

研究報告書

「ヘテロクロマチン確立メカニズムの解明」

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: 加藤 太陽

1. 研究のねらい

細胞のエピジェネティック制御機構を理解するためには、遺伝子の活性化だけでなく不活性化メカニズムの理解も欠かせない。なかでも、特定遺伝子座を転写活性化要因から隔離するエピジェネティック・サイレンシングの理解は非常に重要である。真核細胞におけるエピジェネティック・サイレンシングは、分裂酵母のヘテロクロマチンをモデルとして詳細に解析されてきた。ヘテロクロマチンとは、高度に凝集し、転写活性が積極的に抑えられた、サイレントな高次クロマチン構造である。ゲノム上のヘテロクロマチン領域に位置するヒストン H3 は、その N 末端の Lys-9 がメチル化修飾(K9me)を受け、その修飾を認識する HP1 タンパク質の局在をもたらす。HP1 は、転写不活性化に関わるヒストン脱アセチル化酵素などの足場となることで、その領域のサイレントな性質決定に寄与する。これまでヘテロクロマチンの構築システムに関して得られた知見は主にエピジェネティックな「維持」に関するものであり、ヘテロクロマチンを新規に「確立」するメカニズムについては未だ不明確な点が多かった。申請者は本研究において、分裂酵母のヘテロクロマチンをモデルとしてエピジェネティック・サイレンシングの「確立段階」の本質的理解を目指した。

本研究では、分裂酵母のヘテロクロマチン領域をモデル遺伝子座として、ヘテロクロマチン構築に異常を示す新規変異の順遺伝学的スクリーニングからヘテロクロマチン確立メカニズムの解明を目指した。ヘテロクロマチンを特徴づける K9me 修飾を担う酵素は、ヒトにおいては Suv39h と呼ばれるヒストンメチルトランスフェラーゼであるが、その分裂酵母ホモログは Clr4 である。よって、Clr4 の条件的失活と再活性化によってヘテロクロマチンの確立をモニタリングできれば、確立に関わる因子の同定が可能であり、それらの因子の機能解析によってヘテロクロマチンの確立メカニズムを解明できると考えた。しかしながら、Clr4 の温度感受性変異を利用したヘテロクロマチン確立モニタリング系は、様々な条件検討の結果、当初計画した順遺伝学的スクリーニングには不向きであることが判明した。そのため、本研究では類似したスクリーニングで代用した。ある因子がヘテロクロマチンの確立に関与するならば、その変異によって一端ヘテロクロマチンの性質が失われると再確立ができないはずである。この観点から、徐々にサイレンシングが失われ、ふたたび不活性化状態を再構築できない変異のスクリーニングを行い、同定した因子の解析を行った。

2. 研究成果

本研究での成果については、2報の論文が投稿中であり、現時点で公表できない。未発表のためタンパク質因子の名前を伏せて記載する。

(1) 概要



すべての真核生物はヒストンを介した遺伝子制御を行う。ヒストン(特に H3 と H4)はヌクレオソームの構成要素として特定の遺伝子座に長期的に局在し、その翻訳後修飾が当該遺伝子座にシスに作用して固有の性質を付与する。タンパク質をコードする遺伝子の転写を担う RNA ポリメラーゼ II(Pol II)は、ヒストンを利用した長期的なクロマチン記憶を保つために、固有の翻訳後修飾を受けたヒストン H3 と H4 の散逸を伴わずに転写を行わなければならない。しかしながら、その仕組みに貢献する因子は不明であった。今回、この仕組みに関わる因子として X を同定し、X が働かなければすべての転写領域のヒストン修飾が失われることを示す結果を得た。また、別のタンパク質複合体のサブユニットである2つの因子を同定して解析した。現在、これらの結果について論文にまとめ投稿中である。

3. 今後の展開

順遺伝学的な手法と高速シーケンシング技術の相性が非常によい、ということが本研究を通して明らかになった。順遺伝学的手法は、興味ある生理機能が失われることを指標として、その生理機能に重要な役割を果たす因子の同定を目指す。しかも、無作為にゲノムに変異を導入するために予備知識のバイアスがかからず、新規の重要因子の同定に優れる。しかしながらこの手法には重要な欠点があり、変異は見つかったとしても遺伝子の同定が困難であるケースがこれまでに多々あった。高速シーケンシング技術は、全ゲノムを対象としてリファレンスゲノム(野生型ゲノム)との違いを一塩基レベルで明らかにすることができるので、順遺伝学的手法がもつ欠点を補うことができる。特に、今回モデル生物として採用した分裂酵母は、ゲノムサイズが小さいだけでなく一倍体であるために変異同定が容易であった。本研究では、246 bp という比較的長い領域の欠失が表現型につながる特殊な事例でも、それを同定することができた。今後は益々、種々の重要経路の解明に順遺伝学的な手法を適用することが再評価され、そこには本研究で得たノウハウが反映されると期待される。

本研究では、クロマチン免疫沈降産物の高速シーケンシング後の解析を行うソフトウェア環境の開発も行った。遺伝学的な背景の異なるサンプル間での正規化と、アノテーション情報を加味した解析ができる。このソフトウェア環境はクロマチンに関係する様々な因子の分布解析に利用可能であり、今後のエピジェネティクス研究に貢献できると思われる。

未発表のため詳細を公開できないが、転写領域におけるヒストン修飾の保護に関わる因子を見いだしたことは非常に重要である。この因子はあらゆる真核生物に保存されており、分裂酵母で確認した機能の重要性を考えると、真核生物のエピジェネティック制御の根幹に関わる因子であると言ってよい。今後は、この因子を中心に、転写領域におけるヒストン修飾の保護についての詳細な解析を継続すべきである。

4. 自己評価

本研究は、真核生物のエピジェネティック制御を理解するため、遺伝子の発現が強く抑制されたクロマチンであるヘテロクロマチンの確立の仕組みを分子レベルで理解することを目標とした。当初計画したスクリーニング手法は、モニタリング系は作動したが、想定した通りに生物が振る舞わず、順遺伝学で遺伝子を同定するにはノイズが高過ぎた。具体的には、Clr4 の温

度感受性変異では一過的にヘテロクロマチンが緩む頻度が高くなっているためにサイレンシングの脱抑制を指標とする一次スクリーニングの偽陽性の出現率が高まり、元々のヘテロクロマチンの再構築効率の低さの故に確立異常の検出に時間を要し、しかも戻し交配後に低頻度で出現する二倍体細胞が、あたかも期待した表現型をもつ変異株のように振る舞った。このような諸悪条件を回避するために別のスクリーニング系を考案したことが、新規因子の同定につながった。同定した新規因子は、それまでヘテロクロマチンへの関与が知られていなかったものばかりであったため、十分に独自のスクリーニングを遂行できたと考えている。

転写領域においてヒストンの流失を防ぐことで、その遺伝子座のヒストン修飾を正常に保つ因子(未発表なので因子 X とする)が同定できたことは、非常に有益であった。この因子 X は、一義的にはヘテロクロマチンの Maintenance に関与すると言えるだろう。しかしながら、この役割が損なわれるならば Spreading も困難であり、Nucleation の成功頻度も低下すると考えられる。その意味では、転写によるヒストン交換を如何に抑えるか、ということが確立に至るまでの重要なステップのひとつであると考えられる。また、この因子 X の働きはヘテロクロマチンに限定したものではなく、ゲノムの全領域の転写される場所のヒストン修飾保護に関わるものなので、やはりエピジェネティクスを理解する上で大変重要な因子 X の役割を見いだしたと考えている。

5. 研究総括の見解

分裂酵母のヘテロクロマチン領域をモデル遺伝子座として、ヘテロクロマチン構築に異常を示す変異のスクリーニングからヘテロクロマチン確立機構の解明をめざしている。この仕組みに関わる因子として新規 X を同定し、X が働かなければすべての転写領域のヒストン修飾が失われることを示す結果を得た。X 因子はヘテロクロマチン形成時にポリメラーゼ II と共に働く因子として同定され、ヒストンのエピジェネティックマークの入ったヌクレオソームを保つ働きがあることを示した。この X 因子をコードしている遺伝子の変異により、ヘテロクロマチン内の転写領域でのヒストン H3 の減少が観察され、ヘテロクロマチンの確立に必須であることが分かった。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Okazaki K, Nakayama N, Nariai Y, Kato H, Nakayama K, Miyazaki K, Maruyama R, Kosugi S, Urano T, Sakashita G., Nuclear localization signal in a cancer-related transcriptional regulator protein NAC1. *Carcinogenesis* 2012, Oct; 33(10): 1854-62.
2. 加藤太陽、浦野：緑色蛍光タンパク質を用いた細胞内タンパク質のダイナミクス解析：島根医学 2010 年 vol.:30 89-97 頁

(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)



学会発表

1. 加藤太陽、岡崎宏亮、浦野健:分裂酵母のヘテロクロマチン制御を理解するための順遺伝学的挑戦:高次クロマチン研究会、福井、2010年8月
2. Naomi Nakayama, Gyosuke Sakashita, Hiroaki Kato, Kentaro Nakayama and Takeshi Urano:第69回日本癌学会学術総会2010年
3. 浦野健、中山真美、加藤太陽、成相裕子、岡崎宏亮、坂下暁介:第9回核ダイナミクス研究会2010年
4. 加藤太陽、岡崎宏亮、浦野健:転写と共役したヘテロクロマチン構築:高次クロマチン研究会、蒲郡、2011年8月
5. 加藤太陽、岡崎宏亮、浦野健:分裂酵母における転写と共役したヘテロクロマチン構築機構:日本遺伝学会・第83回大会、京都、2011年9月
6. 加藤太陽、岡崎宏亮、浦野健:転写装置とエピゲノムの恒常性について:高次クロマチン研究会、神戸、2012年8月