

研究終了報告書

「エピゲノム確立の再構成による動作原理解明」

研究期間：2020 年 11 月～2024 年 3 月

研究者：越阪部 晃永

1. 研究のねらい

本さがけ研究のねらいは、試験管内および植物個体内でのエピゲノムの再構成を通してヒストンバリエントとエピゲノム修飾間のクロストーク形成とそれに伴う遺伝子発現制御機構を明らかにして、長鎖ゲノムの維持および機能発現調節機構の基本原理の理解およびエピゲノムの人為的操作技術の基盤形成につなげることである。

染色体の大部分を占める反復配列は、動植物に共通して特徴的なエピゲノム修飾を受ける。特に、セントロメア近傍のペリセントロメア領域にはトランスポゾンが大量に含まれている。トランスポゾンは、その発現がゲノムの進化に多大な影響を及ぼす一方、恒常性維持への脅威となり得ることから、DNA やクロマチン構成因子ヒストン H3 のメチル化などの構成的ヘテロクロマチン形成に関与するエピゲノム修飾を受け、通常の遺伝子と区別されて鎮静化されている。研究代表者によるシロイヌナズナを用いた分子遺伝学と生化学を用いた解析の結果、トランスポゾン上の抑制型エピゲノム修飾の維持に重要なクロマチンリモデリング因子 DDM1 (Decrease in DNA Methylation 1) はヒストンの特異的な亜種 (バリエント) H2A.W をトランスポゾンに運んでその発現を鎮静化することが明らかになった。さらに、DDM1 機能欠損に伴って H2A.W がトランスポゾンから除去され、代わりに抑制型エピゲノム修飾と拮抗するように局在して遺伝子発現の制御に関わるバリエント H2A.Z が異所的に局在することを見出した。したがって、クロマチンリモデリング因子を介したヒストンバリエントのダイナミクスと他のエピゲノム修飾とのクロストークが反復配列を含むクロマチンの機能発現を調節することが示唆された。そこで、ヒストンバリエントの人為的な操作を通してエピゲノムの編集が可能になるのではないかと考え、本研究を遂行した。

2. 研究成果

(1) 概要

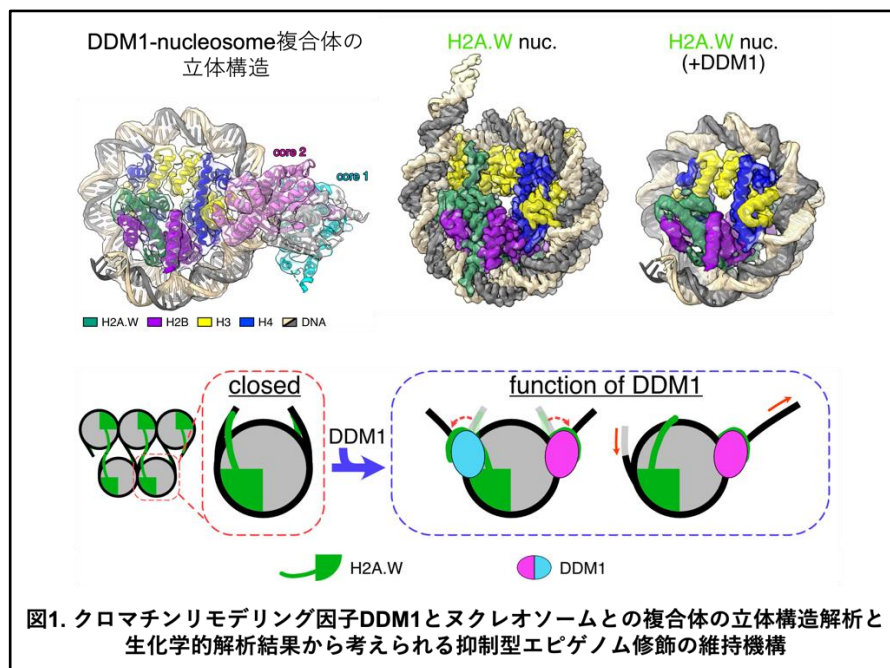
本さがけ研究では、クロマチンリモデリング因子を介したヒストンバリエントとエピゲノム修飾との間で形成されるクロストークに着目し、シロイヌナズナの反復配列上で観察される特定のエピゲノム修飾の確立および除去の基本原則を試験管内・植物内再構成アプローチによって明らかにすることである。特に、本研究では、トランスポゾンを含むペリセントロメア領域においてクロマチンリモデリング因子 DDM1 によって維持される抑制型エピゲノム修飾に対する H2A.W の関与、および DDM1 機能欠損植物内のペリセントロメア上で異所的に取り込まれた H2A.Z による抑制型エピゲノム修飾の喪失機構に焦点を当てた。本さがけ研究によって、1) クロマチンリモデリング活性を介した抑制型エピゲノム修飾の維持機構の解明、2) 特定のヒストンバリエントを介した抑制型エピゲノム修飾の導入、3) クロマチン領域特異的な局在に重要なヒストンのアミノ酸領域の同定が達成された。さらに、さがけ領域内外の共同研究として、1) 特定のヒストン修飾を含むヒストンの合成法の確立、2) 植物由来の核抽出液の調製法確立、3) Turn-on 型蛍光プローブを用いた新規エピゲノム検出技術の開発を達

成もしくは着手した。これらは、長鎖ゲノムの維持および機能発現調節機構の基本原理の理解およびエピゲノム的人為的操作技術の基盤形成につなげることが期待できる、重要な研究成果である。

(2) 詳細

・研究テーマ A 「試験管内再構成系を用いたエピゲノム制御の動作原理の解明」

ヒストンバリエント獲得による新たなエピゲノム制御の動作原理を明らかにするために、ヒストンバリエントおよびエピゲノム修飾を含むヌクレオソームを試験管内で再構成した。なお、特異的なエピゲノム修飾を含むヒストンの調製に必要なペプチドライゲーションは、さががけ「ゲノム合成」2 期生の林剛介博士との共同研究として行った (Suzuki *et al.*, 2023, *Molecules*)。本さががけ研究では、トランスポゾン上で観察される抑制型エピゲノム修飾の維持機構に着目して、ヘテロクロマチン特異的 H2A.W バリエントを含むヌクレオソームを基質として DDM1 のクロマチン構造変換活性を生化学・構造生物学的に解析した。その結果、DDM1 は H2A.W に特徴的な C 末端テールとの相互作用を介して、抑制型エピゲノム修飾導入酵素が効率よくヘテロクロマチン領域にアクセスできるようにクロマチンの構造変換を促進していることを見出した。この発見は、研究代表者が第一著者および責任著者として bioRxiv に発表し、2024 年度に *Nature Communications* 誌に受理された (図 1 および主な研究成果リスト 5.(1)-1)。



次に、ヒストンバリエントが特異的なエピゲノム修飾導入に与える影響を検証するために、再構成したヌクレオソームを基質として、リコンビナントとして精製したエピゲノム制御酵素を添加した。しかし、現時点の実験系では修飾導入効率におけるヒストンバリエント優位性は観察されなかった。このことから、実験条件が最適でない、もしくはエピゲノム修飾酵素の機能を補完するための介在因子が必要であることが考えられた。そこで、後者の可能性を考え、さがが

け「ゲノム合成」1 期生の岩川弘宙博士との共同研究としてシロイヌナズナ個体もしくは培養細胞から核抽出液を単離・精製し、エピゲノム修飾導入活性を検証した。その結果、H2A.W を含むヌクレオソームを基質とした場合、抑制型エピゲノム修飾 (H3K9me2) の修飾導入が僅かながら検出された。

・研究テーマ B 「Turn-on 型蛍光プローブを用いた新規エピゲノム修飾検出技術の開発」

本さがけ研究を遂行する際に、エピゲノム修飾導入効率を網羅的かつ簡便に検出する方法の必要性が生じた。エピゲノム修飾を試験管内で検出する従来の方法として、抗体を用いたウェスタンブロットや蛍光タグを用いたエピゲノム修飾認識タンパク質 (Reader) との相互作用解析などが挙げられるが、操作が煩雑で多数のサンプルを網羅的に解析する際に定量性や効率性が失われるという問題点があった。そこで、特定のエピゲノム修飾を認識するさまざまな Reader タンパク質に Turn-on 型蛍光色素を融合させ、エピゲノム修飾を効率的かつ網羅的に定量検出する新規手法の開発を、さがけ「ゲノム合成」2 期生の林剛介博士との共同研究として開始した。これまでに、先行研究通りに特定のメチル化修飾状態に結合する Reader タンパク質を複数種類取得したほか、UC Davis の Grey Monroe 博士との共同研究として新規の Reader タンパク質を得ることに成功した (図 2; Quiroz *et al.*, 2024, *The Plant Cell*)。

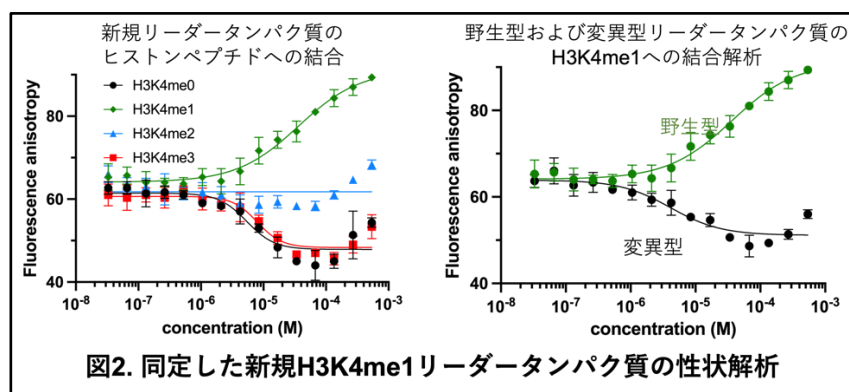
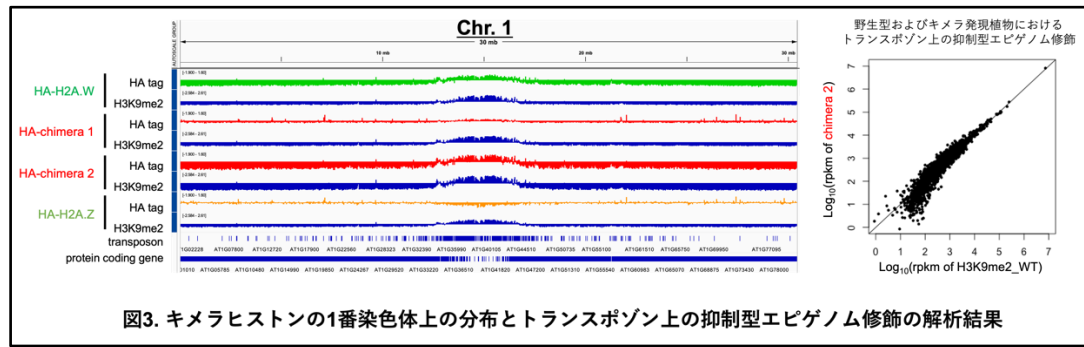


図2. 同定した新規H3K4me1リーダータンパク質の性状解析

・研究テーマ C 「ヒストンバリエント変異体導入によるエピゲノム変遷と遺伝子発現制御機構の解明」

特異的なヒストンバリエント獲得に伴うエピゲノムの変化およびそれによる遺伝子発現への影響を検証するために、H2A.W 欠損背景に遺伝子領域特異的な H2A.Z とトランスポゾン特異的な H2A.W のドメインを相互置換したキメラヒストンを発現する植物体 32 種類を作出した。作出したキメラヒストン発現植物体から核を抽出してウェスタンブロットで解析したところ、全てのキメラヒストンがクロマチンに取り込まれていることを確認した。次に、作出した植物体を用いて ChIP-seq を行い、キメラヒストンのゲノム上の分布およびキメラヒストン取り込みによるトランスポゾン特異的な抑制型エピゲノム修飾 (H3K9me2) への影響をゲノムワイドに検証した。その結果、H2A.Z および H2A.W の特異的な分布を決定するアミノ酸領域を同定することに成功した。一方で、H2A.Z の特異的な配列を含むキメラヒストンが取り込まれたトランスポゾン

ンの抑制型エピゲノム修飾は、予想に反して野生型と同レベルであった（図 3）。この結果から、1) DDM1 機能欠損に伴う抑制型エピゲノムの喪失はトランスポゾンへの H2A.Z の異所的な局在が直接の原因ではない、2) 今回作製したキメラ変異体が抑制型エピゲノム修飾の喪失に重要な機能を失っている、3) 他因子がヒストンバリエント-エピゲノム間のクロストーク形成と機能を阻害している、といった可能性が考えられた。



3. 今後の展開

研究テーマ A において、試験管内再構成ヌクレオソームを基質としたアッセイによって、特定のエピゲノムが確立される実験系の構築を目指したが、リコンビナントタンパク質のみを用いた実験系ではエピゲノム修飾の効率的な導入が確認されなかった。一方で、本さがけ領域の研究者らと連携して行った共同研究によって、修飾酵素やその補因子を含んでいることが想定される核抽出液を用いることによって特定のエピゲノムの導入が確認された。今後、核抽出液調製法の再検討やメチル化 DNA を含む基質ヌクレオソームなどを新たに調製し、ヒストンバリエントを介したエピゲノム修飾導入の再構成を目指す。

研究テーマ B はさがけ研究開始後に派生した共同研究内容になっており、Turn-on 型蛍光色素融合 Reader タンパク質を用いたエピゲノム修飾の新規検出法の開発を目指した。Reader タンパク質の性状解析を進めている際に、新たに領域外の研究者との国際共同研究が開始し、新規 Reader の発見に至った。今後、蛍光プローブとの連結等によって Turn-on 型蛍光エピゲノムプローブを作製し、新規エピゲノム修飾検出技術開発を進める。

研究テーマ C において、ヒストンバリエントのキメラ発現植物体を用いてエピゲノムを植物内で再構成することを目指した。ChIP-seq によるゲノムワイドな解析から、特定のアミノ酸領域を相互置換することによって、ヒストンバリエントを遺伝子もしくはトランスポゾンに集積させることが可能になった。一方で、キメラヒストンの局在によるエピゲノムの変化を期待していたが、その様な傾向は観察されなかった。今後、さまざまな変異体背景にキメラヒストンを発現させ同様の解析を行い、ヒストンバリエント獲得による特定のエピゲノム確立の分子機構の解明を目指す。

以上の様に、本さがけ研究で提案した試験管内および植物内再構成アプローチによって、ヒストンバリエントとエピゲノム修飾間で形成されるクロストークの確立機構の一端が明らかになった。また、本研究を展開する中で新しい技術の開発に着手した。いずれにおいても、現時点では論文などの成果には至っていないが、引き続きさがけ研究を推進するとともに継続した共同研究を通して研究の加速化を行い、数年以内の論文化と技術の実用化を目指す。対象とするヒストンバリエントおよびエピゲノム修飾は動物で共通していることから、これらの研究によって得られる成果は、研

究代表者の目的を達成するだけでなく、エピゲノムを対象とした領域に多大な波及効果を生むことが期待される。

4. 自己評価

さきがけ研究申請時には、リコンビナントタンパク質を用いて試験管内でエピゲノムを完全に再構成し、植物内再構成系と組み合わせてヒストンバリエント-エピゲノム修飾間のクロストーク確立とそれに伴う遺伝子発現制御機構を明らかにすることを目指したが、さきがけ研究期間までに全てを明らかにすることは叶わなかった。一方で、さきがけ領域に参加することで領域内研究者と知り合う機会を得て、結果として Turn-on 型蛍光色素を用いた新規エピゲノム検出系、および植物体由来の核抽出液を用いた実験系の構築など、申請当初には計画していなかった新たな研究が創出された。また、独自に取得した結果をさらに発展させ、DDM1 機能喪失に伴って遺伝子様エピゲノム修飾を獲得したトランスポゾンの新規発現調節機構の一端を明らかにすることができた。

さきがけ研究申請時との研究内容の違いに関して、当時提案していた「エピゲノム調節機構の保存性の解明」については、基部陸上植物ゼニゴケの飼育環境を整えることができず、所属機関内での遂行が困難であった。この点に関しては、グレゴール・メンデル研究所 Frederic Berger 研究室との国際共同研究として研究を実施した。並行して、ゼニゴケ由来の特定のヒストンバリエントを発現するシロイヌナズナ個体を所属機関で作出した。今後、作出した植物体を用いてゲノムワイドな解析を実施し、エピゲノム確立の進化的保存性について明らかにしたい。

以上を踏まえて、申請時の達成目標には一部至らない点があったが、さきがけ研究を通して新たな技術の確立や発見をすることができた。これまでのエピゲノム研究ではヒストンバリエントやエピゲノム修飾を個々に対象として展開されていたが、本さきがけ研究ではそれらのクロストークの形成とその動作原理を明らかにするという独自の視点から研究を展開した。さきがけ研究で培ってきた材料と技術を継続することで、当該分野に新たなパラダイムシフトを引き起こし、その先駆者に今後なれることを目指す。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 8件

1. Akihisa Osakabe, Yoshimasa Takizawa, Naoki Horikoshi, Suguru Hatazawa, Lumi Negishi, Frédéric Berger, Tetsuji Kakutani, Hitoshi Kurumizaka. Molecular and structural basis of the heterochromatin-specific chromatin remodeling activity by *Arabidopsis* DDM1. *bioRxiv* (2023) DOI: 10.1101/2023.07.10.548306

先行研究により、抑制型エピゲノム修飾導入因子がトランスポゾンを含むヘテロクロマチンで機能するために DDM1 によるクロマチンリモデリング活性が関与することが示唆されていたが、その詳細な分子機構は永らく不明だった。本論文では、試験管内再構成ヌクレオソームを用いた生化学・構造生物学的な解析を行い、DDM1 が H2A.W と協調して抑制型エピゲノム修飾因子のヘテロクロマチン構造へのアクセシビリティを高めることが明らかにした。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: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) (共同研究による原著論文) Quiroz, D., Oya, S., Lopez-Mateos, D., Zhao, K., Pierce, A., Ortega, L., Ali, A., Carbonell-Bejerano, P., Yarov-Yarovoy, V., Suzuki, S., Hayashi, G., **Osakabe, A.** & Monroe, J. Grey*. H3K4me1 recruits DNA repair proteins in plants. *The Plant Cell*, in press, DOI: 10.1093/plcell/koac089.
- 2) (共同研究による原著論文) Jamge, B., Lorković, Z.J., Axelsson, E., **Osakabe, A.**, Shukla, V., Yelagandula, R., Akimcheva, S., Kuehn, A.L. & Frédéric Berger. Histone variants shape chromatin state in Arabidopsis. *eLife* (2023) 12: RP87714. DOI: 10.7554/eLife.87714.
- 3) (著作物) **越阪部晃永**, Frédéric Berger 「クロマチンリモデリング因子 DDM1 によるパラサイト DNA の鎮静化機構」カレントトピックス、実験医学 2021 年 9 月号、p2170-2300、ISBN: 9784758125475
- 4) (総説) **Osakabe, A.** and Molaro, A. Histone renegades: Unusual h2A histone variants in plants and animals. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2022) 135: 35-42. DOI: 10.1016/j.semcdb.2022.05.001.
- 5) (受賞) 越阪部晃永「クロマチンリモデリング因子によるヒストンバリエントダイナミクスを介したトランスポゾン調節機構」日本エピジェネティクス研究会代第 15 回年会奨励賞 (2022)
- 6) (受賞) 越阪部晃永「遺伝子様エピゲノムを獲得したトランスポゾンの発現調節機構」日本遺伝学会第 94 回大会 Best Paper 賞 (2022)