、TGS が解除された遺伝子座の発現は、*met1* 突然変異と独立に振る舞いかつ不安定で、通常の遺伝様式に従わない事から、*met1* 突然変異体に対する抑圧変異の探索を困難にしている。そこで本研究では、DNA メチル化の下流で作用する候補因子 MOM1 の突然変異体に着目して、その抑圧変異体 (*suppressor of mom1*, *smom*) を探索するというアプローチにより、DNA メチル化の下流で作用する候補因子をさらに同定し、その機能解析を行った。

(a) *smom* 突然変異体の探索と遺伝解析

mom1 突然変異体では、DNA メチル化に変化が観察されることなくヘテロクロマチン遺伝子の TGS が解除される。この *mom1* 突然変異体に化学変異原処理を施し、再び TGS が引き起こされる変異体系統を 12 系統独立に単離した (*smom1* から 12 まで)。 *mom1* 突然変異体への戻し交配と連鎖解析を行う事で、*smom1*、2、4 は優性、残りは劣性の変異体であり、その中でも少なくとも *smom2*、3、6 は 1 遺伝子座に起因するもので、それぞれ 1 番、2 番、3 番染色体上に座乗する可能性が高い事が示された。また突然変異体同士を交配して相補性を試験したところ、*smom3*、5、12 は雑種 1 代目で表現型が相補できず、同じ遺伝子に変異が生じている事が示された。そこで複数の変異アリルが存在する *smom3*、5、12 (それぞれ *smom3-1*、3-2、3-3 に改名) に焦点を当てて解析を進めた。

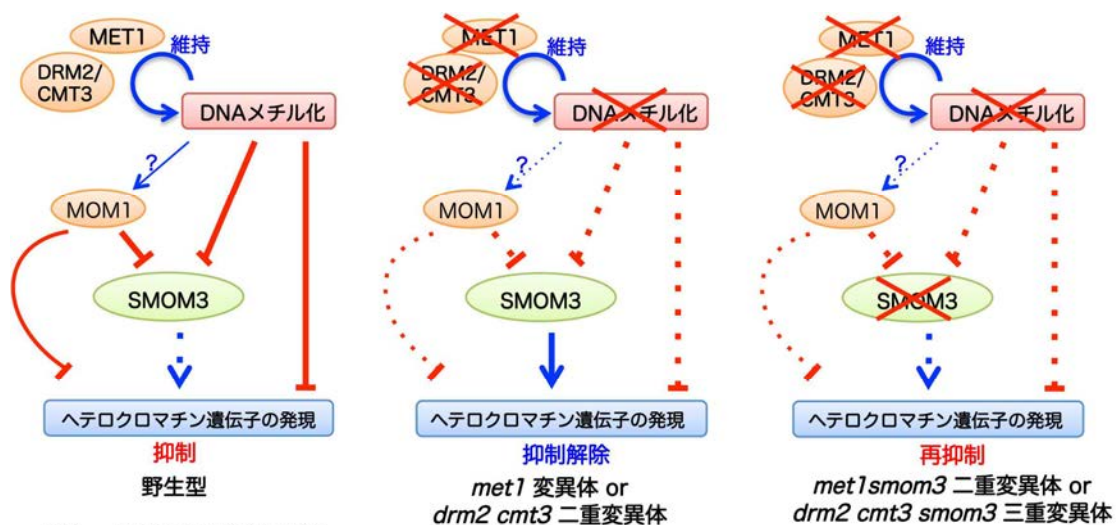
(b) DNA メチル化酵素突然変異体と *smom3* 突然変異体との遺伝的相互作用の解析

SMOM3 タンパク質が DNA メチル化による遺伝子発現制御にどのように関与するかを調べるために、*smom3* 突然変異体と DNA メチル化酵素の突然変異体に交配し、二重・三重突然変異体の表現型を観察した。CG メチル化の維持に作用する MET1 の突然変異体では、CG メチル

化が減少し、セントロメアリピートやトランスポゾンといったヘテロクロマチン遺伝子の TGS が解除されるが、*met1 smom3* 二重突然変異体では、これらのヘテロクロマチン遺伝子の発現が抑制された。発現が再抑制されるトランスポゾンの1つ *MULE-F19G14* では、*met1 smom3* 二重突然変異体でも CG メチル化は低下したままであった。これらの遺伝解析結果から SMOM3 は CG メチル化の下流で、ヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する因子である事が示唆された。

一方、非 CG メチル化の維持に作用する DNA メチル化酵素である DRM2 と CMT3 の二重変異体では、*SDC* 遺伝子などの非 CG メチル化によって発現が抑制されているヘテロクロマチン遺伝子の非 CG メチル化が減少し TGS が解除されるが、*drm2 cmt3 smom3* 三重突然変異体では、これらの遺伝子の発現が再抑制された。このように発現が抑制されるにも関わらず、この三重突然変異体でも *SDC* 遺伝子のプロモーター領域における非 CG メチル化は減少したままであった。しかしながら非 CG メチル化によって TGS が維持される遺伝子の発現全てに SMOM3 が関与するわけではなく、野生型と比べて *drm2 cmt3* 二重突然変異体で TGS が解除される 200 の遺伝子の内、*drm2 cmt3 smom3* 三重突然変異体では、53 の遺伝子だけが有意に発現が抑制されていることが明らかになった。これらの結果から SMOM3 は非 CG メチル化に制御される一部のヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する因子である事が示唆された。

これらの遺伝解析の結果から予想されるモデルを図1に示す。



(c) SMOM3 遺伝子の同定と機能解析

連鎖解析によって *SMOM3* 遺伝子の座乗する領域を 500kb 以内に限定し、次世代シーケンサーによる *smom3-1* 突然変異体の全ゲノム配列の再決定の結果から、野生型と異なる塩基配列を持つ遺伝子を当該領域内で選び出し、*smom3-2* 突然変異体と *smom3-3* 突然変異体における塩基配列を決定したところ、これら3つの突然変異体全てで点突然変異が生じている遺伝子を見出した。この遺伝子を含む約 6kb の染色体領域を、*smom3-1* 突然変異体に形質転換したところ、この突然変異体の表現型が相補された事から、この遺伝子を *SMOM3* であると結論づけた。この *SMOM3* 遺伝子がコードするタンパク質は、原核生物で S-アデノシルメチオニン依存的にリボソーム RNA のアデニンをメチル化する酵素のメチル化活性ドメインに似たドメイン

を持つ。真核生物でも植物以外にもヒト、マウス、ショウジョウバエ、線虫、分裂酵母などでこのドメインを持つホモログと考えられるタンパク質が存在するが、出芽酵母にはこのタンパク質のホモログは存在しない。線虫と植物では機能欠失体の報告があり、それぞれ生殖細胞系列の発生や花成の遅延という表現型を表す事が報告されている。しかし、メチル基を付与する基質などその分子としての機能については、真核生物では何も明らかになっておらず、遺伝子発現制御への関与も本研究で始めて明らかにされた。

SMOM3 プロモーターに制御される SMOM3-GFP 融合遺伝子を形質転換した植物を観察したところ、植物体全身の細胞で GFP シグナルが観察され、細胞内では核内にシグナルが観察された。リボソーム RNA のプロセッシングは核小体で行われるが、特に核小体で GFP シグナルは観察されなかったことから、真核生物ではリボソーム RNA のメチル化とは別の機能を持つと予想された。

(d) 分裂酵母ホモログの解析

分裂酵母は DNA メチル化による発現抑制機構は持たないが、セントロメアリピートなどのヘテロクロマチン領域は Dcr1 や Ago1 などが関与する RNAi 経路によって TGS が維持される。SMOM3 ホモログ *sth1* (*smom three homologue 1*) の遺伝子破壊株を作製し、*dcr1* Δ や *ago1* Δ との二重遺伝子破壊株を作製して観察したところ、これらの遺伝子破壊株背景で、TGS の解除されたセントロメアリピートの発現が、*sth1* Δ により抑制された。この結果から、SMOM3 のヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御するという機能は DNA メチル化による発現抑制機構の無い分裂酵母でも進化的に保存されている事が示唆された。

3. 今後の展開

本研究で、新たな制御因子として SMOM3 を同定する事に成功したが、この SMOM3 の分子レベルでの機能を明らかにすることが今後は必要であろう。具体的には SMOM3 が植物でもメチル化酵素として作用するのか、また、もし作用するならその基質は何かを解明する事が望まれる。これらの結果から DNA メチル化の遺伝子発現への作用についての新しい側面が明らかになっていくであろう。また本研究からヒトやマウスのホモログの解析に発展させることで、哺乳動物における DNA メチル化による遺伝子発現制御にも新しい展開が期待できる。本研究で単離した *smom3* 以外の *smom* 変異体についても、まだ解析が途中であるので、原因遺伝子を明らかにすることで、DNA メチル化の下流の作用メカニズムがさらに明らかにされるであろう。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究ではシロイヌナズナ突然変異体を用いることで、DNA メチル化の下流で作用する新規因子の候補 (SMOM3) を同定し、さらにこの因子のホモログタンパク質が植物以外にも存在し、分裂酵母では類似の機能を持つ事を示す事が出来た。このように、遺伝解析の容易な植

物を用いた研究を端緒に、他の生物でも機能が保存された因子を同定するという当初の目的を達成出来たと考えている。一方、今回同定した SMOM3 の分子レベルでの作用機構を生化学的アプローチで明らかにする事を試みたが、残念ながら本研究期間内には達成出来なかった。今後も研究を進めることで、SMOM3 の分子機能を解明したいと考えている。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

DNA メチル化の下流で作用する候補遺伝子 MOM1 の突然変異体に着目して、その抑圧変異体を探索する方法で、DNA メチル化の下流で作用する候補遺伝子群を探索し、同定した。その中の一つ、*smom3*に着目し遺伝子解析を進めた結果、SMOM3 は CG メチル化、あるいは非 CG メチル化の下流で、ヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する因子であることが分かった。*smom3* 遺伝子の構造解析により、リボソーム RNA のアデニンをメチル化する酵素のメチル化活性ドメインに似たドメインを持つことが分かった。植物以外に真核生物でもこのドメインを持つタンパク質が存在することを明らかにした。

DNA メチル化下流で抑制する因子を同定し、その機構を明らかにすることをめざし一定の成果を得ることができたことは評価したい。そのために構造解析、遺伝学的解析、細胞学的解析などはなされたが、機能解析は不十分であり、今後とも生化学的に明らかにすることを期待したい。また、ほかの候補遺伝子の同定も進め、全体像が明らかになることを期待している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

- | |
|---|
| 1. T. Nishimura, G. Mollinard, T. J. Petty, L. Broger, C. Gabus, T. D. Halazonetis, S. Thore, *J. Paszkowski. Structural basis of transcriptional gene silencing mediated by <i>Arabidopsis</i> MOM1. <i>PLoS Genetics</i> , (2012) 8 : e1002484. |
| 2. H. Saze, K. Tsugane, T. Kanno and *T. Nishimura. DNA methylation in plants: relationships with small RNAs and histone modifications, and functions for transposon inactivation. (Review) <i>Plant and Cell Physiology</i> , (2012) 53 , 766–784. *Corresponding author. |
| 3. |
| 4. |
| 5. |

(2) 特許出願

該当項目無し

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

国際学会発表

1. “A novel positive regulator for heterochromatin gene expression acting downstream of DNA methylation”, T. Nishimura, A. Yamamoto, L. Broger, G. Theiler, M. Kaufmann, Y. Tomita, K. S. Takeda, T. Tsukahara, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, J. Paszkowski, Cold Spring Harbor Asia Conferences –Plant Epigenetics, Stress and Evolution–, Suzhou (China), (2012.10). Oral presentation.

国内学会シンポジウム等の招待講演

1. 「DNA メチル化の下流で働くエピジェネティック因子」, 西村泰介, 阿蘇フロンティアサミット –植物の形作りの明日を語る–, 熊本, 2011.8
2. “The epigenetic factors acting downstream of DNA methylation in *Arabidopsis*”, T. Nishimura, L. Broger, A. Yamamoto, M. Kaufmann, Y. Tomita, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, J. Paszkowski, 第 54 回日本植物生理学会年会シンポジウム “Response to environmental/developmental signals and regulation of epigenetic state of chromatin”, 京都, 2012.3
3. 「エピジェネティクス解析手法—いくつかの具体例とともに—」, 西村泰介, 第 44 回種生物学シンポジウム, 奥滋賀, 2012.12

国内学会発表

1. 「シロイヌナズナ突然変異体を用いた DNA メチル化の下流で働く因子の解析」, 西村泰介, Larissa Broger, 山本章子, 山口勝司, 重信秀治, Jerzy Paszkowski, 第 5 回日本エピジェネティクス研究会年会, 熊本, (2011.5) ポスター発表。
2. 「新規エピジェネティック因子 SMOM3 はヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する」, 西村泰介, 山本章子, Larissa Broger, 山口勝司, 重信秀治, Gregory Theiler, Markus Kaufmann, 加藤悦子, 富田洋子, 武田真, 服部束穂, Jerzy Paszkowski, 第 55 回日本植物生理学会年会, 岡山, (2013.3) 口頭発表。
3. 「シロイヌナズナ SMOM3 はヘテロクロマチン遺伝子の発現を正に制御する」, 西村泰介, 山本章子, Larissa Broger, 山口勝司, 末武勲, 三島優一, 加藤悦子, 田嶋正二, 重信秀治, Jerzy Paszkowski, 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会, 奈良, (2013.5) ポスター発表。

研 究 報 告 書

「腸内共生系におけるエピジェネティックな免疫修飾」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研 究 者: 長谷 耕二

1. 研究のねらい

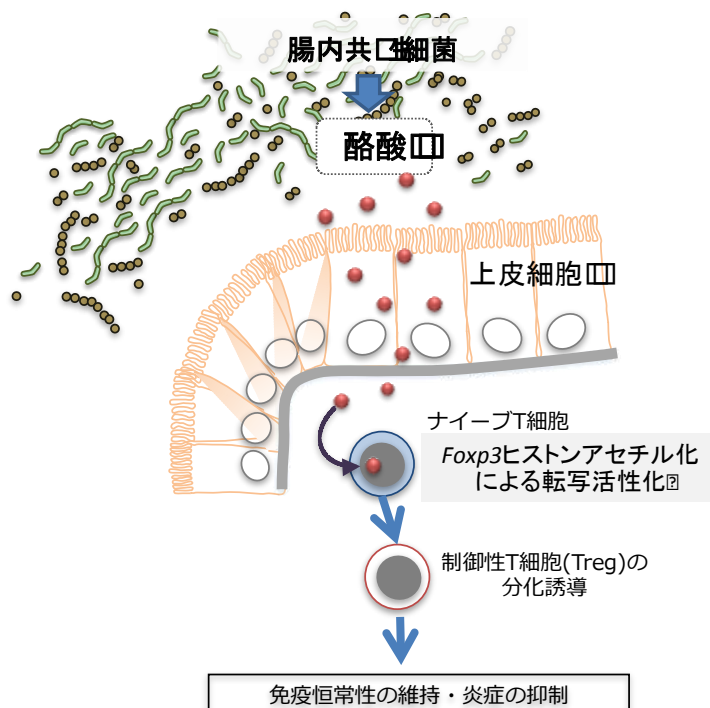
近年、免疫系の成立や維持においてエピジェネティクス制御が必須な役割を果たすことが明らかになりつつある。こうした免疫担当細胞におけるエピゲノム状態はサイトカインや外部環境因子の影響を受けて変化することが予想されるが、その実態については不明な点が多い。生体内で最大の免疫器官である腸管の内腔には、約 100 兆個もの常在菌が棲息している。腸内細菌は、宿主の消化酵素では分解できない食物繊維などを微生物発酵(腸内発酵)により分解し、終末代謝産物として様々な低分子化合物を産生している。こうした代謝産物の中には、エピゲノム修飾作用を有する化合物が含まれている。腸内細菌の定着は免疫系の司令塔であるヘルパーT細胞の分化を調節し、腸管免疫系の成熟を促すことも知られている。例えば、クロストリジウム目に属する細菌群は、炎症やアレルギー応答の抑制に重要な役割を果たす制御性T細胞の分化を促進するが、この際に腸内発酵が活性化し代謝産物が豊富に産生される。こうした事実から、本研究では「腸内共生細菌は、発酵代謝産物の作用により宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで、免疫担当細胞の分化を制御し、結果的に免疫系のホメオスタシス維持に寄与している」との仮説を立て、その検証を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

のヒト患者の腸内では、酪酸を作る腸内細菌が少ないことが知られている。今回の発見は、腸内細菌が作る酪酸には炎症性腸疾患の発症を防ぐ役割があることを示しており、病態の解明や新たな治療法の開発に役立つものと期待できる。

(T_H1 , T_H2 および T_H17)細胞の数には変化が認められなかった。大腸 Treg は腸内細菌に対する過剰な免疫応答を抑制し、大腸炎の発症を防止する役割を担っている。そこで酪酸が大腸炎の発症を弱めることができるどうかを検討した。CD45RB^{hi} ナイーブ T 細胞を Rag1 欠損マウスに移入する実験的大腸炎モデルにおいて、酪酸化スターチ摂取群では対照群に比べて大腸炎の病態スコアが改善した。この際に大腸粘膜の Treg を除去すると酪酸の抗炎症作用は消失したことから、酪酸は Treg を誘導することで大腸炎の発症を抑制することが明らかとなった。以上の結果から、腸内細菌によって産生される酪酸は、ヘルパーT細胞のエピゲノム修飾状態を変化させることで、制御性T細胞を分化誘導し、腸管の免疫恒常性維持に貢献していることを明らかとした(下図)。



3. 今後の展開

クローン病や潰瘍性大腸炎など炎症性腸疾患のヒト患者の腸内では、腸内細菌の組成が変化することが知られているが、特に酪酸を産生する腸内細菌の減少が報告されているが、その病理学的意義については分かっていなかった。今回の研究により、酪酸の産生や利用能の低下は大腸 Treg の減少を招き、炎症性腸疾患の病態形成に関わる可能性が示唆された。よって今回の発見は、炎症性腸疾患の病態の解明や新たな治療法に役立つことが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

本研究では、腸内細菌は、宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで、免疫担当細胞の分化を制御し、結果的に免疫系のホメオスタシス維持に寄与していることを証

明することができた。本成果は、これまで主に現象論として観察された、腸内細菌と宿主の相互作用に関して新たなパラダイムの構築に繋がるものである。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

マウスおよびヒト腸内細菌の代謝産物である酪酸は、*Foxp3* 遺伝子のヒストンアセチル化を促進することで制御性 T 細胞の分化を促すことを明らかにした。さらに実験的大腸炎モデルを用いて、酪酸摂取により制御性 T 細胞が増え、大腸炎の炎症が改善されることを示した。

このことは代謝産物の酪酸が宿主側の遺伝子発現をエピジェネティックに調節することで、T 細胞の制御性 T 細胞への分化誘導を行い、その結果炎症性腸疾患の発症を防ぐ役割があることを示している。なお、制御性 T 細胞増殖と DNA メチル化関連については今後より包括的な研究を期待する。今回の発見は、環境因子によるエピゲノム修飾に関する新たなパラダイムの形成につながるものであり、ヒト炎症性腸疾患の病態解明、診断マーカーとしての応用、あるいは治療法の開発にも役立つことが期待される。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. #Furusawa Y, #Obata Y, **Fukuda S, Endo TA, Nakato G, Takahashi D, Nakanishi Y, Uetake C, Kato K, Kato T, Takahashi M, Fukuda NR, Murakami M, Miyauchi E, Hino S, Atarashi K, Onawa S, Fujimura Y, Lockett T, Clarke JM, Topping DL, Tomita M, Hori S, Ohara O, Morita T, Koseki H, Kikuchi J, Honda K, #*Hase K & *Ohno H. Commensal microbe-derived butyrate induces colonic regulatory T cells. **Nature**, 2013, online publication on Nov13th.
(#First equal contribution, *Corresponding author)

Kumar N, Sato M, Katsuno T, Yokosuka O, Toyooka K, Nakai K, Sakamoto A, Kitahara Y, Jinnohara T, McSorley SJ, *Kaisho T, *Williams IR and *Ohno H, The Ets Transcription factor Spi-B is essential for the differentiation of intestinal microfold (M) Cells. **Nat. Immunol.** 13: 729–736, 2012.

研究報告書

「セントロメアを規定する新規エピジェネティックマーカーの探索と同一化」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 堀 哲也

1. 研究のねらい

生物が正確な染色体分配を遂行するためには、微小管が結合する染色体の特殊構造であるセントロメアが重要な働きを担う。セントロメアがゲノム上のどこにどのように形成されるのかについて解明することは、基礎生物学の基本命題の一つである。高等動物ではこれまで、16 種類の CCAN と呼ばれるセントロメアタンパク質群が、我々の研究室を含めた内外のグループから報告され、これらが協調してセントロメア構築に関与すると考えられている。しかし、何を目印にして、これらセントロメアタンパク質がセントロメア領域へ集合しているのかについては、未だ不明な点が多い。多くの生物種のセントロメア領域を対象として、ゲノム DNA 配列が解析された結果、多くの生物においてタンデムな反復 DNA 配列が存在することが報告されている。しかし、反復配列自身は生物間で保存性がないことが分かっている。また、本来セントロメアでない領域が、何らかの活性化を受けてセントロメア化する現象(ネオセントロメア現象)も知られている。ネオセントロメアの DNA 情報からは、特異的な配列が見いだされていないことから、セントロメアは DNA の一次情報に依らないエピジェネティックな分子機構によって形成されと考えられている。これまでの内外の研究から、セントロメアに特異的に存在するヒストンバリエントである CENP-A が有力なエピジェネティックマーカーの一つであると考えられている。ところが、CENP-A の存在だけではセントロメアに特異的なクロマチンを形成することができないため、他のエピジェネティックマーカーの存在が示唆される。本研究では、セントロメアを規定する目印(エピジェネティックマーカー)を同定し、セントロメアを規定するために必要なクロマチン構造の実体を明らかにすることを目標とする。新規エピジェネティックマーカーの発見は、本研究分野のブレークスルーになると考えている。さらに、本研究の成果を基礎に、将来的には抗がん剤などの新規薬剤開発研究に応用できる可能性があり、医科学的な視点からも重要な課題であると考えられる。また、試験管内で人工セントロメアを再構成する技術開発への応用も期待される。このような新技術は、iPS 細胞の作成等には欠かせない「安全で安定した遺伝子デリバリーシステムの開発」にもつながると考えられ、社会に対する波及効果も極めて高いと考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、セントロメアを規定する新規エピジェネティックマーカーの同定と、セントロメアのクロマチン構造の実体を明らかにすることを目標に、テーマ A,B,C を軸に研究を遂行した。その結果、セントロメア形成と機能獲得の仕組みの一端が明らかになった。

研究テーマ A) 「ネオセントロメアの誘導とセントロメア形成メカニズムの解明」

ニワトリ DT40 細胞を利用したセントロメアを除去するシステムを改変し、実験的にネオセントロメアを誘導し、取得することに成功した。取得したネオセントロメアは、本来のセントロメアとほぼ同等の機能を持ち、安定に維持されることが分かった。また、ネオセントロメアは DNA 配列に依存しないメカニズムで形成されと考えられた。さらに、ネオセントロメア細胞を用いた ChIP-Seq 解析により、セントロメア形成に依存して出現する数種のヒストン修飾を新たに見いだした。これらヒストン修飾がセントロメアを規定するエピジェネティックマークとして、動原体の構築過程で機能する可能性が示唆され、これらの知見は将来的に抗がん剤などの新規薬剤開発研究に応用できると期待される。

研究テーマ B)「人工セントロメアの誘導とセントロメアタンパク質の役割の解明」

(A)のシステムを改変して、本来のセントロメア除去した染色体上に各種セントロメア関連タンパク質を異所局在させ、人工セントロメアを任意の場所に誘導できるシステムを構築した。このシステムにより、2つのタイプの人工セントロメアの誘導に成功した。この研究から、CCAN はセントロメアに特有なクロマチン構造の形成を促す機能と、微小管結合を担うアウターキネトコアの形成を促す機能を同時に持つ複合体であることが分かった。

研究テーマ C)「試験管内再構成によるセントロメアクロマチン構造の実態解明」

セントロメア DNA と直接結合する CENP-T は生化学的解析から、特有な CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体を形成することが示唆された。そこで、ヘテロ 4 量体を試験管内で再構成し、X 線結晶構造解析を行った結果、CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体はヒストン様構造を形成することが明らかとなった。さらに、CENP-T ヘテロ 4 量体は、プラスミド DNA に正のスーパーコイルを導入する活性があることを見いだした。

(2) 詳細

研究テーマ A)「ネオセントロメアの誘導とセントロメア形成メカニズムの解明」

セントロメアがどのように形成されるのかを解析するにあたって、*de novo* セントロメア形成を実験的に誘導できる系の構築は極めて有効である。自然界では、本来セントロメアではない領域がセントロメア化するネオセントロメア現象が報告されている。この現象のメカニズムは不明だが、おそらく染色体の再編によるセントロメアの欠損がトリガーとなっていると考えられている。これまで、我々の研究グループは、ニワトリ DT40 細胞を用いた染色体工学技術により、特定の染色体からセントロメアを除去するシステムを構築していた。そこで、このセントロメアを除去するシステムを利用し、さらに 2 種の薬剤選択マーカーを導入することにより、セントロメアを失った細胞集団から生存細胞(サバイバー)の取得を試みた。セントロメアの除去を行なうと、大部分の細胞は染色体分配異常を起こし致死となるが、約 30 万細胞に 1 細胞の確率でサバイバーを取得することに成功した。得られたサバイバーの内、93% の細胞でネオセントロ

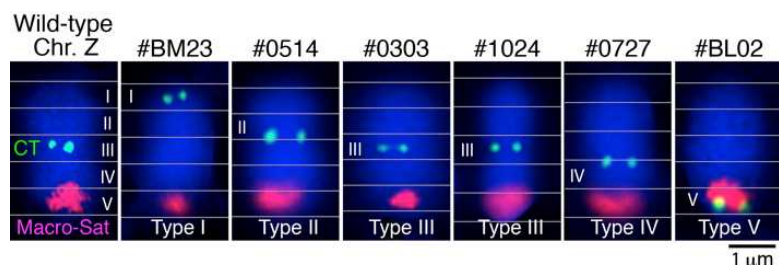


図 1、ニワトリ Z 染色体上に誘導されたネオセントロメア

CT: セントロメアタンパク質 CENP-T、Macro-Sat: Z 染色体サテライトリピート配列

メアの形成が確認され(図 1)、約 7%の細胞で他の染色体とのテロメア融合が確認された。高等動物細胞を用いて、実験的にネオセントロメアを誘導した報告はこれまで無く、本研究によりネオセントロメアを誘導する技術を世界に先駆け開発することに成功した。取得したネオセントロメアは、本来のセントロメアとほぼ同等の機能を持ち、安定に維持されることが分かった。また、ネオセントロメアが形成された DNA 配列を調べたところ、少なくとも GC 含量、反復配列あるいはトランスポゾン等の存在比率について共通した有為な特徴は見いだされておらず、「ネオセントロメアは DNA 配列に依存しないメカニズムで形成された」、と考えられた。これらの結果は、現在、提唱されている「セントロメアは DNA の一次情報に依らないエピジェネティックな分子機構によって形成される」というモデルを支持する結果であった(Shang, Hori, et al. Dev. Cell, 2013)。さらに、ネオセントロメア細胞を用いた ChIP-Seq 解析により、セントロメア形成に依存して出現する数種のヒストン修飾を新たに見いだした(未発表)。これらヒストン修飾がセントロメアを規定するエピジェネティックマークとして動原体の構築過程で機能する可能性が示唆され、これら知見は将来的に抗がん剤などの新規薬剤開発研究に応用できると期待される。

研究テーマ B) 「人工セントロメアの誘導とセントロメアタンパク質の役割の解明」

(A)で構築したネオセントロメア誘導システムをさらに改変して、本来のセントロメアを取り除いた染色体上に、各種セントロメア関連タンパク質を異所局在させ、人工セントロメアを任意の場所に誘導できるシステムを構築した(図 2)。異所局在は、Z 染色体の短腕側の非セントロメア領域に約 10kb の LacO リピート配列を導入し、その LacO 配列上へ LacI 融合型タンパク質を特異的に結合させる手法を用いた。

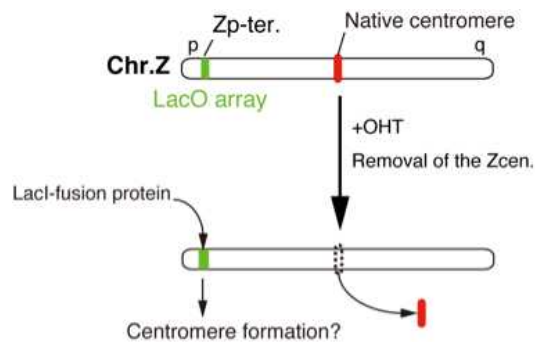


図 2、異所局在によるセントロメア形成の誘導

この異所局在システムを用いて、各種セントロメア構成タンパク質を異所局在させセントロメアの誘導を試みたところ、複数の人工セントロメアの誘導に成功した。人工セントロメアを保有する細胞株は、いずれも安定に増殖したが、興味深いことに、これらは 2 種の異なるタイプの人工セントロメアへ分類できることが分かった。1つ目のタイプは、CENP-A シャペロンである HJURP や、CENP-I、CENP-C あるいは CENP-C の C 末(721-864aa)により誘導されたセントロメアであり、いずれも CENP-A および恒常的セントロメアタンパク質群(CCAN)を全て含む完全なセントロメアであった(図 3)。HJURP、CENP-I、CENP-C により、CENP-A の取り込みが誘導され、その後幾つかのステップを経た後に完全なセントロメア

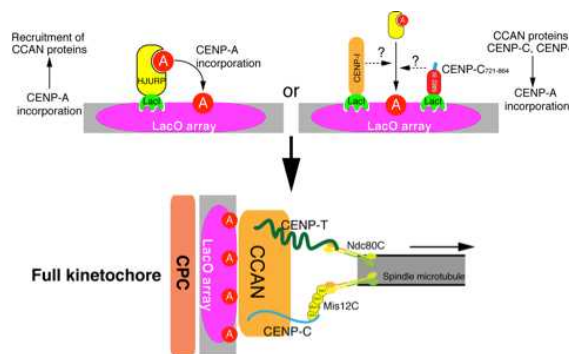


図 3、異所局在によるセントロメア形成モデル (A)

が形成されたと推察している。一方、CENP-T の N 末 (1-530aa) および CENP-C の N 末 (1-643aa) からは、全く異なるタイプの人工セントロメアが誘導された (図 4)。この 2 番目のタイプの人工セントロメアは、通常のセントロメア形成に必須な CENP-A および CCAN が全く存在しないアウターキネトコアのみのセントロメアであることが明らかとなった (Hori, et al., J. Cell Biol., 2013)。さらに構造解析の結果も合わせ、

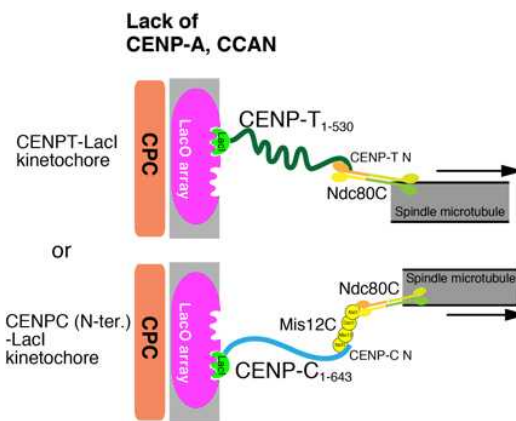


図4、異所局在によるセントロメア形成モデル (B)

CENP-T の N 末および CENP-C の N 末は、アウターキネトコア形成の基盤となり、セントロメアに特有なクロマチン構造形成をバイパスしてセントロメア機能を獲得できるドメインであることを明らかにした (Gascoigne, et al., Cell, 2011; Hori, et al., J. Cell Biol., 2013; Nishino, et al., EMBO J., 2013)。以上の解析から、CCAN はセントロメアに特有なクロマチン構造の形成を促す機能と、微小管結合を担うアウターキネトコアの形成を促す機能を同時に持つ複合体であると考えられた (Hori, et al., J. Cell Biol., 2013)。これまでのところ、HJURP、CENP-I、CENP-C により完全なセントロメアが誘導されるメカニズムは不明だが、その分子レベルの仕組みの解明はセントロメアクロマチン形成を理解する上で重要な糸口になると考えており、今後の重要な研究課題である。

研究テーマ C) 「試験管内再構成によるセントロメアクロマチン構造の実態解明」

これまで我々の研究グループは、セントロメアを構成する複数のタンパク質を同定し、遺伝学的および生化学的な機能解析を行ってきた。その過程でセントロメア DNA と直接結合する CENP-T 複合体の同定に成功していた (Hori, et al., Cell, 2008)。まず、CENP-T 複合体の全構成因子を明らかにするために、共免疫沈降実験によりニワトリ DT40 細胞から CENP-T 複合体を精製し、高感度質量分析およびゲル濾過解析を行なった。その結果、CENP-T はセントロメアタンパク質 CENP-W、-S、-X とともに特有な CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体を形成することが示唆された。そこで、試験管内で CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体を再構成し、X 線結晶構造解析を行った。この解析の結果、CENP-T-W-S-X ヘテロ 4 量体はヒストン様構造を形成することが明らかとなった (Nishino, et al., Cell, 2012)。また、生化学的解析から、約 100bp の DNA と結合することも明らかにした (Nishino, et al., Cell, 2012)。次に、リコンビナント CENP-T ヘテロ 4 量体を利用して、DNA との結合様式の解析を DNA スーパーコイルアッセイにより行った。その結果、CENP-T ヘテロ 4 量体は正のスーパーコイルをプラスミド DNA に導入する活性があることを見いだした。通常、一般的なヒストン 8 量体は、プラスミド DNA 上にヌクレオソームを形成し、負のスーパーコイルを導入することが知られている。この DNA スーパーコイルアッセイから、CENP-T ヘテロ 4 量体は一般的なヒストンとは異なった様式で DNA と結合することが明らかとなり、現在、この特有な DNA との結合様式がセントロメア特異的なクロマチン構築へ関与している可能性を想定している (Takeuchi, et al., Nuc. Acids Res., 2014)。

3. 今後の展開

研究テーマ A)

セントロメア領域のヒストン修飾に関しては、各種モデル生物を利用した実験系により幾つかの報告がなされているが、高度に反復したDNA配列の存在のため、セントロメアが構築される領域の詳細な解析例は少ない。本さがけ研究で取得することに成功したニワトリのネオセントロメアを保有する細胞株は、セントロメア特有なヒストン修飾の解析を行なうことのできる優れた系である。そこで、各種ヒストン修飾抗体を利用して、今後、網羅的にChIP-Seq解析を行ない、セントロメア形成と関連するヒストン修飾を同定する計画である。既に、セントロメア形成に依存して修飾が入るヒストン修飾が数種見いだされており、この研究手法の有効性は確認済みである。同定したヒストン修飾について、セントロメアクロマチン構築およびセントロメア形成への関与を中心に解析を進め、その生物学的意義の解明を目指す。

研究テーマ B)

各種セントロメア関連タンパク質を異所局在させることで、複数種の人工セントロメアを作出することに成功した。しかし、HJURPや、CENP-I、CENP-Cによって、どのようにCENP-AおよびCCANを全て含む完全なセントロメアの誘導に至るのか詳細は未だ不明である。HJURPは、CENP-Aシャペロンであることから、CENP-Aをクロマチンに導入することにより、セントロメアクロマチン形成の初期過程に働く重要な因子であると考えられている。一方、CENP-C、CENP-Iは、CENP-Aを含むセントロメアクロマチンに集合する下流の因子であると考えられており、本実験によりセントロメアが誘導された事実は、極めて興味深い結果である。今後、CENP-C、CENP-Iと相互作用する因子の探索および各々の部分ペプチドを利用したセントロメア誘導活性の検定実験を行なう計画である。上記計画により機能ドメインを見いだした後、HJURPとの相互作用も含めた機能の関連性についても解析を進め、セントロメアクロマチン形成の仕組みを分子レベルで解明することを目指す。

研究テーマ C)

これまでの研究から「セントロメアには、CENP-AヌクレオソームとCENP-T複合体が結合するH3クロマチンとで構成される特有なクロマチン構造が存在している」というモデルを想定している。生化学的実験により細胞から精製したCENP-Aを含むポリヌクレオソームには、H3タイプのヌクレオソームが一定の割合で含まれることを既に確認しており、上記モデルに矛盾しない。また研究テーマ(A)により、セントロメア形成と関連するヒストン修飾も見いだしている。そこで、試験管内における生化学的解析を行うことを目指し、各種ヒストンバリエーション、および修飾ヒストンを含むヌクレオソームの再構成を行なう。さらに、これらヌクレオソームを用いて、試験管内ライゲーション反応により様々な種類のポリヌクレオソームの作製にも挑戦する。セントロメアDNAに直接結合するCENP-T複合体を含むセントロメアクロマチンの実態解明を目指し、上記の各種再構成ヌクレオソームと、CENP-Tヘテロ4量体および各種セントロメアタンパク質との相互作用ならびに構造解析を中心に研究を展開する計画である。

4. 評価

(1) 自己評価

これまで研究の対象となってきたモデル生物種の多くは、セントロメア領域が巨大なサテライト型反復 DNA 配列で構成されていることから、セントロメアが構築される領域のクロマチン構造等の詳細な解析は極めて困難であった。本さがけ研究において、独自に発見した反復配列を持たないニワトリのセントロメア領域を対象として、染色体工学技術によりネオセントロメアを培養細胞内で誘導する実験系の開発に成功した(Shang, Hori et al., Dev. Cell, 2013)。この手法で取得したネオセントロメアを保持する細胞株を利用して、セントロメアを規定するエピジェネティックマークの候補と考えられる複数のヒストン修飾の同定に至った。この発見は、将来的に抗がん剤などの新規薬剤開発研究への応用も期待されることから、染色体研究分野のみならず、医科学的な視点からも注目を受ける成果であると言える。また、染色体の任意の場所に人工セントロメアを作出する技術の開発にも成功し(Hori, et al., J.Cell Biol., 2013)、セントロメア形成と機能獲得の仕組みの一端を明らかにして、染色体分配メカニズムの理解に大きく貢献した。本研究成果は、将来的に試験管内で人工セントロメアを再構成する技術開発への応用も期待される。さらに、iPS 細胞の作成等に欠かせない「安全で安定した遺伝子デリバリーシステムの開発」にも貢献すると思われることから、社会に対する波及効果は高いと考えられる。以上のことから、当初計画した研究目標に照らして、本さがけ研究において期待した成果が得られたといえる。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ニワトリ DT40 細胞を用い、染色体工学技術を利用してネオセントロメアを誘導する技術を確認した。一つは、セントロメアを人為的に欠損させた細胞集団からネオセントロメア細胞を得る方法である。この手法で得たネオセントロメアの解析から、セントロメアの形成は、DNA 配列に依存しない特有なエピジェネティックなメカニズムで制御される可能性を示した。一方、これと並行してセントロメア構成タンパク質を異所局在させることで、人工的に任意の場所にセントロメアを誘導できるシステムの構築にも成功した。また、試験管内再構成によりセントロメアクロマチン構造の解明も試みた。

高等動物を用いた系で、ネオセントロメアを誘導する染色体工学技術を世界にさがけ開発することに成功し、いままで謎に包まれていた染色体のセントロメアの解明が一挙に進むことが期待される。今後セントロメア領域特異的ヒストン修飾のセントロメア形成及び維持における役割、CENP-A がエピジェネティックマークとしてセントロメア形成・維持において重要な役割をもつ点など、セントロメアを規定し、活性なセントロメアを形成する仕組みの解明に向け、さらに研究を深めることを期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

研究テーマA

1. Shang W.H., Hori T. (同等筆頭著者), Martins N.M., Toyoda A., Misu S., Monma N., Hiratani I.,

Maeshima K., Ikeo K., Fujiyama A., Kimura H., Earnshaw W.C., Fukagawa T., "Chromosome Engineering Allows the Efficient Isolation of Vertebrate Neocentromeres." *Developmental Cell* (2013) **24**, 635–648.

研究テーマB

1. Hori T., Shang W.H., Takeuchi K., Fukagawa T., "The CCAN recruits CENP-A to the centromere and forms the structural core for kinetochore assembly." *The Journal of Cell Biology* (2013) **200**, 45–60.
2. Hori T., Fukagawa T., "Establishment of the vertebrate kinetochores." *Chromosome Research* (2012) **20**, 547–561.
3. Gascoigne K.E., Takeuchi K., Suzuki A., Hori T., Fukagawa T., Cheeseman I.M., "Induced ectopic kinetochore assembly bypasses the requirement for CENP-A nucleosomes." *Cell* (2011) **145**, 410–422.
4. Suzuki A., Hori T., Nishino T., Usukura J., Miyagi A., Morikawa K., Fukagawa T., "Spindle microtubules generate tension-dependent changes in the distribution of inner kinetochore proteins." *The Journal of Cell Biology* (2011) **193**, 125–140.
5. Schmidt J.C., Kiyomitsu T., Hori T., Backer C.B., Fukagawa T., Cheeseman I.M., "Aurora B kinase controls the targeting of the Astrin-SKAP complex to bioriented kinetochores." *The Journal of Cell Biology* (2010) **191**, 269–280.

研究テーマC

1. Takeuchi K., Nishino T., Mayanagi K., Horikoshi N., Osakabe A., Tachiwana H., Hori T., Kurumizaka H., Fukagawa T., "The centromeric nucleosome-like CENP-T-W-S-X complex induces positive supercoils into DNA." *Nucleic Acids Research* (2014) **42**, 1644–1655.
2. Osakabe A., Tachiwana H., Takaku M., Hori T., Obuse C., Kimura H., Fukagawa T., Kurumizaka H., "Vertebrate Spt2 is a novel nucleolar histone chaperone that assists in ribosomal DNA transcription." *Journal of Cell Science* (2013) **126**, 1323–1332.
3. Nishino T., Rago F., Hori T., Tomii K., Cheeseman I.M., Fukagawa T., "CENP-T provides a structural platform for outer kinetochore assembly." *The EMBO Journal* (2013) **32**, 424–436.
4. Nishino T., Takeuchi K., Gascoigne K.E., Suzuki A., Hori T., Oyama T., Morikawa K., Cheeseman I.M., Fukagawa T., "CENP-T-W-S-X forms a unique centromeric chromatin structure with a histone-like fold." *Cell* (2012) **148**, 487–501.
5. Ohfuchi Maruyama E., Hori T., Tanabe H., Kitamura H., Matsuda R., Tone S., Hozak P., Habermann F.A., Hase Jv., Cremer C., Fukagawa T., Harata M., "The actin family member Arp6 and the histone variant H2A.Z are required for spatial positioning of chromatin in chicken cell nuclei." *Journal of Cell Science* (2012) **125**, 3739–3743.

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

1. Hori, T. “The size of centromere is controlled by coordination of centromere proteins” **ASCB Annual Meeting**, New Orleans (USA), 2013, 12/14～18.
2. 堀 哲也 “人工動原体の作出からあきらかになるセントロメアの形成メカニズム” 第 35 回日本分子生物学会年会, 福岡市, 2012, 12/11～14. (口頭発表)
3. Hori, T. “Ectopic Localization of CCAN proteins induces centromere formation in vertebrate cells” **EMBO Workshop**, Barcelona (Spain), 2012, 10/1～5.
4. Hori, T. “Ectopic localization of CCAN proteins induces centromere formation in vertebrate cells” 第 34 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 2011, 12/13～16. (口頭発表)
5. Hori, T. “Unique Feature of Chicken Centromere DNA and Engineering of Centromere Using DT40 Cells” **50th ASCB Annual Meeting**, Philadelphia (USA), 2010, 12/11～15.

プレスリリース

1. 染色体工学の新たな幕開け！ 高等動物のセントロメア作製に成功(2013 年 3 月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/1170/1200.html>)
2. キネトコアに存在する新規のヒストン様構造(2012 年 2 月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/992/999.html>)

国立遺伝学研究所 研究成果

1. CENP-T はリン酸化依存的に外部動原体に結合する(2013 年 1 月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/1170/1178.html>)
2. 人工動原体を安定に保持する細胞の作出(2012 年 12 月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/992/1156.html>)
3. 人工的に動原体をつくる(2011 年 4 月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/986/227.html>)
4. 微小管からの張力によって動原体が伸びる(2011 年 4 月)
(<http://www.nig.ac.jp/Research-Highlights/986/131.html>)

研 究 報 告 書

「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研 究 者: 山口 雄輝

1. 研究のねらい

ヒストンの翻訳後修飾の機能的意義を厳密に証明するには、修飾酵素の逆遺伝学的解析だけでなく、ヒストン自体の逆遺伝学的解析も行う必要がある。しかし、高等真核生物でヒストン遺伝子はマルチジーン化しており、通常のノックアウトやノックダウン法では発現抑制が困難であるため、そうした試みはこれまでほとんど行われてこなかった。(なお、ここで言うヒストンは、H1～H4 までのカノニカルヒストンであり、特殊化した機能をもつバリエーションヒストンは含まない。)私はこれら一群の内在ヒストン遺伝子の発現を一挙に抑制し、外来の変異型ヒストンによって「置き換える」新たな方法を立案した。そこで、計画を実行に移して、ヒストンの逆遺伝学的解析系を確立することを本研究の第一の目標とする。さらに研究の進み具合に応じて、確立された実験系を利用してヒストンのいくつかの修飾残基の点変異体を導入した細胞株を樹立し、それらの機能解析を実施する。

また、ヒストン H2B モノユビキチン化→H3K4 メチル化の所謂 trans-tail 制御についても平行して解析を行う。出芽酵母においては、H2B のモノユビキチン化を阻害すると H3K4 のメチル化が完全に阻害されることが示されている。つまり 2 つの翻訳後修飾の間には厳密な依存性が存在しており、trans-tail 制御の代表例として知られている。しかし私は以前、HeLa 細胞において、このような trans-tail 制御が成り立っていないことを見出した (Chen et al. Genes Dev. 2009)。そうであるならば、ほ乳動物細胞で H2B のモノユビキチン化はどのような役割を果たしているのだろうか。こうした問題意識から、ヒストンの逆遺伝学的解析を行う系を考案した。逆遺伝学的解析の実験系が確立されるまでの間、従来法によって H2B モノユビキチン化の機能解析を行ない、実験系が確立されたら、H2B の K120A 変異体を用いて逆遺伝学的解析を行う。

2. 研究成果

(1) 概要

1000字未満で記載してください。

メインテーマの「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」では、ヒストン mRNA に特異的な 3' プロセシング装置の 1 つである U7 snRNA を標的とすることで、すべてのカノニカルヒストンの発現を一挙にノックダウンして、外来ヒストンで相補することを目指した。まず transient transfection のレポーターアッセイ系で、提案した戦略の実現可能性を検討した。化学修飾したアンチセンスオリゴを用いて U7 snRNA の発現を効率よく抑制することができ、そのとき新規に合成されるヒストンのタンパク質量は予想どおり激減した。レスキュー用の外来ヒストンについては、U7 snRNA が結合する 3' エlement に変異を導入したヒストンの発現コンストラクトを作製した。これを、相補的な変異を持たせた U7 snRNA の発現コンストラクトと

共に cotransfection したところ、外来ヒストンタンパク質の発現を確認できた。以上の結果から、提案した戦略に実現可能性が十分あることが示唆された。

これらの結果を踏まえて次に、安定なノックダウンレスキュー系の確立を目指した。U7 snRNA の働きを安定的に阻害するのに shRNA は使えなかったため、代わりに zinc finger nuclease を用いて、U7 snRNA 遺伝子座への conditional allele のノックインを進めた。一方、外来ヒストン H1~H4 は内在ヒストンに匹敵するレベルで安定的に発現させる必要がある。当初、ヒストン遺伝子の native な配列をなるべく残した発現コンストラクトを用いたが、十分な発現量を得ることができなかったので、様々なコンストラクトを比較検討した。発現量が最も良かったヒストンの発現コンストラクトを用いて、目的とする細胞株の樹立を進めている。

サブテーマの「哺乳類細胞における H2B モノユビキチン化の機能的役割の解析」では、モノユビキチン化型 H2B (H2Bub) に特異的に結合する因子を SILAC 法により網羅解析した。その結果、Pol II、DSIF、NELF、Integrator、SWI/SNF といった既知の転写・プロセッシング関連タンパク質が見つかった。そのうちの一つである Integrator は snRNA の 3' 末端プロセッシングを担う因子なので、これらの因子の snRNA 遺伝子上での働きを注目した。ノックダウン ChIP 解析の結果、H2Bub は Integrator を snRNA 遺伝子上にリクルートする働きを持っていることが示唆された。一方、NELF は Integrator とは独立のメカニズムで snRNA のプロセッシングを促進していることが示唆された。まとめると、H2Bub の相互作用因子の同定をきっかけにして、H2Bub と転写伸長因子の予期しなかった役割を明らかにすることができた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発: 第一段階」

ヒストン mRNA に特異的な 3' プロセッシング装置の 1 つである U7 snRNA を標的とすることで、すべてのカノニカルヒストンの発現を一挙にノックダウンして、外来のヒストンで相補することを提案した (図 1)。この戦略は「内在 U7 snRNA を消して、内在ヒストンを間接的にノックダウンすること」と「レスキュー用の外来ヒストンを内在ヒストンと同レベルで発現させること」の 2 つに分けられる。まず、この戦略の実現可能性について、それぞれ transient transfection のレポーターアッセイ系で調べた。

化学修飾したアンチセンスオリゴ (ASO) と shRNA の二通りの方法でヒト HeLa 細胞の U7 snRNA をノックダウンしたところ、ASO では効率よくノックダウンできたが、shRNA ではまったくできなかった。後者は、U7 snRNA のような核局在 RNA に対して shRNA がほとんど効かないという過去の報告と一致する結果である。一方、ASO を用いて U7 をノックダウンしたところ、期待したとおり、ヒストン mRNA の 3' プロセッシング異常が観察され、新規に合成されるヒストンのタンパク質量は激減した (図 2A)。

H1 (8)	H2A (18)	H2B (18)	H3 (14)	H4 (15)
H1F0	HIST1H2AA	HIST1H2BA	HIST1H3A	HIST1H4A
H1FX	HIST1H2AB	HIST1H2BB	HIST1H3B	HIST1H4B
HIST1H1A	HIST1H2AC	HIST1H2BC	HIST1H3C	HIST1H4C
HIST1H1B	HIST1H2AD	HIST1H2BD	HIST1H3D	HIST1H4D
HIST1H1C	HIST1H2AE	HIST1H2BE	HIST1H3E	HIST1H4E
HIST1H1D	HIST1H2AG	HIST1H2BF	HIST1H3F	HIST1H4F
HIST1H1E	HIST1H2AH	HIST1H2BG	HIST1H3G	HIST1H4G
HIST1H1T	HIST1H2AI	HIST1H2BH	HIST1H3H	HIST1H4H
	HIST1H2AJ	HIST1H2BI	HIST1H3I	HIST1H4I
	HIST1H2AK	HIST1H2BJ	HIST1H3J	HIST1H4J
	HIST1H2AL	HIST1H2BK	HIST2H3A	HIST1H4K
	HIST1H2AM	HIST1H2BL	HIST2H3C	HIST1H4L
	HIST2H2AA3	HIST1H2BM	HIST2H3D	HIST2H4A
	HIST2H2AA4	HIST1H2BN	HIST3H3	HIST2H4B
	HIST2H2AB	HIST1H2BO		HIST4H4
	HIST2H2AC	HIST3H2BB		
	HIST3H2A	HIST2H2BE		
	H2AFJ	HIST2H2BF		

図 1. ヒトカノニカルヒストン遺伝子群

一方、レスキュー用の外来ヒストンの発現に関しては当初、native の配列をなるべくそのまま利用しようと考えた。カノニカルヒストンは S 期特異的に大量発現して（細胞周期 1 回あたり 10^7 分子のオーダー）、新規合成 DNA 鎖上に配置される必要があり、この要請を満たすためにヒストン遺伝子固有の 3' プロセシング機構が生まれたと考えられるからである。そこで、異なるエピトープタグを C 末端側に付加した H1～H4（H1-GluGlu, H2A-VSV,

H2B-V5, H3-Flag, H4-Etag）を、各ヒストンの native プロモーターならびに 3' エLEMENTと連結した発現コンストラクトを作製した。ヒストンの 3' ELEMENTと U7 snRNA が相補的な塩基対を形成することで、ヒストン特異的な 3' プロセシングが進行すると考えられたので、その部分の配列を改変した所謂 altered specificity mutant pair を作製し、それが期待どおりに動くことを確認した。例えば、U7 snRNA(mt2) と H3-Flag(mt2) を cotransfection したときのみ H3-Flag タンパク質が発現することが分かった（図 2B）。

以上の結果から、transient transfection 系では各要素が期待どおりに動くことが分かり、提案した戦略が十分に実現可能なものであることが示唆された。一方、U7 snRNA に shRNA が効かなかったことから、内在 U7 snRNA の働きを安定的に阻害するには他の手法を用いる必要があることが分かった。

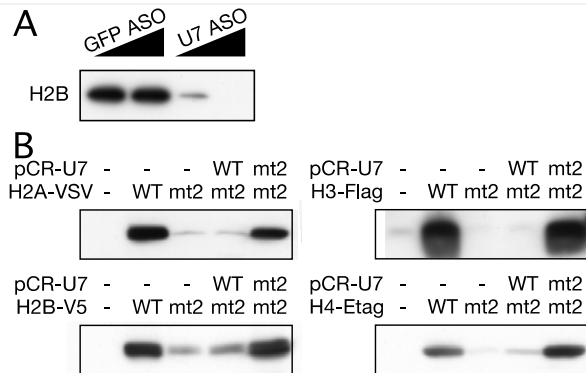


図 2. transient transfection によるヒストンのノックダウン (A) とレスキュー (B) の検討

研究テーマ B 「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発: 第二段階」

先の結果を受けて、U7 snRNA の機能阻害には、最近普及しつつあるゲノムエンジニアリング法の 1 つである zinc finger nuclease (ZFN) を用いることにした。U7 snRNA 遺伝子は生存に必須と予想されるので、conditional allele のノックインをヒト 293 細胞で目指した。ZFN によって誘導される DNA 二本鎖切断と非相同性末端修復によるフレームシフト変異については容易に確認できたが、ノックインはなかなか成功しなかった。transfection 条件等の最適化を経て、効率は未だ低いものの、片アリの改変には成功した。現在、残るアリの改変を進めている。

レスキュー用外来ヒストンの安定的発現については、上述した「native の配列をなるべく活かしたタグ付きヒストン発現コンストラクト」を利用して、これを内在ヒストンと同様に H1～H4 をそれぞれ 10～20 コピー導入すれば、十分な発現量を確保できると考え、そのような細胞株を樹立した。しかし、この方法で得られた細胞株の外来ヒストン H1～H4 の発現レベルは、内在ヒストンの 1/100 に満たなかった。その理由は完全には明らかでないが、外来ヒストンがランダムに挿入された染色体上の位置のクロマチン状態が関係していると考えられる。ヘテロクロマチン化の影響をうけない EBV 由来のエピソーマルベクター系も試みているが、同ベクターが安定に保持できる DNA 長には制限があるようで、今のところうまくいっていない。

そこで当初の計画を変更して、プロモーターを native プロモーターから CMV プロモーターに変えたり、3' ELEMENTを native 配列からポリ(A)付加シグナルに変えた複数のコンストラクトを

作製した。transient transfection 系で発現量を比較をしたところ、CMV プロモーターとポリ(A) 付加シグナルを両方持ったコンストラクトが、オリジナルのコンストラクトよりも数十倍高い発現を与えることが分かった。ヒストン本来の発現パターンをなるべく維持した形で外来ヒストンを発現させる、という本来の狙いから逸れてしまうが、ともかく、これらのコンストラクトを用いて細胞株を取得したところ、内在ヒストンの 1/10 程度のレベルで外来ヒストン H1~H4 を安定的に発現する細胞株を樹立することができた。さらに、この細胞株において外来ヒストンがきちんとヌクレオソームに取り込まれていることが確認できた。この発現量でもまだ十分とは言えないが、内在ヒストンの発現をノックダウンしたとき、内在ヒストンと置き換わる形で外来ヒストンの発現量比が高まる可能性に期待している。

研究テーマ C 「哺乳類細胞における H2B モノユビキチン化の機能的役割の解析」

私は、出芽酵母で提唱された H2B モノユビキチン化→H3K4 メチル化の所謂 trans-tail 制御がヒトでは成り立たないことを示す結果を以前に得た。そこで私は、H2B モノユビキチン化の真の機能を明らかにすべく、モノユビキチン化型 H2B (H2Bub) に特異的に結合する因子を、SILAC 法を用いて網羅解析した (イスラエル Weizmann 研究所 Moshe Oren 先生ならびにドイツ Max Planck 研究所 Wolfgang Fischle 先生との共同研究)。H2Bub はネイティブ化学ライゲーション (NCL) 法によって調製し、これを他の組換えヒストンとともにビオチン化 DNA 上にクロマチンを形成させた。一方、light または heavy アミノ酸の存在下で培養した HeLa 細胞から核抽出液を調製し、未修飾クロマチンもしくは H2Bub 含有クロマチンを固定したビーズと混合して、ビーズに残ったタンパク質を質量分析により同定した。SILAC 解析の結果、Pol II、DSIF、NELF、Integrator、SWI/SNF といった既知の転写・プロセッシング関連タンパク質の構成サブユニットが、H2Bub 含有クロマチンと選択的に相互作用することが明らかとなった。

DSIF と NELF は転写伸長因子であり、Pol II の promoter-proximal pausing に関わっている。一方、Integrator は snRNA の 3' 末端プロセッシングを担う酵素複合体である。生化学的な解析から、確かにこれらの因子が H2Bub と相互作用することを確認した。さらに、DSIF、NELF、Integrator の間にもタンパク質間相互作用があることが分かった。

これらの因子と H2Bub の細胞内における機能的関係について snRNA 遺伝子を対象にして解析したところ、いくつか興味深い知見が得られた。まず、ユビキチンリガーゼ RNF20 をノックダウンして H2B のモノユビキチン化を阻害したところ、snRNA 遺伝子座上における Integrator の結合量が顕著に低下していることが ChIP 解析から分かった。同じ条件下で Pol II、DSIF、NELF の結合量はほとんど変化しなかったことから、H2Bub は Integrator をリクルートする働きを持つことが示唆された。一方、NELF をノックダウンしたところ、調べた限りにおいて他の因子の結合量はほとんど変化しなかったにも関わらず、snRNA のプロセッシング異常が顕著に (Integrator 自体のノックダウンに匹敵するレベルで) 誘導された。したがって、NELF は Integrator とは独立のメカニズムで snRNA のプロセッシングを促進していることが分かった。

以上のように、H2Bub の相互作用因子の同定をきっかけにして、H2Bub と転写伸長因子と RNA プロセッシング因子の snRNA 遺伝子上での役割を明らかにすることができた。

3. 今後の展開

メインテーマである「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」については、安定で高レベルの外來ヒストンの発現という点で課題が残るが、現在、目的とする細胞株の樹立に向けて取り組んでいる。U7 snRNA 遺伝子をダブルノックアウトしたときに、外來ヒストンの発現によって細胞増殖を相補できるかどうかポイントであり、それを確認した上で今後の展開を考えたい。

サブテーマである「哺乳類細胞における H2B モノユビキチン化の機能的役割の解析」については成果の一部を 2 つの論文として投稿中である。H2Bub の相互作用因子の一つが snRNA のプロセシング因子 Integrator であったため、これまで snRNA 遺伝子に対象を絞って研究してきたが、他の相互作用因子である DSIF や NELF はクラス II 遺伝子の転写開始点近傍に Pol II とともにユビキタスに結合することが知られている。そこで今後は、ゲノムワイドで DSIF、NELF、Integrator と H2Bub の関係について調べていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

メインテーマである「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」は、第一段階、すなわち実現可能性を transient transfection のレポーターアッセイ系で調べる段階まではトントン拍子に進んだが、第二段階、すなわち安定なノックダウンレスキューを行う段階で、予想しなかった複数の問題が生じ、それらを一つ一つ解決するのに予想外の長い時間を費やしてしまった。

サブテーマの「哺乳類細胞における H2B モノユビキチン化の機能的役割の解析」については、H2Bub の相互作用因子を SILAC 法によりスクリーニングしたところ、驚いたことに私自身が長年研究してきた DSIF と NELF が H2Bub の相互作用因子として見つかった。相互作用因子としてさらに、snRNA の 3' 末端プロセシングを担う Integrator 複合体が見つかったことから、その方向に研究を展開し、H2B のモノユビキチン化や NELF の予想しなかった役割を明らかにすることができた。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

ヒストン mRNA に特異的な 3' プロセシング装置の 1 つである U7 snRNA を標的とすることで、すべてのカノニカルヒストンの発現を一挙にノックダウンして、外來ヒストンで相補することをめざした。一過性のトランスフェクション実験では問題なかったが、内在性 U7 snRNA の働きを安定的に阻害する方法については構築中である。一方レスキュー用外來ヒストンの安定的発現については、発現レベルはまだ低いが発現する細胞株を樹立することができた。また、今回の課題を提案する契機になったサブテーマとして、ヒストン H2B モノユビキ

チン化の機能解析を行った。その結果ユビキチン化 H2B と選択的に相互作用する因子を複数同定した。さらに、それらの因子とユビキチン化 H2B が snRNA 遺伝子上で協働して、同遺伝子の転写とプロセッシングを制御していることを明らかにした。

メインテーマについては、内在性 U7 snRNA の働きを安定的に阻害する方法の確立、ならびに安定で高レベルの外來ヒストンの発現など努力は認めるが、多くの技術的な挑戦が残っており、まだ十分な進捗が得られたとはいえない。解決に向け様々な試行錯誤を重ねていると思うが、チャレンジングな課題として採択したので所期の目的を達成すべく引き続き努力されることを期待する。そして当初の予定通り、UbH2B の効果を逆遺伝学的解析により調べて欲しい。

5. 主な研究成果リスト

本研究課題に関連して研究者主導で得られた成果について、代表的なものを中心に各項目5つ程度を目安に記載してください。ただし、特許については、本課題の成果であれば全て記載してください。公開項目です。2014年6月時点での公開を希望しない成果は、その旨記載してください。

※論文は、2014年3月末までにアクセプトされたものであれば、in press(印刷中)でも構いません。

※特許の場合、通常、出願情報が公開されるのは出願日から1年半以降です。それ以前に公開する場合は出願人にご確認ください。

(1) 論文(原著論文)発表

1.	Kim, S., Yamamoto, J., Chen, Y., Aida, M., Wada, T., Handa, H., and <u>Yamaguchi, Y.</u> Evidence that cleavage factor Im is a heterotetrameric protein complex controlling alternative polyadenylation. <i>Genes Cells</i> . 2010 年, 15, 1003-1013.
2.	Taneda, T., Zhu, W., Cao, Q., Watanabe, H., <u>Yamaguchi, Y.</u> , Handa, H., and Wada, T. Erythropoiesis is regulated by the transcription elongation factor Foggy/Spt5 through gata1 gene regulation. <i>Genes Cells</i> . 2011 年, 16, 231-242.
3.	Kawano, A., Hayashi, Y., Noguchi, S., Handa, H., Horikoshi, M., and <u>Yamaguchi, Y.</u> Global analysis for functional residues of histone variant Htz1 using the comprehensive point mutant library. <i>Genes Cells</i> . 2011 年, 16, 590-607.
4.	Diamant, G., Amir-Zilberstein, L., <u>Yamaguchi, Y.</u> , Handa, H., and Dikstein, R. DSIF restricts NF-kappa B signaling by coordinating elongation with mRNA Processing of negative feedback genes. <i>Cell Reports</i> . 2012 年, 2, 722-731.
5.	Isobe, T., Song, S.-N. J., Tiwari, P., Ito, H., <u>Yamaguchi, Y.</u> , and Yoshizaki, K. Activation-induced cytidine deaminase auto-activates and triggers aberrant gene expression. <i>FEBS Letters</i> . 2013 年, 587, 2487-2492.

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【受賞】

2011 年 2 月 手島記念研究賞 研究論文賞

2011 年 10 月 東工大挑戦的研究賞

【プレスリリース】

2012 年 10 月 過剰な炎症反応を抑える仕組みを解明

ー関節リウマチなど自己免疫疾患の病態が明らかにー