

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：10101

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05742

研究課題名（和文）ヒストン修飾Eraserによる抑制的エピゲノムの維持・変動制御機構の解明

研究課題名（英文）Study on the regulatory mechanism of epigenome dynamics by histone modification erasers

研究代表者

村上 洋太（MURAKAMI, Yota）

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20260622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 61,600,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物のDNAはヒストン蛋白質に巻きついたクロマチン構造をとる。ヘテロクロマチンはヒストンH3の9番目のリジンのメチル化(H3K9me)修飾によって規定され遺伝子発現を抑制するが、繰り返し配列をもつDNA領域に形成される傾向がある。しかし繰り返し配列とヘテロクロマチンをつなぐ機構は不明であった。本研究ではモデル生物である分裂酵母でこの現象を再現し、本来はH3K9meを除去するEpe1蛋白質が、繰り返しDNA配列ではRNAi機構を介してH3K9me修飾を促進することを明らかにした。これはヘテロクロマチンと繰り返しDNA配列をつなぐ新しいメカニズムを提唱するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物進化の過程でゲノムで繰り返し配列の増大がおこることが広く観察される。そして繰り返し配列は相同組み換えを介した遺伝子組換えの標的となりゲノム不安定性を招く。繰り返し配列上に形成されるヘテロクロマチンは遺伝子組換えを抑制し、ゲノム安定性に寄与すると考えられており、ヒトにおいてもその不具合によって発症する病気があることが知られている。しかし、反復配列上のヘテロクロマチン形成の分子機構は不明であった。したがって、本研究の成果は真核細胞のもつ根本的なゲノム安定性維持の仕組みの理解のみならず、今後ヒトにおける病気の治療法の探索にも有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Eukaryotic DNA has a chromatin structure wrapped around histone proteins. Heterochromatin is defined by methylation of the 9th lysine of histone H3 (H3K9me) and suppresses gene expression, but it tends to form in DNA regions with repetitive sequences. However, the mechanism that connects repeat sequences and heterochromatin remains unclear. In this study, we reproduced this phenomenon in the model organism fission yeast and found that the Epe1 protein, which normally removes H3K9me, promotes H3K9me modification in repetitive DNA sequences via the RNAi mechanism. This proposes a new mechanism that connects heterochromatin and repetitive DNA sequences.

研究分野：分子生物学・エピジェネティクス

キーワード：ヘテロクロマチン 反復配列 分裂酵母 RNAi

1. 研究開始当初の背景

遺伝情報はDNA配列によるゲノム情報とそれを制御する“非ゲノム情報”から構成されている。ゲノム情報の複製は正確に行われるのに対し、非ゲノム情報の複製は一定の堅牢性をもちながらも、分化や環境変化に応じて変化しうる柔軟性を持つ。しかし、ゲノム情報複製機構の理解に比べ、非ゲノム情報複製はその多層性・複雑性のため、その分子機構の解析は進んでいない。

DNAメチル化、ヒストン修飾により制御されるクロマチン構造は非ゲノム情報の中で大きな役割を果たしている。DNAメチル化修飾をもたず、高等真核生物と良く保存されかつ単純なクロマチン制御機構をもつ分裂酵母は、ヒストン修飾によるクロマチン構造研究の良いモデル生物である。ヒストンH3リジン9のメチル化 (H3K9me) とその結合タンパク質HP1により規定される不活性なヘテロクロマチンは良く保存されているが、その制御機構の基本概念的には分裂酵母の研究により確立されてきた。

分裂酵母のヘテロクロマチンはセントロメアやテロメア領域に存在し、RNAiに依存して形成される恒常的ヘテロクロマチンの他に、ユークロマチンの減数分裂特異的遺伝子上にはRNAi非依存的に形成される一時的ヘテロクロマチンが存在する。一時的ヘテロクロマチンは通常生育条件下では安定に維持されるが、窒素源枯渇により性分化（接合～胞子形成過程）が誘導されると消滅し減数分裂特異的遺伝子の発現上昇に寄与する。これらヘテロクロマチンの制御において多面的に機能する因子として、ヒストン脱メチル化酵素の触媒ドメインであるJmjCドメインをもち、H3K9meの“Easer”として機能するタンパクEpe1がある（図1）。これらの機能を総合するとEpe1はゲノム全体のヘテロクロマチンlandscape制御のマスターレギュレーターであることがわかる。

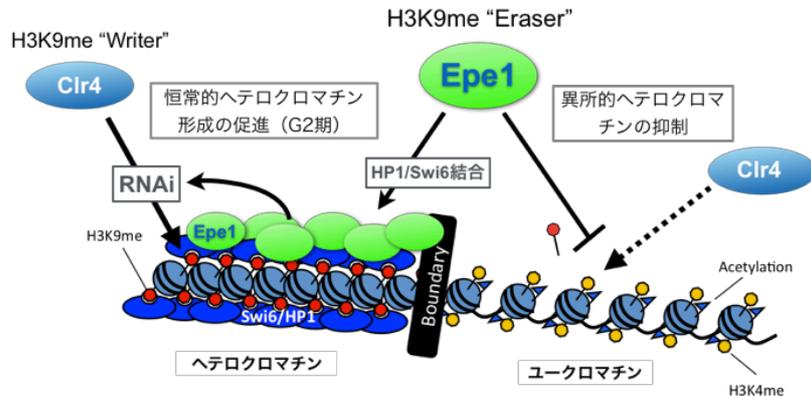


図1 H3K9me修飾マスターレギュレーターのEpe1

分裂酵母の構成的ヘテロクロマチンの複製・維持機構に関しては、ゲノム複製時に緩んだヘテロクロマチンから転写されるnoncoding RNAによりRNAiシステムが起動し、最終的にH3K9meの“Writer” タンパク質Clr4が呼び込まれ複製による新規ヌクレオソーム導入により減少したメチル化修飾の「補填」がおこるという「S期活性化」モデルが広く信じられてきた(Chen et al. Nature 2008)。ところが申請者はこの結果が実験に用いた細胞周期同調手法によるartifactであること、実際にはG2期にEpe1がRNAiを活性化しClr4を呼び込むことでH3K9meの補填をおこなう事を示した (未発表データ)。Epe1は 分裂酵母のHP1タンパク質Swi6 (Swi6/HP1)と結合しヘテロクロマチンに局在するが (図1) 、そこでの機能は謎であった。われわれの結果はその機能を

明らかにしたものである。

一方、一時的ヘテロクロマチンについては、Epe1による脱メチルの標的になりEpe1の欠損によりヘテロクロマチンの増大がおきることや、窒素枯渇によるH3K9meの減少が遅れることが報告されているが、複製維持機構についてはほとんどわかっていない。一方、今までのヒストン修飾の複製研究の多くは修飾Writerの機能に着目していたが、我々の結果は、**WriterとEraserのバランス・相互制御が重要**となることを示唆している。これらの結果はEpe1がゲノム全体のH3K9me修飾の複製・維持・可塑性を制御するマスターレギュレーターとして機能している事を示している（図1）。

2. 研究の目的

本研究では上記の背景からH3K9me修飾制御の分子機構理解にはH3K9me修飾の消去だけでなく、RNAiによるH3K9me修飾を正に制御するEpe1の理解が重要であると考え、以下の2点について解析を進めることとした。

(1) Epe1によるRNAiの活性化機構解明

(2) H3K9me修飾の付加と除去という相反する活性の調節機構の解明

3. 研究の方法

上記 (1), (2)に関しては、ヘテロクロマチンに転写活性をモニターするためのマーカー遺伝子をセントロメアヘテロクロマチン内にもつ分裂酵母株を用意し、Epe1変異やRNAiを始めとする、ヘテロクロマチン関連因子の変異体を導入し、それら変異により ①ヘテロクロマチン内の転写量 ②ヘテロクロマチンからの転写産物由来の小さなRNA (small RNA)の産生量 ③ヘテロクロマチンを規定するH3K9me修飾の状況 ④各因子のヘテロクロマチン局在量などを定量的に測定することで、各因子のヘテロクロマチンでの機能を明らかにする。測定に用いる方法は、①はRT-qPCR法、②はサザンブロッティング、③、④はクロマチン免疫沈降法をそれぞれ用いて測定している。また、「4. 研究結果」で詳述するように測定対象となるヘテロクロマチンとして、セントロメア周辺領域の恒常的ヘテロクロマチン、および人為的に導入した反復配列上に形成されるヘテロクロマチンを対象としている。

4. 研究成果

申請者のグループはモデル生物である分裂酵母を用いて、その染色体のセントロメア近傍領域がなぜ選択的にヘテロクロマチン化されているのか、という解析から研究に着手した。分裂酵母の場合、セントロメア近傍ヘテロクロマチン領域は単純な繰り返し配列ではなく、*dg/dh* と呼ばれる3~4 kbの特定の塩基配列の複雑な繰り返し構造で構成されている。これまでの研究で、この*dg/dh*からはタンパク質をもたないnon-coding RNA(ncRNA) が転写されており、それがRNAiという経路の標的になることで、ヘテロクロマチン形成が誘導されているということが明らかになっている（図2）。RNAi経路とは、二十数塩基のsmall RNAと、そのsmall RNAを介してそれと相補的な配列を持つ標的RNAを認識するArgonaute蛋白質で構成されている仕組みのことである。この経路は様々な形で広く真核生物で保存されているが、共通

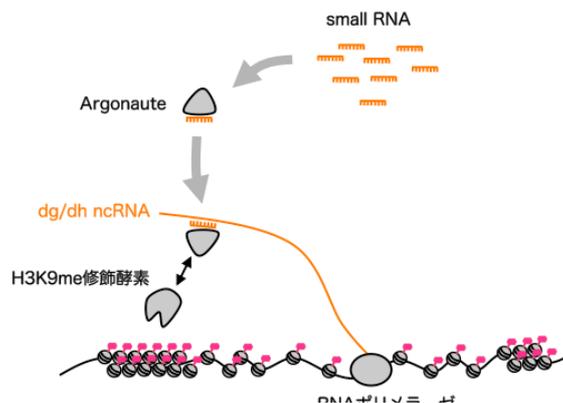


図2. RNAiを介したヘテロクロマチン形成機構

しているのは標的になったRNAの発現が抑制されるという点である。このうち、分裂酵母の*dg/dh* ncRNAにおけるRNAi経路は、“RNAiを介したヘテロクロマチン形成の誘導”によって標的RNAの発現を抑制する例として、最も研究が進められているものの1つである。これまでの研究の結果、Argonaute蛋白質がsmall RNAを介して*dg/dh* ncRNAを認識する際に、H3K9me修飾酵素をクロマチンに連れてくることで当該領域におけるヘテロクロマチン形成が促進されるということが分かっている（図2）。

上述したようにRNAi経路はsmall RNAを介して標的RNAを認識するという特徴があるため、もし*dg/dh*以外のsmall RNAを細胞内で人工的に産生すれば、それと相補的な配列をもつ任意のRNAをその標的として認識させることができるはずである。しかしながら興味深いことに、人工的なsmall RNAを供給することでRNAi経路に通常のmRNA遺伝子を人為的に認識させても、ヘテロクロマチン形成が殆ど起きない。この結果は、*dg/dh* ncRNAは通常のmRNAにはない、RNAiを介したヘテロクロマチン形成にとって重要な特性を持っているということの意味しているが、その実体は未だ明らかになっていなかった。

dg/dh ncRNAの特性を調べる研究がこれまであまり進んでこなかった理由の1つとして、*dg/dh* ncRNAの発現は通常ヘテロクロマチン形成により抑制されているため、その検出や解析自体が難しかったということがある。そこで今回、我々はH3K9me修飾を除去する蛋白質であると同時にヘテロクロマチン内の遺伝子の転写を活性化する事が知られていたEpe1という因子に着目した。我々はまず、このEpe1を細胞内で過剰発現すると、*dg/dh* ncRNAの発現量が30倍近く増加し、それと同時にRNAi経路が高活性化状態になることを見いだした。この時*dg/dh* ncRNAの発現量が増加することを利用してその詳細な解析を行なった結果、本来サイレントなヘテロクロマチンが形成される*dg/dh*配列に、実は沢山の転写開始点が存在しており、そこからEpe1依存的にncRNAが転写されているということが明らかになった（図3）。

そもそもこのRNAi経路を介したヘテロクロマチン形成機構というのは、“転写を抑制する”ヘテロクロマチンの形成にその領域の“転写が必要”という矛盾がある。そこで我々はこのように転写開始点が沢山あることが、転写が抑制されているヘテロクロマチンにおいてもRNAi経路の認識に必要な標的RNAをヘテロクロマチンを壊さずに十分量供給することを可能にするのではないかと考えた。そこでこの仮説を検討するために、先の「RNAi経路に通常のmRNA遺伝子を人為的に認識させても、ヘテロクロマチン形成を効率よく誘導できない」という報告に着目した。もしも仮説が正しければ、通常のmRNA遺伝子でも、ゲノム上の一カ所で繰り返した状態にすることで、*dg/dh*配列同様、ヘテロクロマチン存在下で十分量の標的RNAを供給することが出来、その結果効率よくヘテロクロマチン形成を誘導できるようになるのではないかと推測した。

そこで我々はある特定のmRNA遺伝子が最大8回繰り返し替えした状態で染色体の一カ所に存在する細胞を作成し、その解析を行なった（図4）。その結果まず、mRNA遺伝子を繰り返しただけでは自発的なヘテロクロマチン形成は起きないことが確認された。しかし次に、人工的なsmall RNAによってRNAi経路を介したヘテロクロマチン形成を誘導してみたところ、繰り返しになっ

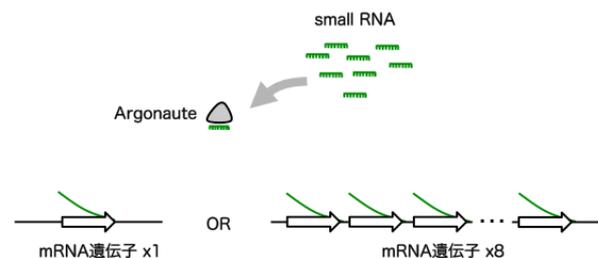


図3. 繰り返しにしたmRNA遺伝子に人為的なRNAiを誘導する系の模式図

た標的遺伝子を持つ細胞では繰り返しになっていない標的遺伝子をもつ細胞と比べて50倍近い効率でヘテロクロマチンが形成された。詳細な解析の結果、繰り返しになった標的遺伝子上ではRNAi経路がsmall RNAを効率的に“再生産”することが出来、その結果ヘテロクロマチン形成が促進されていることが分かりました。注目すべきことに、一度“再生産”が始まると、最初誘導に用いたsmall RNAが細胞から取除かれた後も、RNAi経路は自律的に活性化し続け、その領域のヘテロクロマチンを維持するようになった。この結果は、これまで*dg/dh* 配列で解析されてきたRNAiを介

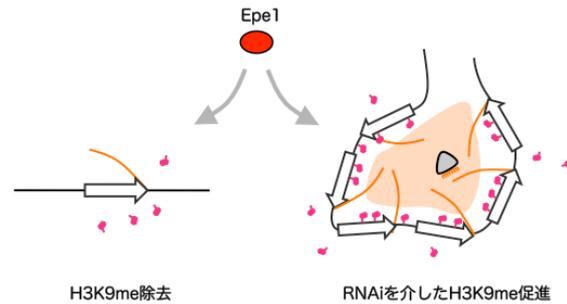


図4. H3K9me除去因子であるEpe1は相反する2つの役割を持つ

したヘテロクロマチン形成が、通常のmRNA遺伝子を繰り返しに配置することによっても人為的に再現できることを示しており、研究グループはこれをrepeat-induced RNAiと名付けた。

このrepeat-induced RNAiの系を用いて、最後に研究グループはEpe1とRNAiの関係を調べた。その結果、Epe1はヘテロクロマチン下にある標的遺伝子を脱抑制することで、RNAi経路に必要な標的RNAを供給する役割を担っており、この時RNAi経路が活性化されるかどうかは、標的遺伝子の繰り返しの数に依存しているということが明らかになった(図5)。標的遺伝子が一定数以上繰り返しになっている場合、Epe1によって十分量の標的RNAが供給されるため、RNAi経路はsmall RNAを再生産して自律的に活性化することが出来、その結果ヘテロクロマチンは維持される。一方で繰り返しの数が不十分な場合、Epe1によって供給される標的RNAが少ないため、RNAi経路は活性化されず、その結果Epe1による脱抑制はヘテロクロマチンの除去という逆の結果を招く。つまりEpe1は、繰り返しの状態に応じて「ヘテロクロマチン形成の促進」と「ヘテロクロマチンの除去」という相反する2つの役割を果たしていることになる。また同時にこのことは、RNAiを介したヘテロクロマチン形成はH3K9me修飾の補充と除去のバランスの上に成り立っていることを意味している。

これまで繰り返しDNA配列におけるヘテロクロマチン形成については、繰り返しになっていること自体がDNA-DNA相互作用、異常な転写産物、遺伝子量の閾値の超過といった異常の原因になり、それが細胞に認識されることでヘテロクロマチン形成が起きると考えられてきた。「ヘテロクロマチンを除去する因子が繰り返し配列と組み合わせると逆にヘテロクロマチン形成を促進する」という今回の結果は、なぜ真核細胞ではヘテロクロマチンが繰り返しDNA配列において選択的に形成されているのか、というこれまでの問いに新たな洞察を与えるものである。

繰り返しDNA配列と相関したヘテロクロマチン形成は多様な生命現象において見られることが知られており、これには植物や動物におけるパラミューテーションやインプリンティングといった現象も含まれる。また実際ヒトにおいても、ある繰り返し配列の繰り返し数が減少することでその領域のヘテロクロマチンが失われ、その結果脱抑制した遺伝子によって発症する病気があることなどが報告されている。今後同様のメカニズムが高等真核生物においても存在しているのか明らかになっていくことで、こういった幅広い生命現象の理解や、関連するヒトにおける病気の治療法の探索に貢献することが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takahata Shinya, Murakami Yota	4. 巻 13
2. 論文標題 Opposing Roles of FACT for Euchromatin and Heterochromatin in Yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomolecules	6. 最初と最後の頁 377-377
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biom13020377	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yamamoto Tetsuya, Asanuma Takahiro, Murakami Yota	4. 巻 6
2. 論文標題 Polymeric nature of tandemly repeated genes enhances assembly of constitutive heterochromatin in fission yeast	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 796-807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-023-05154-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takahiro Asanuma, Soichi Inagaki, Tetsuji Kakutani, Hiroyuki Aburatani and Yota Murakami	4. 巻 36
2. 論文標題 Tandemly repeated genes promote RNAi-mediated heterochromatin formation via an antisilencing factor, Epe1, in fission yeast	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes & Development	6. 最初と最後の頁 1145-1159
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/gad.350129.122	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Satoru Tsunemine, Hiromi Nakagawa, Yutaka Suzuki and Yota Murakami	4. 巻 50
2. 論文標題 The chromatin remodeler RSC prevents ectopic CENP-A propagation into pericentromeric heterochromatin at the chromatin boundary	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 10914-10928
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkac827	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kazuki Tsukii, Shinya Takahata, Yota Murakami	4. 巻 27
2. 論文標題 Histone variant H2A.Z plays multiple roles in the maintenance of heterochromatin integrity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 93-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12911	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hiroki Yu, Mai Tsuchida, Motoyoshi Ando, Tomoka Hashizaki, Atsushi Shimada, Shinya Takahata, Yota Murakami	4. 巻 26
2. 論文標題 Trimethylguanosine synthase 1 (Tgs1) is involved in Swi6/HP1-independent siRNA production and establishment of heterochromatin in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 203-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yu Hiroki, Tsuchida Mai, Ando Motoyoshi, Hashizaki Tomoka, Shimada Atsushi, Takahata Shinya, Murakami Yota	4. 巻 26
2. 論文標題 Trimethylguanosine synthase 1 (Tgs1) is involved in Swi6/HP1 independent siRNA production and establishment of heterochromatin in fission yeast	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 203-218
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12833	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sorida Masato, Hirauchi Takahiro, Ishizaki Hiroaki, Kaito Wataru, Shimada Atsushi, Mori Chie, Chikashige Yuji, Hiraoka Yasushi, Suzuki Yutaka, Ohkawa Yasuyuki, Kato Hiroaki, Takahata Shinya, Murakami Yota	4. 巻 15
2. 論文標題 Regulation of ectopic heterochromatin-mediated epigenetic diversification by the JmjC family protein Epe1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1008129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1008129	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sorida Masato, Murakami Yota	4. 巻 66
2. 論文標題 Unprogrammed epigenetic variation mediated by stochastic formation of ectopic heterochromatin	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Current Genetics	6. 最初と最後の頁 319 ~ 325
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00294-019-01031-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Yota Murakami
2. 発表標題 Tandemly repeated genes promote RNAi-mediated heterochromatin formation via an anti-silencing factor Epe1
3. 学会等名 The 11th international fission yeast meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yota Murakami
2. 発表標題 Tandemly repeated genes promote RNAi-mediated heterochromatin formation via an anti-silencing factor Epe1
3. 学会等名 The 11th international fission yeast meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 浅沼 高寛、稲垣 宗一、角谷 徹仁、油谷 浩幸、村上 洋太
2. 発表標題 標的遺伝子の密集がRNAi-ヘテロクロマチン形成を促進する
3. 学会等名 第39回染色体ワークショップ・第20回核ダイナミクス研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 村上洋太
2. 発表標題 RNA capのメチル化酵素Tgs1のRNAi依存ヘテロクロマチン形成での機能
3. 学会等名 トランスポゾン研究会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

繰り返し配列のDNAがヘテロクロマチン化される仕組みを解明
https://www.hokudai.ac.jp/news/pdf/230113_pr.pdf
 遺伝情報継承に重要な染色体領域を維持する仕組みを解明
<https://www.hokudai.ac.jp/news/2022/10/post-1108.html>

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関