

平成 22年 5月 24日現在

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2006-2008

課題番号：18207012

研究課題名（和文）

non-coding RNA と RNAi に依存するサイレントクロマチン構築機構

研究課題名（英文）

Mechanism for heterochromatin formation depending on non-coding RNA and RNAi

研究代表者

村上 洋太 (Murakami Yota)

北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授

研究者番号 20260622

研究成果の概要：

分裂酵母のヘテロクロマチンはヘテロクロマチン内で転写される non-coding RNA (ncRNA) 及び RNAi 機構に依存して形成される。この系がどのように成り立ち制御されているのか、分子遺伝学的、分子生物学的手法を駆使して解析をおこなった。その結果 ncRNA を転写する RNA ポリメラーゼ II がこのシステムで果たす役割を明確にするともに、ヘテロクロマチン内での ncRNA 転写制御機構の一端を明らかにした。さらにこのシステムで機能する新規因子の同定に成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	15,800,000	4,740,000	20,540,000
2007年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
2008年度	11,100,000	3,330,000	14,430,000
年度			
年度			
総計	38,000,000	11,400,000	49,400,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物化学・分子生物学

キーワード：クロマチン、non-coding RNA, RNA 干渉、

## 1. 研究開始当初の背景

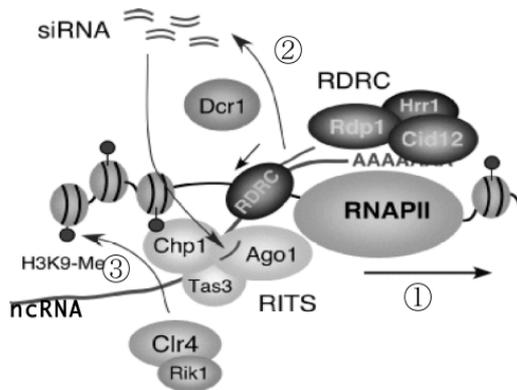
ポストゲノムの解析をはじめとする多くの解析から、non-coding RNA (ncRNA) の存在が次々と明らかになり、その生理的機能が注目されていた。一方で RNA interference (RNAi) をはじめとする、RNA が関与する遺伝子発現抑制機構、いわゆる RNA サイレンシングが種を超えて広く存在することがわか

ってきた。本研究を始める4年前に、分裂酵母のセントロメアヘテロクロマチンが、この ncRNA と RNAi に依存して形成されることが明らかになり図1のようなモデルが提唱された。この結果、ncRNA や RNAi がクロマチン構造制御によるエピジェネティックな遺伝子発現抑制が密接につながることを示された。この RNAi におけるヘテロクロマチン形成

機構は植物細胞でも類似した機構が存在し、ほ乳類細胞でも機能していることも示唆されていた。

一方で我々は、本研究を始める一年前に、世界にさきがけて、分裂酵母セントロメアヘテロクロマチン領域での ncRNA 転写を RNA ポリメラーゼ II が行うこと、さらにヘテロクロマチン特異的異常を示すポリメラーゼの新規変異体 *rpb2-m203* を同定し ncRNA から siRNA を合成するステップに RNAPII が関わることを示した(Kato et al. Science 309: 467-469, 2005)。

図 1 RNAi 依存性ヘテロクロマチン



RNAPII: RNAポリメラーゼII

Dicer: siRNA合成をおこなうRNA分解酵素

RDC: RNA依存的RNAポリメラーゼ (Rdp1) 複合体  
(二本鎖RNA合成、polyA付加酵素Cid12を含む)

RITS: RNA-induced transcriptional silencing complex  
(siRNAを含みH3K9-MeとncRNAに結合しClr4複合体をリクルートする)

Clr4/Rik1: H3K9特異的ヒストンメチル化酵素(Clr4)複合体

Swi6: HP1の分裂酵母ホモログ

H3K9-Me: histone H3 9 番目のリジンのメチル化

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景で述べた知見をもとに、分裂酵母のセントロメアヘテロクロマチンをモデルシステムとして、ncRNA と RNAi 因子に依存するサイレントクロマチン形成機構の全貌を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

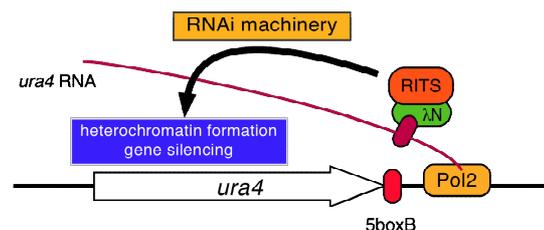
本研究では(1)RNA ポリメラーゼ II の RNAi 依存性ヘテロクロマチンにおける機能解析と(2)RNAi 依存性ヘテロクロマチンに関

与する新規因子の遺伝学的同定と解析、の二点に焦点を絞り、遺伝学的手法・分子遺伝学的手法を用いて解析を進めた。具体的には以下の2つのアプローチをおこなった。

### (1) RNA ポリメラーゼ II の RNAi 依存性ヘテロクロマチンにおける機能解析

我々が新規に単離した RNA ポリメラーゼ II の変異 *rpb2-m203* 株では背景で述べたようにヘテロクロマチンでの ncRNA 転写を行えるがその後の siRNA 合成が行えない(Kato et al. Science 309: 467-469, 2005)。 *rpb2-m203* 変異で siRNA 合成のどのステップが機能していないかを遺伝学的に同定することをおこなった。米国 D. Moazed 博士のグループが配列特異的 RNA 結合蛋白質の  $\Delta N$  タンパク質を用いて、RITS 複合体を通常の mRNA である *ura4* RNA に人為的に結合させると、*ura4* RNA から siRNA が合成され *ura4* 遺伝子領域にヘテロクロマチンが形成されることを示した(RITS-tethering system 図 2、Buhler et al. Cell:125 873-86, 2006)。このことは特に ncRNA からの siRNA 合成において RITS 複合体が ncRNA に結合することが鍵になる段階であることが示している。このシステムを用いて RNA ポリメラーゼ II がこの鍵になる段階に関与するかどうか検討をおこなった。

図 2 RITS-tethering system



また、RNA ポリメラーゼ II が RNAi 関連因子と直接・間接に相互作用する可能性を考え既知の RNAi 因子と RNA ポリメラーゼ II の相互作用の検討および RNA ポリメラーゼ II の総合作用因子の生化学的同定を試みた。

### (2) RNAi 依存性ヘテロクロマチンに関与する新規因子の遺伝学的同定と解析

既知の分裂酵母ヘテロクロマチン因子についてデータベース上で登録されている性

質をその他の因子と比較すると、ヘテロクロマチン因子に特徴的な性質を抽出することができる(表1)。この情報をもとに、これらの性質をもつ因子をデータベースから選別しそれらの因子について系統的に遺伝子破壊をおこない、ヘテロクロマチンに異常を示す物の探索をおこなった。その結果得られた因子のいくつかについてヘテロクロマチンで果たす機能について分子生物学的解析を進めた。

表1 データベース中でのヘテロクロマチン因子の共通性質

遺伝子の性質	ヘテロクロマチン因子	全体
SPB局在	50% (14/28)	3.9% (192/4954)
核内局在	60.7% (17/28)	12.9% (686/4954)
出芽酵母にホモログがない	75.0% (21/28)	14.3% (878/5027)
減数分裂に関与	14.3% (26/28)	1.1% (4774/5027)
非必須遺伝子	93.0% (26/28)	95.0% (4774/5027)

#### 4. 研究成果

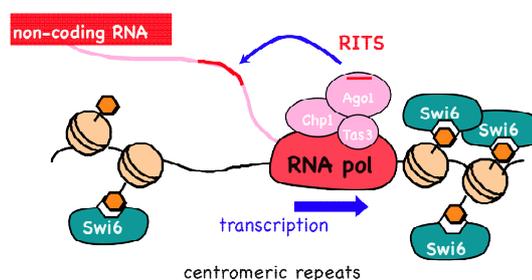
##### (1) RNAポリメラーゼIIのRNAi依存性ヘテロクロマチンでの機能の解析(投稿準備中)

「研究の方法」で述べた RITS-tethering system の *ura4*siRNA の生成およびヘテロクロマチン形成は RNAi 経路や通常のヘテロクロマチンタンパク質の機能に依存している、例えば RNAi 因子の *dcr1* やヘテロクロマチン形成に必須の *clr4* (図1参照)の遺伝子破壊をするとヘテロクロマチン形成は起こらない。しかし、*rpb2-m203* 変異を導入しても野生型と同様にヘテロクロマチンの形成が起こることを見いだした。このことは、RITSを強制的にRNAに結合させることで *rpb2-m203* 変異を相補できることを示している。つまり、RNAポリメラーゼIIはRITSをncRNAに結合させる段階で機能しており *rpb2-m203* 変異によりその機能が特異的に損なわれていることを示している(図3)。

直接RNAポリメラーゼIIがRNAi関連因子、特にRITS複合体と相互作用する可能性

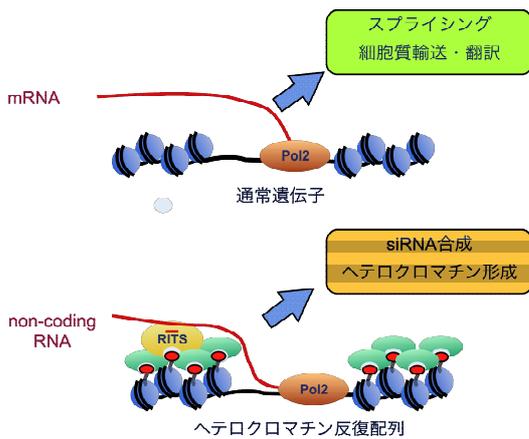
について、それぞれのRNAi因子とRNAポリメラーゼIIの免疫沈降実験を精力的に行ったが、そのような相互作用は検出できなかった。また共同研究者の田中は野生型RNAポリメラーゼIIと *rpb2-m203* 変異をもつRNAポリメラーゼIIを精製し変異型ポリメラーゼでうしなわれるような因子を検討したがいままでのところそのような因子の検出にはいたっていない。これはそのような相互作用はヘテロクロマチンを転写するごくわずかのRNAポリメラーゼIIでのみおこり、量的に少ないため上記のような手法では検出が困難なのではないかと考えている。この点は yeast two hybrid 法が有効ではないかと考えている。

図3 RNAi依存性ヘテロクロマチンにおけるRNAポリメラーゼIIの機能のモデル



mRNAのcapping, polyA付加、スプライシングなどRNAプロセッシングにRNAポリメラーゼIIが直接関与し、これらのプロセッシング因子群が転写と共役してmRNA上にリクルートされると最近考えられており、その制御機構に注目が集まっている。上記の我々の結果はRNAi依存性ヘテロクロマチン形成においてもでもsiRNA合成の鍵となるRITS複合体が転写と共役してncRNAにリクルートされていることを示し、転写とRNAプロセッシングを考える上で非常に重要な知見である。さらに我々の結果は通常のmRNAとヘテロクロマチンncRNAの転写の時に呼び込まれる因子が異なることを示している(図4)。このRNAの運命決定機構はほとんど未知であり、我々の研究成果は、転写~RNAプロセッシング研究の新たな方向性を示している。我々は現在、新規科学研究費の支援を得てこの点について精力的に解析を進めている。

図4 ヘテロクロマチンでの RNA 運命決定



(2) RNAi 依存性ヘテロクロマチンに関与する新規因子の遺伝学的同定と解析

「研究の方法」の項で述べたようにデータベース中でヘテロクロマチン因子と類似した性質をもつ因子を抽出し系統的に約 50 遺伝子の破壊をおこない 10 株ヘテロクロマチンに異常を示す遺伝子を同定した。このことは我々が用いた逆遺伝学的手法の有用性を示している。これらの遺伝子のうち特に表現型がはっきりしていて、解析を進めてた因子について以下にまとめる。

① casein kinase II (CK2) (Shimada et al. Genes & Dev. 23:18-23 (2009))

タンパク質リン酸酵素 CK2 は細胞内外の非常に多くのタンパク質をリン酸化し機能を調節することが知られている。CK2 の制御サブユニットの一つ *ckb1* を破壊するとヘテロクロマチンでの転写抑制が起こらず、ヘテロクロマチンに挿入されたマーカー遺伝子や ncRNA の転写が顕著に上昇した。解析の結果、CK2 はヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の分裂酵母ホモログ Swi6, Chp2 をリン酸化していることを見いだした。詳細な解析の結果このリン酸化の有無はヘテロクロマチンの基本構造を規定するヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化及びそれを認識結合する Swi6, Chp2 の局在には影響を与えず、ヘテロクロマチン内での転写やヘテロクロマチンの拡張を制御する因子の局在を以下のように制御する事が明らかになった。

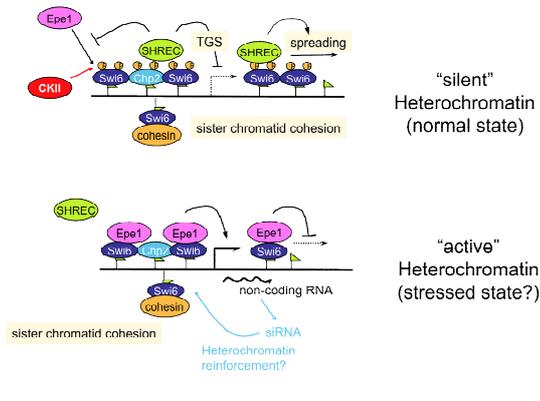
- a. CK2 によるリン酸化はヘテロクロマチンの拡張を促進し転写を抑制する因子 SHREC のヘテロクロマチン局在

に必要である。

- b. SHREC と拮抗的に働き拡張抑制・転写活性化を行う因子 Epe1 のヘテロクロマチン局在には CK2 による Swi6, Chp2 のリン酸化は不要である。
- c. ヘテロクロマチンに SHREC が局在すると、Epe1 のヘテロクロマチン局在が制限される。
- d. ヘテロクロマチンに Swi6 依存的に局在し、姉妹染色分体接着に必須の cohesin の局在は CK2 による Swi6 リン酸化に影響されない。

この結果、Swi6, Chp2 の CK2 によるリン酸化の有無により、転写が抑制されヘテロクロマチンの拡張が促進する不活性な状態と、転写が起こりやすく拡張が抑制される活性な状態が制御されていることになる(図5)。この結果はヘテロクロマチンが従来想定されたような静的なクロマチン構造ではなく、細胞内外の状況に応じて調節されるダイナミックな構造であることを明確に示しており、クロマチン構造研究の分野においてインパクトのある結果である。

図5 ヘテロクロマチン機能のリン酸化による制御



② RNA の CAP 構造のトリメチル化酵素 Tgs1

Tgs1 は通常 mRNA が 5 端にもつ CAP 構造 (グアノシンの 7 位がメチル化されている構造) をさらにメチル化しトリメチル化する酵素で、snRNA, snoRNA といった核内 ncRNA の CAP をトリメチル化している。分裂酵母の *tgs1* 破壊で一部のヘテロクロマチンが損なわれた。詳細な解析の結果、Tgs1 は一度できたヘテロクロマチンの維持にはほとんど必要ないが、新規にヘテロクロマチンを形成する際には必須であることが明らかになった。このようにヘテロクロマチンの「新規確立」の段階でのみ働く因子は未だに

報告されておらずその機能は非常に興味深い。現在ヘテロクロマチン ncRNA の CAP のトリメチル化を Tgs1 がおこない、その修飾が ncRNA の運命決定に重要な意味があると考え解析を続けている。

③ RNA ポリメラーゼ II の CTD リン酸化酵素 (*lsk1, csk1*)

RNA ポリメラーゼ II の最大サブユニット Rpb1 は C 末に 7 アミノ酸 (YSTPSPS) からなるリピート配列 (CTD、分裂酵母では 26 リピート) を持っている。転写をおこなうポリメラーゼの CTD はでは 2 番目、5 番目、7 番目のセリン (S) がリン酸化を differential なリン酸化を受け、2 番目のリン酸化は mRNA の poly A 付加やスプライシング、5 番目のリン酸化は mRNA の capping に関与することが示されている。さらにこれらのリン酸化は転写がおこっている領域のクロマチン構造制御にも関与すると考えられている。*Lsk1* は CTD の 2 番目のセリンのリン酸化酵素であり、*Csk1* は 2 番目のセリンのリン酸化酵素である *Cdk9* を活性化するタンパク質リン酸化酵素である。*lsk1, csk1* のどちらの遺伝子破壊でもヘテロクロマチンによる転写抑制が損なわれた。予備的結果ではヘテロクロマチンの構造そのものは変異株で影響を受けず、転写の抑制、おそらくは転写された RNA の exosome による分解が損なわれていることを示している。このことは RNA ポリメラーゼ II が siRNA だけでなく、exosome 系の機能にも直接関与していることを示唆しており非常に興味深い。CTD のリン酸化部位変異の解析を含め、この解析も現在さらに展開中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件) すべて査読有り

- ①. Shimada A. and Murakami Y.,  
Dynamic regulation of heterochromatin via phosphorylation of HP1-family proteins., **Epigenetics** 5: 30-33 (2010)
- ②. Shimada A., Dohke K., Sadaie M., Shinmyozu, K., Nakayama, J-I.,

Urano, T. and Murakami, Y.;  
Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. **Genes & Dev.** 23:18-23 (2009)

- ③. Dohke K., S. Miyazaki, Tanaka, K., Urano, T., Grewal, S. and Murakami, Y.; Fission yeast chromatin assembly factor 1 assists in the replication-coupled maintenance of heterochromatin. **Genes to Cells**, 13:1027-43 (2008)
- ④. Kato H., Matsunaga, F., Miyazaki S., Yin, L., D'Urso, G, Tanaka, K., and Murakami, Y.: *Schizosaccharomyces pombe* Orc5 plays multiple roles in the maintenance of genome stability throughout the cell cycle. **Cell Cycle**, 7:1083-1094 (2008)
- ⑤. Yokoyama, M., Inoue H., Ishii, C., and Murakami Y.: The novel gene *mus7+* is involved in the repair of replication-associated DNA damage in fission yeast. **DNA repair**, 6, 770-780 (2007)
- ⑥. Locovei, A., Spiga M.-G., Tanaka T., Murakami, Y. and D'Urso, G.: The Cenp-B homolog, Abp1, interacts with the initiation protein Cdc23 and is required for efficient DNA replication in fission yeast. **Cell division**, 1, 27 (2007)
- ⑦. Kohzaki H. and Murakami Y.: Faster and easier chromatin immunoprecipitation assay with high sensitivity. **Proteomics**, 4, 10-14 (2007)
- ⑧. Murakami, Y., Chen, L.-F., Sanechika, N., Kohzaki, H. and Ito, Y.: Transcription factor, Runx1 recruits the polyomavirus replication origin to replication factories. **J. Cell. Biochem.** 100, 1313-1323 (2007)

[学会発表] (計 14 件)

- ①. 村上洋太、「Dynamic Regulation of heterochromatin structure/function in the cell cycle」第 32 回日本分子生物学会年会ワークショップ「染色体倍加装

- 置のダイナミクス」、2009年12月9-12日、神奈川県横浜市
- ②. Murakami, Y.、「Dynamic Regulation of Heterochromatin」 The fifth International Fission Yeast Meeting、2009年10月26-31日、東京都
- ③. 村上洋太、「Dynamic Regulation of Heterochromatin」、第24回内藤カンファレンス “Nuclear Dynamics and RNA [II]」、2009年6月23-26日、北海道札幌市
- ④. Murakami, Y.、「Dynamic organization of heterochromatin」 Chromosome segregation: Centromeres & Kinetochores, Archachoh, Bordeaux, France, 27 Sept.-2 Oct., 2008
- ⑤. Shimada, A., Sadaie, M., Nakayama, J-I., Murakami Y.、「Regulation of heterochromatin function by phosphorylation.」 Asia-Pacific Regional *S.pombe* Meeting, Singapore 25-27 July, 2008
- ⑥. 村上洋太、「RNAiに依存するヘテロクロマチン形成における non-coding RNA の転写とダイナミクス」 第2回日本エピジェネティクス研究会年会 2008年5月9-10日 三島
- ⑦. 村上洋太、「ヘテロクロマチンのダイナミクス」 蛋白研セミナー 2008年10月30-31日 大阪
- ⑧. 仲間美奈,村上洋太、「ヘテロクロマチンにおける non-coding RNA の解析」 第30回日本分子生物学会 2007年12月11-15日 横浜
- ⑨. 仲間美奈,村上洋太 : Non-coding RNAs associates with histone H3 RNA 若手の会 2007年9月10-12日 神戸
- ⑩. Murakami, Y.、「Determinants of the fate of non-coding RNA transcribed from RNAi-dependent heterochromatin in fission yeast」 Keystone Symposia 2007 on Epigenetics, 2007.4.12, Breckenridge, CO, USA
- ⑪. Murakami Y. 「RNAi dependent heterochromatin formation.」21th COE Chromatin Signaling Symposium, Osaka, Japan, November 2-3, 2006
- ⑫. Murakami Y. 「RNA polymerase II plays an essential role in RNAi-dependent heterochromatin formation.」 The 13<sup>th</sup> East Asia Joint Symposium on Biomedical Research, Seoul Korea, July 17-19 2006,
- ⑬. Murakami, Y. 「RNAi-dependent heterochromatin formation: a central role of RNA polymerase II.」 Symposium on “Transcription control and chromatin structure” in 20th IUBMB international Congress of Biochemistry and Molecular Biology and 11th FAOBMB Congress, Kyoto, Japan, June18-23 2006
- ⑭. Murakami Y. 「RNA polymerase II plays an essential role in RNAi-dependent heterochromatin formation.」 The Joint Symposium of the IVR 50th Anniversary Symposium and the 2<sup>nd</sup> International Symposium of Institute Network “Revisiting Life Science from Half Century of Virus Research, Kyoto, Japan May 30-31 2006

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

村上 洋太 (MURAKAMI YOTA)  
北海道大学・大学院先端生命科学研究院・教授  
研究者番号：20260622

##### (2)研究分担者

田中 克典 (TANAKA KATSUNORI)  
関西学院大学・理工学部・教授  
研究者番号：60273926