

## 研究課題別評価

1 研究課題名: 染色体ゲノムの機能領域を区分するバウンダリーエレメントの解明とその応用

2 研究者氏名: 石井浩二郎

3 研究のねらい:

染色体ゲノムからの遺伝子の発現制御は、主に遺伝子 DNA の折り畳み度を調節するクロマチン構造の変化で体现される。従って遺伝子が連なった各染色体には、全長に沿って異なるクロマチン構造領域が混在することになる。しかしながら各領域のクロマチン構造は近傍 DNA に自律的に伝播していく特性を有するため、特に遺伝子が近接している染色体部位においては、クロマチン構造変換効果を遮断してあいまいさを排除する「隔壁」が、ダイナミックな細胞プログラムの緻密かつ正確な発動にとって不可欠となる。そのようなクロマチン構造の隔壁として働く「バウンダリーエレメント」の研究は現在世界各地で進められているが、その分子的本質は未だ不明なままである。本研究では、染色体ゲノムの機能領域を区分すると考えられるバウンダリーエレメントが特にヘテロクロマチン構造を遮断する仕組みについて、分裂酵母を実験材料に詳細な解析を行った。

4 研究成果:

本研究においては、1) 染色体上でヘテロクロマチンを遮断している生来のバウンダリーエレメントの解析、2) ヘテロクロマチン領域の拡大を引き起こす分子作用の理解、3) ヘテロクロマチンの拡大を構造的に阻止する能力を持つ蛋白質因子の機能的探索、の 3 点を中心にバウンダリーエレメントの解析を進めた。

1) 染色体上でヘテロクロマチンを遮断している生来のバウンダリーエレメントの解析

ヘテロクロマチンは遺伝子転写を抑制する閉じたクロマチン構造であり、特異的なヒストン修飾やその修飾特異的な結合蛋白質 HP1 が分子基盤を担う。分裂酵母でもそれらの要素は高度に保存され、染色体動態を制御するセントロメア DNA 部分では、Mis6 キネトコア複合体を構成する中央ドメインの両端の反復 DNA 部位上に形成される。セントロメア DNA でのヘテロクロマチン領域と非ヘテロクロマチン領域を決定する分子要因を解析した結果、開かれた中央ドメインと閉じたヘテロクロマチンドメインの領域画定は相互のクロマチン構造に依存して拮抗的に達成されていることが判明した。中央ドメインの周辺ヘテロクロマチンとの境界は DNA 一次配列に規定された絶対的なものではなく、この領域には構造的な隔壁は存在しないと考えられる。

2) ヘテロクロマチン領域の拡大を引き起こす分子作用の理解

ヘテロクロマチンの遮断機構を解明するためには、ヘテロクロマチンの拡大を引き起こす機構の十分な理解も必要である。これまでヘテロクロマチンの拡大は、特異的なヒストン修飾が結合蛋白質を通じてヌクレオソームアレー上を隣に伝播していくことで引き起こされていると考えられていた。しかし近年になって、ヘテロクロマチンを形成する反復 DNA 配列から RNA が転写され、その産物が RNAi 機構によって siRNA に処理されてエフェクター複合体に取り込まれることが、ヘテロクロマチンの形成自体に関わっていることが報告された。ヘテロクロマチンが siRNA に導かれて染色体上を伝播する可能性を検証するために、分裂酵母で生成される siRNA の詳細な解析を行った。その結果、siRNA 生成は SIRE (siRNA regulatory element) を含む特異的な転写産物によって引き起こされ、それが誘導するヘテロクロマチンの近傍 DNA 領域への拡大は siRNA の配列とは独立であることが判明した。RNAi 機構を介するヘテロクロマチン形成はヘテロクロマチンの核として特徴的な役割を果たすが、領域の境界の画定自体はヒストン修飾のレベルで行われているものと思われる。興味深いことに、SIRE はセントロメア以外のヘテロクロマチン領域のゲノム配列にも存在し、遺伝子のコード領域に含まれる例も見出された。SIRE は RNA を鋳型とした RNA 転写反応の開始に関与することを示すデータを得ており、RNAi 機構の引き金となる二本鎖 RNA 形成において機能すると考えられる。

### 3) ヘテロクロマチンの拡大を構造的に阻止する能力を持つ蛋白質因子の機能的探索

ヘテロクロマチンを遺伝子転写の上で拮抗的ではなく中立的に遮断する因子を探索するために、分裂酵母染色体上に二つの栄養要求性マーカーなどを組み合わせたバウンダリーエレメントのアッセイコンストラクトを作成した。両端に SIRE に関連したヘテロクロマチン源を配置し、DNA 標的配列で一方のマーカーのみを挟むことにより、そのマーカーのみのヘテロクロマチンからの脱抑制をバウンダリーエレメント樹立の指標とした。ヘテロクロマチンを拮抗的に遮断する因子は両マーカーを共に活性化するため、区別が可能となる。このアッセイシステムに DNA 標的化蛋白質と融合させた発現ライブラリを適用して、中立的バウンダリーエレメントを誘導する蛋白質の直接的単離を目指した。当初の LexA 蛋白質を活用した DNA 標的化システムは、LexA 自体の示すバックグラウンド活性によって十分に機能しなかったが、Gal4 蛋白質との融合に切り替えることで特異性の向上が得られた。その結果、分裂酵母においても核膜孔複合体への染色体の物理的相互作用がヘテロクロマチンの遮断を引き起こすことが判明した。その他の構造的要素についても解析が進んでいる。

### 5 自己評価:

本研究は、分裂酵母を用いたバウンダリーエレメントアッセイ系の樹立を大前提としたが、予想に反してその達成に大変に時間を要した。分裂酵母では十分に確立されたヘテロクロマチン源の報告が皆無で、ヘテロクロマチン源の配列同定を自ら行う必要があり、それが難航したことが大きな理由としてあげられる。また、DNA 標的化システムも分裂酵母にはほとんど導入前例が無く、系を確立し終えて初めて LexA の不適切さが判明するなど、全てにおいて常に手探りの状態が続いた。既に何十年もヘテロクロマチン源や DNA 標的化システムに関して蓄積のある出芽酵母と同様に分裂酵母を捉えたことに関して、当初の見込み違いを認めざるを得ない。しかし、留学終了後の何もない状態から諦めることなく地道にデータを積み上げ、最終的に予定したアッセイ系の樹立に至った。高等生物への応用も含めたその重要性和出芽酵母をしのぐ有用性については高く評価でき、今後の発展が大いに期待できると考える。また、ヘテロクロマチン源同定の試みの一環として分裂酵母 RNAi 機構にも正面から取り組み、その結果 SIRE に関する大きな発見と産業応用の期待できる2件の特許が生まれた。こちらの関連研究も今後の発展が高く期待できると捉えている。

### 6 研究総括の見解:

ヘテロクロマチン構造を遮断するバウンダリーエレメントの解明という大きな課題に、分裂酵母を材料に挑み、siRNA生成に関与するSIREの解明、核膜孔複合体への染色体の相互作用の存在などヘテロクロマチンと非ヘテロクロマチン構造領域を決定する要因に関してしかるべき成果を挙げたと考える。しかし、いずれも、既にこの分野では考えられていたことを分裂酵母でその存在を示したに留まった感がある。分裂酵母で築いた解析システムを駆使して、この系ならではの独自の発見を積み重ねていただきたい。

### 7 主な論文等:

論文(3件)

1. Ishii, K. and Laemmli, U. K.: Structural and dynamic functions establish chromatin domains. **Molecular Cell** 11: 237-248, 2003
2. Saitoh, S., Ishii, K., Kobayashi, Y. and Takahashi, K.: Spindle checkpoint signaling requires the Mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with Mad2 and mitotic spindles. **Molecular Biology of the Cell** 16: 3666-3677, 2005
3. Ishii, K., Hiraga, Y. and Takahashi, K.: An RNA element controlling siRNA production and heterochromatin assembly in fission yeast. (submitted)

総説(4件)

1. 石井浩二郎: 核膜孔への連繋による染色体の機能的区分。 **実験医学** 21: 1874-1880,

2003

2. 石井浩二郎: バウンダリーエレメント。 **生体の科学** 55: 398-399, 2004
3. 石井浩二郎: 小分子 RNA と染色体制御。 **BIO Clinica** 20: 1077-1082, 2005
4. Ishii, K.: Breaking and tessellating the contiguous nuclear genome. In **Nuclear Dynamics**, Nagata T. and Takeyasu K. Ed., Springer-Verlag Inc. (in press)

特許 (2件)

特願 2005-013338 「小分子 RNA の検出方法および小分子 RNA 検出用試薬」

特願 2005-145876 「RNA 干渉誘導エレメント及びその用途」

招待講演 (5件)

1. 石井浩二郎、Ulrich K. Laemmli; 染色体の区分化を担うバウンダリーエレメントの分子機構。 **日本細胞生物学会大会** (第 56 回; 大津; 2003)
2. Ishii, K. and Laemmli, U. K.: Molecular mechanisms of boundary elements that delimit heterochromatin domains. **日本生化学会大会** (第 76 回; 横浜; 2003)
3. 石井浩二郎、Laemmli, U. K., 平賀由利子、高橋考太: バウンダリーエレメントによるヘテロクロマチン領域画定機構。 **日本分子生物学会年会** (第 26 回; 神戸; 2003)
4. 石井浩二郎: 酵母を用いた染色体機能ドメイン構築の機構解剖。 **酵母合同シンポジウム** (第 16 回; 大阪; 2004)
5. 石井浩二郎、平賀由利子、高橋考太: 分裂酵母セントロメア配列による siRNA 産生とヘテロクロマチン形成の誘導。 **日本分子生物学会年会** (第 28 回; 福岡; 2005)