

研究終了報告書

「ヘテロクロマチンの構築とその分子基盤」

研究期間：2020 年 11 月～2024 年 3 月

研究者：白井 温子

1. 研究のねらい

出芽酵母 16 本のうちの 7 本の染色体が完全合成され、酵母の物質生産性が向上するなど、長鎖 DNA 研究は飛躍的に進歩している。昨今 COVID-19 の爆発的な流行が起こったが、COVID-19 対策にも長鎖 DNA 研究が応用され、中国が公開した遺伝情報を元に、全ゲノムを合成し、COVID-19 ウイルスを人工合成し、ワクチン開発および医薬品の開発が行われた。このように、長鎖 DNA の研究は進展著しいが、遺伝子をコードしていないような繰り返し配列などは合成困難であり、人工染色体に搭載するのは難しい。特に、マウスで 243bp の繰り返し配列が 1 万回も繰り返されている動原体近傍領域（ペリセントロメア）はその長大な繰り返し配列ゆえに、人工染色体への搭載は未だ達成されていない。しかしながら、ペリセントロメアは発生・分化に関係なく凝縮したヘテロクロマチン構造をとることが知られており、その構造が壊れると分裂酵母からヒトに至るまで染色体異常を引き起こすことが知られていることから、哺乳類人工染色体が安定に複製・分裂するためには、ペリセントロメア領域の搭載が不可避である。しかし、反復配列が存在するだけでヘテロクロマチン形成が成されるのか、ペリセントロメア領域から転写された ncRNA がヘテロクロマチン形成に如何に重要な働きをしているのかなどの詳細が明らかになっておらず、人工染色体への応用は実行できていない。

そこで本研究では、染色体の任意の位置に異所的なヘテロクロマチン形成をモニターできる系を用いることで、反復配列を挿入しただけでなぜヘテロクロマチンが形成されるのか、どのようにヘテロクロマチンタンパク質が集積するのか、その機構の解明を目指す。また、ヒト細胞にマウスペリセントロメア配列を挿入すると、その挿入する向きによってヘテロクロマチンが形成される程度に大きな差があることから、マウスペリセントロメア配列から転写されている ncRNA の影響が示唆された。そこで、本研究では挿入する向きによってヘテロクロマチン形成に違いが出る理由が ncRNA なのか、その機能解明を目指す。さらにマウス細胞にヒトペリセントロメア配列を挿入した場合、挿入する向きによってヘテロクロマチン形成に違いが生じるか明らかにすることによって、進化的に保存されたヘテロクロマチン形成機構を発見し、人工染色体が安定に複製・分裂できる機構の解明を目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、先立つ研究で構築したヒト HEK293 細胞で転写抑制の起こりにくいセーフハーバー領域である AAVS 領域特異的にペリセントロメア配列を挿入し、ヘテロクロマチン形成をモニターできる系を用いた。この方法では、GFP レポーターが反復配列の直近に位置するため、もし反復配列がヘテロクロマチン化を誘導すると、GFP の発現が抑制される。この系を用いて解析を行い、ヒトのペリセントロメア配列は 3.8 kbp でその挿入方向に関係なくヘテロクロマチ

ンが形成されたのに比べて、マウスペリセントロメア配列はごく短い反復配列 (1.2 kbp) でヘテロクロマチン形成できること、そしてその挿入方向によっては抑制できない方向があることを明らかにした。さらに、マウスペリセントロメア配列からの non-coding RNA (ncRNA) を調べたところ、センス鎖の転写産物が抑制に重要であり、おそらくシスに作用していることを見出した。さらに、ごく短い反復配列 (1.2 kbp) による抑制はペリセントロメア領域に作用する因子 (SUV39H1/2) ではなく、レトロトランスポゾンに作用する (TASOR) により行われていた。

そこで、マウス ES 細胞に異所的にペリセントロメア配列を挿入したところ、ヒト細胞と同様にヒトペリセントロメア配列はその挿入方向に関係なく抑制される一方で、マウスペリセントロメア配列は挿入方向によっては抑制されないことから、マウスからヒトに至るまで保存性の高い機構によって、ヘテロクロマチン形成がなされていることを明らかにした。また、マウス ES 細胞では、Suv39h1/2 が欠損している状態では、GFP の発現抑制は起こるものの、DNA メチル化は生じていないことから、強固なヘテロクロマチン形成には Suv39h1/2 が必須であることを明らかにした。

ヒトペリセントロメア領域には多くのレトロトランスポゾンが含まれていることが知られている。本研究により、今までペリセントロメア領域とトランスポゾン領域は全く異なる機構によって、抑制されていると考えられていたが、実は複数の異なる仕組みが個別もしくは相互に関与し合うことによって行われている可能性が示唆された。今後は、本研究で明らかになった配列および抑制機構を応用することによって、次世代の人工染色体作製が現実のものとなることが期待される。

(2) 詳細

本研究は A) 繰り返し配列が *de novo* に抑制される仕組みの解明 B) ペリセントロメア領域から転写される ncRNA の機能解明 C) 受精卵・未受精卵への応用を目的に研究を進めてきた。研究を進める上で、繰り返し配列が *de novo* に抑制されるためには、繰り返し配列から転写される ncRNA が重要であることが判明してきたため、研究テーマ A と B の成果をまとめて記載する。

研究テーマ A「繰り返し配列が *de novo* に抑制される仕組みの解明」

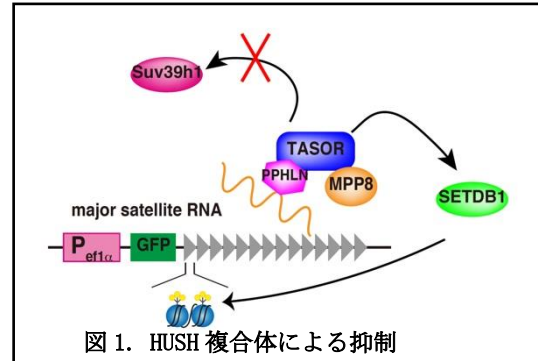
研究テーマ B「ペリセントロメア領域から転写される ncRNA の機能解明」

本研究では、まず繰り返し配列が *de novo* に抑制されるために必要な最短の長さの同定を行った結果、ヒトペリセントロメア配列は 1.9 kbp (1 units) では抑制が不十分で、3.8 kbp (2 units) で初めて十分な抑制効果を持つこと、マウスペリセントロメア配列は 1.2 kbp (5 units) でも強く抑制することができることを明らかにした。さらに、1.2 kbp や 2.4 kbp の major satellite DNA を AAVS 領域に挿入した細胞を用いて、その周辺配列の ChIP 解析および Bisulfite アッセイを行った結果、GFP に対して順方向 (for) の 1.2 kbp や 2.4 kbp の major satellite DNA の前方に位置する GFP 領域 (FMS1.2, FMS2.4) ではヒストン H3K9me3 の顕著な蓄積が検出され、また DNA メチル化が生じていた。この DNA メチル化は major satellite DNA から遠ざかるほど低下することから、異所的に挿入した繰り返し配列がたった 1.2 kbp で *de novo* にヘテロクロマチンを形成できることを明らかにした。

一方で、挿入した繰り返し配列自体は順方向・逆方向ともに同一にもかかわらず、GFP に対し

ての方向によってはヘテロクロマチン形成できなかったことから、研究テーマ B である「反復配列からの ncRNA」に着目し、解析を行った。その結果、GFP の上流に位置している P_{ef1a} からのプロモーターの影響を受ける方向の鎖のみ高度に転写されていることが明らかになり、ヘテロクロマチン形成の初期にはセンスの転写が必須である可能性が示唆された。

そこで、*de novo* に抑制されるには ncRNA とそれと相互作用する因子によるのではないかと予想し、探索を行い、レトロトランスポゾンの転写抑制に寄与していることが知られている HUSH 複合体に焦点を絞った。HUSH 複合体は、分裂酵母のヘテロクロマチン形成に参与している RNAi 経路で働く RITS 複合体に似ているとして報告された複合体である。RITS 複合体は siRNA を取り込み、染色体上の相補的な



DNA に結合して、ヘテロクロマチン形成を誘導することが知られている。そこで、HUSH 複合体の構成因子である TASOR を CRISPR-Cas9 によってノックアウトすることによって、順方向の major satellite DNA の前方の GFP が再発現してくるか解析を行なった結果、TASOR ノックアウトによって GFP の脱抑制が起こり、ペリセントロメア配列からの鎖特異的な転写も上昇することを見出した(図 1)。そこでこの HUSH 複合体が関与しているのが、レトロトランスポゾンのヒストン H3K9 をトリメチル化する SETDB1 なのか、ペリセントロメア領域のヒストン H3K9 をトリメチル化する SUV39H1/2 なのかを明らかにするため、SETDB1 と SUV39H1/2 をそれぞれ CRISPR-Cas9 でノックアウトすることによって解析したところ、SETDB1 ノックアウトでは脱抑制がおこるが、SUV39H1/2 ノックアウトでは脱抑制されないことを見出した。しかし、2021 年 11 月に報告された論文より HUSH 複合体は A リッチな RNA を標的として結合し、抑制することが明らかになり、本研究の鎖特異的な発現抑制は、A リッチな転写産物が多く発現する順方向の major satellite DNA で抑制され、T リッチな転写産物が多く発現する逆方向の major satellite DNA は抑制されないこと、および alphoid DNA は A と T が同程度配列に存在するために両方向とも抑制されることで説明できた。つまり、ef1a プロモーターによって転写が活性化しているマウスペリセントロメア配列は外来遺伝子として認識され、SETDB1-HUSH 複合体によって *de novo* に抑制されることが示唆された。

一方で、ヒト HEK293 細胞にマウスペリセントロメア配列を挿入したために抑制が起こった可能性を考え、マウス ES 細胞株を用いて、異所的ヘテロクロマチン形成系の構築を行った。その結果、マウス ES 細胞でもヒト細胞での結果と同様の現象が観察された(図 2)。すなわち、ヒトペリセントロメア配列は向きに関係なく抑制された一方でマウスペリセントロメア配列は GFP に対しての向きによって、GFP の発現抑制に

WT ES細胞		GFP 蛍光の減弱 DNA メチル化	
マウス	順方向	++	+
	逆方向	-	-
ヒト	順方向	++	+
	逆方向	++	+

Suv39h欠損 ES細胞		GFP 蛍光の減弱 DNA メチル化	
マウス	順方向	++	-
	逆方向	-	-
ヒト	順方向	++	-
	逆方向	+	-

図 2. ES 細胞での異所的ヘテロクロマチン形成

違いがあることが明らかになった。さらに、GFP 領域上では DNA メチル化が生じていたことから、マウスからヒトに至るまで保存性の高い機構によって反復配列の抑制が行われていることが明らかになった。そこで、Suv39h1/2 欠損 ES 細胞に繰り返し配列を挿入したところ、Suv39h1/2 非存在下でも GFP の蛍光が減弱したものの、DNA メチル化は生じていないことが明らかになった。これらより、マウス細胞では異所的な繰り返し配列が強固にヘテロクロマチン形成するには Suv39h1 が必要であることが明らかになった。

以上の結果より、*de novo* に繰り返し配列が抑制されるためには、Suv39h1/2 による抑制機構とともに、Hush 複合体による抑制機構が関与していることが明らかになった。今後はごく短い major satellite DNA を挿入した際の周辺配列へのヘテロクロマチン波及効果やゲノム構造を解析していくことで、次世代の人工染色体開発が期待される。

研究テーマ C「受精卵・未受精卵への応用」

研究テーマ A/B の検出系では、ヘテロクロマチン形成を検出するのに一週間程度もかかってしまう。そこで、受精卵・未受精卵に反復配列含有プラスミドを多量にインジェクションすることで、数日のヘテロクロマチン形成を ChIP でモニターできる系の開発が共同研究先の理化学研究所 IMS の井上梓研究員により行われた。卵母細胞へヒトペリセントロメア含有プラスミドを多量にインジェクションし、ヒストン H3K9me3 化レベルを解析したところ、ベクターのみとは異なり、ヒトペリセントロメア配列上に H3K9me3 の蓄積が検出され、数日のヘテロクロマチン形成をモニターできることが明らかになった。

3. 今後の展開

今後は、Suv39h1/2 や Hush 複合体など複数の異なる仕組みによって行われているヘテロクロマチン形成が、独立もしくは連携してヘテロクロマチン形成を行っている機構を明らかにしていきたい。さらに、今後 2～3 年のスパンでごく短い major satellite DNA 配列が三次元的にゲノム構造を変化させているのかを CREST 平谷チームとの共同研究で明らかにしていく予定である。本研究により、マウスからヒトに至るまで、動原体近傍領域になぜ長大な繰り返し配列が存在し、ヘテロクロマチン形成しているのかという謎の解明に一石を投じると考えられる。またクロマチン構造が緩むことによって生じる染色体異常が、ごく短い major satellite DNA 導入によって、改善するのか解析を行ってきたい。また、さきがけ大関研究員とは major satellite DNA を人工染色体に活用することで、安定に複製・分裂できる次世代の人工染色体を開発していくことになっている。実際に遺伝子を搭載して運用するのは 7～10 年先になるかもしれないが、まずは 2～3 年を目処に major satellite DNA を搭載した人工染色体の構築を行ってきたい。

4. 自己評価

本研究で目的とした異所的に挿入したペリセントロメア配列が *de novo* に抑制される機構や、その抑制機構に ncRNA が機能していることは明らかにできた。しかしながら、予想に反して、異所的に挿入したペリセントロメア配列は、ヒト HEK293 細胞では外来性の DNA と認識されて SUV39H1/2 によってではなくレトロトランスポゾンに作用する HUSH 複合体によって抑制が行われてしまっているということが判明した。さらに、研究期間中に HUSH 複合体がトランスポゾンから転写される RNA と結合していることが報告されてしまったため、論文化を見送ることになってしま

ったのが、反省点である。しかしながら、その後の解析より、マウス ES 細胞では繰り返し配列の前方に付加した GFP の転写は Suv39h1 非依存的に抑制されたが、強固なヘテロクロマチン形成には Suv39h1 が必要であることが示唆された。これは、Suv39h1 非依存的な転写抑制と Suv39h1 による抑制がペリセントロメア配列上で機能していることを意味しており、未だ明らかにされていない哺乳類細胞におけるペリセントロメア領域からの ncRNA がヘテロクロマチン形成に果たす機能について明らかにできると考えている。今後はできるだけ早期に上記研究をまとめ、研究成果を論文として公表していきたい。また、ごく短い繰り返し配列でヘテロクロマチンを形成できたことより、人工染色体のセントロメアとペリセントロメアを含む基本骨格をより短く構築できることを意味しており、将来的には複数の遺伝子を人工染色体に搭載することも現実可能になる革新的な技術となりうる。

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:0件

(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. 2022 Mini-Symposium「Genome building from TADs」

「Exogenous DNA integration model study de novo heterochromatin formation」

2. 2022 年度 第 45 回 日本分子生物学会年会 ワークショップ招待講演

「反復配列に引き起こされる哺乳類異所的高次クロマチン形成系の構築と解析」

3. 2022 年度 日本遺伝学会第 94 回大会 シンポジウム招待講演

「哺乳類異所的高次クロマチン形成系の構築とその分子基盤」

4. 2022 年度 第 15 回エピジェネティクス研究会年会 若手シンポジウム招待講演

「反復配列に引き起こされる哺乳類異所的高次クロマチン形成系の構築と解析」

5. 2021 年度 第 5 回転移因子研究会 招待講演

「反復配列に引き起こされる哺乳類異所的高次クロマチン形成系の構築と解析」