

# 研究報告書

## 「エピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 沖 昌也

### 1. 研究のねらい

我々は、出芽酵母をモデル生物として用い、エピジェネティックな制御をうけるヘテロクロマチン領域の形成及び維持に関して、分子レベルでのメカニズム解明に向けて研究を行ってきた。その過程で、ヘテロクロマチン領域の伸長が停止する境界領域が存在し、境界領域は個々の細胞間で変動し、下流にレポーター遺伝子を挿入すると、細胞分裂に伴って遺伝子発現の ON と OFF がエピジェネティックに切り替わることを見出した。

そこで、単一細胞における世代を越えた遺伝子発現切り替わりの状態を、蛍光タンパク質を用い可視化するシステムを確立し、エピジェネティックな遺伝子発現状態は数世代維持された後に切り替わり、再び同様の発現状態が数世代維持された後に切り替わることを明らかにした。この結果は、境界領域の形成が何かしらの影響により個々の細胞において揺らいでおり、結果として遺伝子の発現状態が変動していることを示唆した。

本研究では、この細胞分裂に伴い境界領域が揺らぎ遺伝子の発現が変動するエピジェネティックな現象について、(1) 世代を越えた発現状態の揺らぎに規則性があるか、(2) 同一細胞内の異なる領域での揺らぎは同調しているのか、(3) 揺らぎは遺伝子により支配されているのか、(4) 外的要因によって揺らぎは変動するのか、(5) 実際の生体内において揺らぎにより制御されている遺伝子は存在するのか等、様々な角度から解析することにより、ヘテロクロマチン領域の揺らぎに関する分子レベルでのメカニズム解明を目指した。

また、「状況に応じたヘテロクロマチン領域の揺らぎによる遺伝子発現制御機構」が存在すれば、新規の遺伝子発現調節機構であり、少ない遺伝子で、如何に生物の多様性を生み出すかという問題に対しての1つの答えを導き出せると期待し、本研究を提案した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

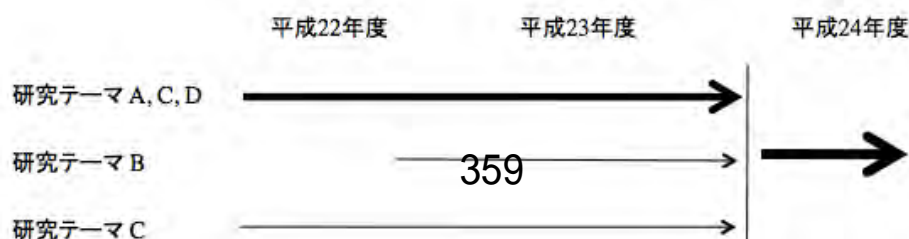
本研究では、下記4つのテーマを提案し、最終的には各年度で得られた結果を融合し、テロクロマチン領域の揺らぎに関する分子レベルでのメカニズム解明を目指し研究を進めた。

[研究テーマ A ] 世代を超えた発現揺らぎメカニズムの解析

[研究テーマ B ] 揺らぎ領域を可視化するシステムの開発

[研究テーマ C ] 揺らぎをコントロールする遺伝子の探索

[研究テーマ D ] 個々の細胞内で同様にエピジェネティックな発現調節を受けるか？



## (2) 詳細

[研究テーマ A] 世代を超えた発現揺らぎメカニズムの解析

### (a) エピジェネティックな発現調節を受ける領域の同定

染色体上には、高度にクロマチン構造が凝集したヘテロクロマチン領域と、緩んだ状態のユークロマチン領域が存在する。最初に我々は、出芽酵母ヘテロクロマチン領域として知られている *HMR* 遺伝子座に注目し、レポーター遺伝子として *URA3* を用いることにより、ヘテロクロマチン領域とユークロマチン領域の境界部分に遺伝子を導入すると、個々の細胞によって遺伝子の発現状態がエピジェネティックに変化することを見出した(図1)。個々の細胞間で発現状態が変動するため、混ざりの集団ではなく、単一細胞での解析が重要であると考え、蛍光タンパク質を用い、世代を越えた単一細胞での発現状態変化を追跡するシステムを確立した。

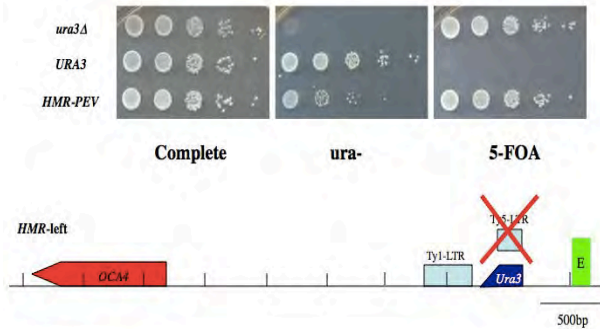


図1: エピジェネティックに発現状態が変化する領域の同定

### (b) 単一細胞におけるエピジェネティックな遺伝子発現状態追跡システムの確立

蛍光顕微鏡下で細胞を分裂させ、世代を超えた発現状態変化の規則性に関してタイムラプスシステムを用い解析した。発現状態の変化は蛍光タンパク質の細胞内存在量で定量した。

出芽酵母では性決定に関わる *HMR*、*HML* 領域、テロメア領域、*rDNA* 領域がヘテロクロマチン構造を形成し、内部に存在する遺伝子がサイレンシングされていることが知られている。*HMR* 領域左側、*HMR* 領域右側、*HML* 領域右側、テロメア領域の境界でエピジェネティックに発現状態が切り替わる領域にレポーター遺伝子として *H2B-EGFP* を挿入し、世代を超えた発現状態変化について解析を行った。その結果、*HMR* 領域左側ではランダムに発現状態の変化が起こり(図2)、*HMR* 領域右側と *HML* 領域右側は変化のパターンが類似しており ON または OFF の状態が数世代継続し、テロメアでは ON または OFF の状態が *HMR* 領域右側と *HML* 領域右側よりも更に安定で、世代を越えた発現状態の切り替わりが起こりにくいという一定の規則性が見られた。

他のレポーター遺伝子でも同様の傾向が見られるかを明らかにするため、同じ場所に *ADE2* 遺伝子を挿入し解析した。*ADE2* 遺伝子は発現すると酵母のコロニーは白くなり、*ADE2* 遺伝子が発現しないと赤色のコロニーを形成する。

HMR 領域左側では、ピンク色のコロニー、HMR 領域右側、HML 右側ではピンクのバックの中にセクター、テロメア領域では、綺麗なセクターを形成した。この結果は、世代を越えた発現状態の変化の安定性の差を示しており、単一細胞での解析結果と一致した。

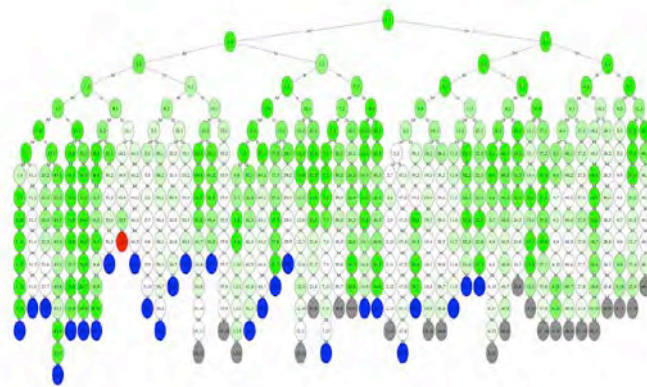


図2: 世代を越えたエピジェネティックな発現状態の変化

### (c) 統計処理を用いた解析

単一細胞での追跡結果にはきちんと再現性があるのか、またランダムではなく、一定の規則性があるのか等を明らかにするために統計処理を行った。統計処理はさがけ研究員である東京大学の小林徹也先生との共同研究である。その結果、高い再現性が見られ、またランダムだけではなく、一定の規則性が存在することが明らかとなった。

図2: 世代を越えたエピジェネティックな発現状態の変化

### [研究テーマ C] 揺らぎをコントロールする遺伝子の探索

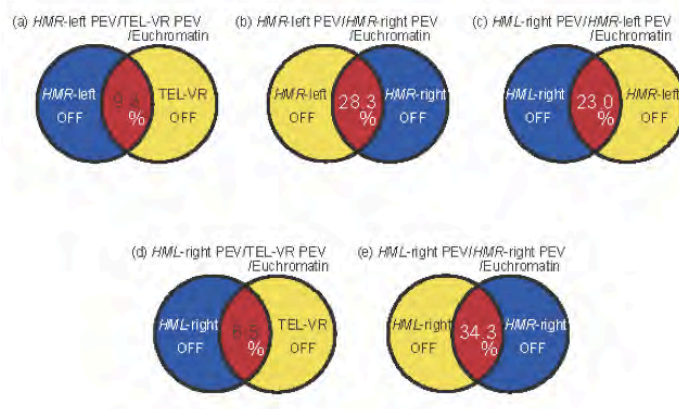
我々は既に出芽酵母全遺伝子約 6000 個の中からスクリーニングによりエピジェネティクスコントロール遺伝子を分離している。それらは同一の機能を持つタンパク質複合体の構成因子が多数含まれており、大きく8つのグループに分類出来た。最初に、ヒストン修飾酵素に注目し、破壊株を作製後、上記蛍光タンパク質を用いたタイムラプス実験を行った。その結果、*sas2* 破壊株では、発現状態の ON と OFF の切り替わり頻度が上昇していることが明らかとなった。一方、ターゲットの異なる SAGA ヒストンアセチル化酵素複合体因子の *gcn5* 破壊株では、世代を越えたエピジェネティックな発現状態変化が起こりにくくなり、固定されていることを示唆する結果が得られた。この結果は、*ADE2* をレポーター遺伝子として用いて行った解析結果とも一致した。

### [研究テーマ D] 個々の細胞内で同様にエピジェネティックな発現調節を受けるか？

同一細胞内で異なるヘテロクロマチン領域の伸縮に規則性があるか解析した。具体的には、同一細胞内の1つの境界領域には *H2B-ECFP* を、異なる境界領域には *H2B-EYFP* を挿入し、コントロールとしてユークロマチン領域に *H2B-mcherry* を挿入しタイムラプス実験を行った。同一細胞内の異なる領域、HMR 左側境界領域とテロメア境界領域、HMR 左側境界領域と HMR 右側境界領域、HMR 左側境界領域と HML 左側境界領域、HML 右側境界領域とテロメア境界領域での解析を行った。その結果、同一細胞内の HMR 領域の右側と左側、HMR 領域と HML 領域では同期している細胞が多く、HMR 領域と テロメア領域、HML 領域とテロメア領域では、片方のサイレンシング領域が伸長すれば他方は縮むという相反す

る関係があることを示唆する実験結果が得られた(図3)。この結果は、同一細胞内のエピジェネティックな遺伝子発現調節機構には、細胞内においてサイレンシングされている領域のバランスにも支配されていることを示唆した。

図3: 同一細胞内の異なるエピジェネティック



制御領域の機能的相関

[研究テーマ B] 揺らぎ領域を可視化するシステムの開発  
計画通りには進まず今後の検討が必要である。

### 3. 今後の展開

現在までの解析により、エピジェネティックな発現状態の変化には、同一細胞内でも、幾つかのパターンが存在し、遺伝子によっても制御を受けていることが明らかとなった。ターゲットの異なるヒストン修飾酵素を破壊すると、切り替わりの早くなるパターン、切り替わりが起これにくく世代を越えたエピジェネティックな発現状態が固定されるパターン等が見られたが、今後は、なぜ、ヒストンの修飾状態の違いによりこのような変化が見られるのか分子レベルでのメカニズム解明を目指したい。

また、出芽酵母ヘテロクロマチン領域形成因子である Sir タンパク質を用い ChIP on chip 解析を行った結果、新規の Sir タンパク質存在領域を多数同定した。これらの近傍には多数の遺伝子が存在し、ヘテロクロマチン領域の揺らぎにより、発現状態がコントロールされている可能性が示唆された。異なる染色体上に存在しているために同時制御が難しいと考えられていた遺伝子群においても、「ヘテロクロマチン領域の揺らぎの制御」という共通のメカニズムにより同時制御が可能となり、生体内で、ヘテロクロマチン領域が揺らぐことにより制御される新たな遺伝子発現調節機構の存在も期待できる。

我々は酵母を用いて研究を行ってきたが、ヘテロクロマチン領域は生物種を越えて保存されており、「ヘテロクロマチン領域の揺らぎ」という同様なメカニズムで遺伝子発現が制御されている可能性があり、分子レベルでのメカニズムを解明することにより、生物の多様性を生み出す新たな可能性を提示できると考えている。

### 4. 自己評価

本研究は、単一細胞を追跡するシステムを確立する前の段階で提案しており、研究を進める上で幾つかの問題点が予測された。予測された問題点を1つずつ改良し、計画よりも順調に研究が進んだことは評価出来る。

また、単一細胞を追跡したことにより、従来まではランダムだと考えられていたエピジェネテ

ィックな発現状態の揺らぎに一定の規則性があること、また遺伝子により規則性が変化すること、同一細胞内でも異なる領域間では独立して制御されているところと、協調して働いているところが存在することを明らかに出来たことは大きな成果であったと考えている。

更に、さきがけ研究者交流会を通じて、統計処理の専門家である小林先生と知り合う機会があり、共同研究を進めることにより、統計的にもエピジェネティックな発現状態の揺らぎに有意差を見出すことが出来、また、統計処理をすることにより新たに興味深い現象も見出した。

本研究の成果により、研究のねらいで記載した「状況に応じたヘテロクロマチン領域の揺らぎによる新たな遺伝子発現制御機構」の存在が示唆され、今後の研究の発展が期待出来る大きな成果を上げることが出来たと考えている。

## 5. 研究総括の見解

モデル生物の出芽酵母を用い、エピジェネティックな制御の動態を全く新しい手法を構築することで可視化し、しかも単一細胞レベルでの分析を可能とした。ヘテロクロマチンとユークロマチンの境界で遺伝子発現状態の変化について領域により規則性がみられること、ON⇔OFF切替えに遺伝子制御があることなどが明らかにされた。これらの結果の再現性、一定の規則性に関して統計処理を用いた解析を共同研究として進め、成果に結びつけたことは評価したい。

今後の展開として、揺らぎに干渉する環境要因の同定へと研究を進められることを期待したい。また、今後の課題として、見いだされた現象は酵母にとどまらず他の生物にも適用できるものなのか大いに関心があるところである。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Hatanaka A, Chen B, Sun JQ, Mano Y, Funakoshi M, Kobayashi H, Ju Y, Mizutani T, Shinmyozu K, Nakayama J, Miyamoto K, Uchida H and <b>Oki M.</b> (2011) protein isolated by boundary screening, binds the proteasome complex. <i>Genes Genet. Syst.</i> , 86, 305-314
2. Doubayashi D, Ootake T, Maeda Y, <b>Oki M.</b> , Tokunaga Y, Sakurai A, Nagaosa Y, Mikami glucose-methanol-choline oxidoreductase family has a distinct catalytic site. <i>Biosci. Biotechnol. Biochem.</i> , 75, 1662-1667.
3. Sun JQ, Hatanaka A and <b>Oki M.</b> (2011) <i>Saccharomyces cerevisiae</i> . <i>Genes Genet. Syst.</i> , 86, 73-81.
4. Maeda Y, Dobayashi D, Ootake T, <b>Oki M.</b> , Mikami B and Uchida H. (2010) Crystallization and preliminary X-ray analysis of formate oxidase, an enzyme of the glucose-methanol-choline oxidoreductase family. <i>Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.</i> , 66, 1064-1066.
5. Mizutani T, Yazawa T, Ju Y, Imamichi Y, Uesaka M, Inaoka Y, Matsuura K, Kamiki Y, <b>Oki M.</b> , Umezawa A and Miyamot K. (2010) Identification of a novel distal control region

upstream of the human steroidogenic acute regulatory protein (STAR) gene that participates in SF-1 dependent chromatin architecture. J. Biol Chem. 285, 28240-28251.

(2)特許出願

研究期間累積件数:3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)

○ 投稿中論文

1. Mano Y, Kobayashi T, Nakayama JI, Uchida H and **Oki M**. Changes in epigenetic gene expression in single cells was correlated *HM* region, but not in the telomere, and are controlled by a histone acetyltransferase. Submitted.
2. Kamata K, Hatanaka A, Goswami G, Kaori Shinmyozu, Nakayama JI, Urano T, Hatashita M, Uchida H and **Oki M**. The C-terminus of Sgf73 is important for SAGA and SLIK interaction and boundary function. Submitted.

○ 招待講演

1. **沖昌也**「単一細胞追跡システムを用いたエピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解明」第5回定量生物学の会 2012年11月25日(東京)
2. **沖昌也**「出芽酵母を用いたエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解明」第72回酵母研究会 黄桜株式会社 2011年3月11日(京都)
3. **沖昌也**「出芽酵母染色体上における境界形成機構とエピジェネティックな遺伝子発現調節機構との関わり」第21回フォーラム・イン・ドージン「エピジェネティクスによる細胞のメタモルフォーゼ」熊本キャッスルホテル 2010年11月26日(熊本)
4. **Masaya Oki** 「Analysis of the Epigenetic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*」Drexel University (Philadelphia, USA) August 2, 2010
5. **沖昌也**「新たなアプローチからのエピジェネティクスの解明」(独)産業技術総合研究所 北海道センター 2010年2月19日(札幌)

○ 学会発表

(国際学会)

1. **Masaya Oki**, Naohiro Terada, Risa Mitsumori, Kazuma Kamata, Hiroyuki Uchida (2012 September 13) "The transcriptionally s the situation" Cold Spring Harbor Meeting (New York, USA)
2. **Masaya Oki**, Akira Hatanaka, Yasunobu Mano and Hiroyuki Uchida (2010 July) "Analysis of the Epigenetic gene expression in *S.cerevisiae*" Gordon Research Conferences (Rohde Island, U.S.A)
3. **Masaya Oki**, Yasunobu Mano, Akira Hatanaka and Hiroyuki Uchida (2009 July) "Analysis of the heredity change of the ger cell" FASEB summer research conference (Colorado, USA)
4. **Masaya Oki** "Analysis of the heredity change of the boundary" Chromatin domains and Insulators Baeza, Spain, Nov 9, 2009



## (国内学会)

1. 沖昌也、寺田尚弘、内田博之「ヘテロクロマチン領域は状況に応じて多様な変化を示す」日本遺伝学会第84回大会(福岡)2012年9月
2. 眞野恭伸、内田博之、沖昌也「世代を越えたエピジェネティックな遺伝子発現はヒストン修飾酵素により制御されている」第45回 酵母遺伝学フォーラム(京都)2012年9月
3. 畑中彬良、横山慶人、内田博之、沖昌也「外的要因により変化するエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解析」第44回 酵母遺伝学フォーラム(福岡)2011年9月
4. 眞野恭伸、内田博之、沖昌也「個々の細胞において揺らぐサイレンシング領域の機能解析」第28回 染色体ワークショップ(加賀)2011年1月
5. 沖昌也、畑中彬良、眞野恭伸、光森理紗、内田博之「出芽酵母を用いたエピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解析」第33回 日本分子生物学会年会(神戸)2010年12月
6. 沖昌也「出芽酵母を用いたエピジェネティックな遺伝子発現調節機構の解析」日本遺伝学会 第82回大会(シンポジウム)(札幌)2010年9月
7. 畑中彬良、眞野恭伸、内田博之、沖昌也「エピジェネティックな遺伝子発現状態変化メカニズムの解析」第43回 酵母遺伝学フォーラム(奈良)2010年9月
8. 畑中彬良、光森理紗、眞野恭伸、大橋友恵、内田博之、沖昌也「出芽酵母におけるエピジェネティックな遺伝子発現切り替わりと境界形成機構の関与」第9回 核ダイナミクス研究会(修善寺)2010年5月
9. 眞野恭伸、山口さやか、坂季美子、小林武彦、内田博之、沖昌也「エピジェネティックな遺伝子発現切り替わりメカニズムの解析」第27回 染色体ワークショップ(御殿場)2010年1月

## ○ 受賞

2010年度 日本遺伝学会奨励賞受賞

「ヘテロクロマチン領域境界のエピジェネティックな調節機構の解析」

## ○ その他

1. 2013年6月にシンガポールで開催される「Single cell Genomics& Transcriptomics」国際会議で招待講演予定
2. 2013年11月に中国で開催される「Gene Convention: Single Cell genomics」国際会議で招待講演予定
3. 2013年9月に JST の支援を頂き福井で「Message from yeast to Epigenetics～Yeast clarifies the frontiers of life science～」というタイトルで国際会議を開催予定