

令和 4 年 5 月 17 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02423

研究課題名（和文）大規模ゲノム再編における高次クロマチン構造の形成機構

研究課題名（英文）Understanding of heterochromatin formation in Tetrahymena DNA elimination

研究代表者

片岡 研介（Kataoka, Kensuke）

基礎生物学研究所・クロマチン制御研究部門・助教

研究者番号：80784959

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、テトラヒメナのDNA削減の際につくられるヘテロクロマチン構造の形成機構を明らかにすることを目指した。DNA削減を制御するヘテロクロマチンに局在する複数のHP1様タンパク質を見出し、そのうち4つのHP1様タンパク質がDNA削減の中心的な役割を担うことを明らかにした。これらのHP1様タンパク質は、協調的に作用することでDNA削減に必要な因子を削減されるゲノム領域に集合させることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

遺伝子発現の制御に必須なヘテロクロマチン構造は、特徴的なクロマチンに結合するHP1タンパク質を足場に様々な因子が集合することにより形成されている。ヒトを含む多くの真核生物は、複数のHP1タンパク質を発現しているが、これらがどのように相互作用してクロマチンを認識し、特定のトランス作用因子を集積させるための足場を形成しているのかは明らかではない。本研究で明らかにした複数のHP1様タンパク質の協調的な作用によるDNA削減の制御の仕組みは、真核生物に共通するヘテロクロマチン形成の普遍的な分子メカニズムの理解に向けた手がかりとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aim to understand the mechanisms of heterochromatin formation in Tetrahymena DNA elimination. We found multiple HP1-like proteins localized to the heterochromatin, which regulates DNA elimination. We tethered these proteins individually to the artificially created locus and found that 4 HP1-like proteins can induce DNA elimination of the tethered site. Immunoprecipitation for the one of the HP1-like proteins Pdd1p specifically enriched the other HP1-like proteins, each of which was sufficient for the ectopic DNA elimination. These results suggest that multiple HP1-like proteins cooperatively recognize the methylated histones and form a core complex to recruit other effector proteins for DNA elimination.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ヘテロクロマチン ゲノム再編 HP1 テトラヒメナ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物のヘテロクロマチンは染色体 DNA とそれに結合する様々な分子が高次に集合したクロマチン構造であり、トランスポゾンなどの不要な遺伝子の発現の抑制やセントロメアやテロメア構造の維持などに重要な役割を果たす。近年、ヘテロクロマチンを介したエピジェネティックな遺伝子発現制御による細胞分化の分子機構が疾患や老化などの分野で注目されており、ヘテロクロマチン構造構築の分子レベルでの理解は、高次生命現象を理解する上で極めて重要な研究課題である。しかし、ヘテロクロマチンの形成とその作用機序の詳細は依然として多くの不明な点が残されている。

繊毛虫類のテトラヒメナは、ひとつの細胞内に全ゲノムを維持する小核と、一部のゲノム領域を欠く大核の 2 つの異なる核を有する単細胞真核生物である。テトラヒメナの有性生殖過程では、小核が次世代の大核に分化し、この際、全ゲノムの 1/3 を占めるトランスポゾン配列が DNA 削減と呼ばれる大規模ゲノム再編機構により除去される。この過程では、1) RNAi 機構により産生された小分子 RNA によるトランスポゾン配列の標識 (ヒストンのメチル化)、2) 標識された領域のヘテロクロマチン化 (HP1 様タンパク質のメチル化ヒストンへの結合)、3) ヘテロクロマチン化された領域の除去 (DNA 削減) の反応が有性生殖の時間経過と共に段階的に進行する。

ヒトを含む多くの真核生物と同様に、テトラヒメナ細胞内には、ヘテロクロマチンに特徴的なメチル化ヒストン (H3K9me や H3K27me) を認識することが予想される HP1 様タンパク質が複数存在する。また、DNA 削減において最終的に除去される全てのゲノム領域には、HP1 様タンパク質が結合できる H3K9me と H3K27me が存在する。したがって、ヘテロクロマチン構造の形成過程においては、複数の HP1 様タンパク質が協調的、あるいは排他的に共通のメチル化ヒストンを認識していること、また、結合したそれぞれの HP1 様タンパク質が特徴的な足場を形成し、2 次的因子をリクルートすることで、機能的なヘテロクロマチンを形成していることが考えられた。しかし、HP1 様タンパク質間の相互作用や、その他のヘテロクロマチン構成タンパク質との分子レベルの関係はほとんど明らかにされていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ヘテロクロマチンの形成の過程を同調的に解析することができるテトラヒメナを用いて、複数の HP1 様タンパク質の相互の協調関係や排他関係を明らかにすることにより、ヘテロクロマチン構造の形成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) HP1 様タンパク質の局在解析

テトラヒメナのゲノムには、12 個の HP1 様タンパク質をコードする遺伝子が存在する。このうち、これまでに局在が明らかにされていなかった 8 つの HP1 様タンパク質について、GFP 融合タンパク質を発現するトランスジェニック細胞株を樹立し、削減されるゲノム領域に形成されるヘテロクロマチンへの局在の有無を解析した。

(2) 異所性 DNA 削減アッセイ法による HP1 様タンパク質の DNA 削減能の解析

テトラヒメナでは、ヘテロクロマチン化された DNA 配列は最終的にゲノムから取り除かれ分解される。本課題では、それぞれのヘテロクロマチン因子の DNA 削減誘導能を解析するために、目的タンパク質を直接人工的に作った DNA 配列上にリクルートする異所性 DNA 削減アッセイ系を開発した。本アッセイ系を用いて、ヘテロクロマチンに局在する 7 つの HP1 様タンパク質について、それぞれのタンパク質が有する DNA 削減誘導能を検討した。

(3) HP1 様タンパク質間の相互作用の解析

DNA 削減誘導能を有する 4 つの HP1 様タンパク質には、DNA 削減に必須の HP1 様タンパク質である Pdd1p が含まれていた。そこで、Pdd1p とその他の HP1 様タンパク質間の相互作用を調べるために、Pdd1p の C 末端に G196 タグを融合した Pdd1p-G196 を発現するトランスジェニックテトラヒメナ株を樹立した。これに並行して、それぞれの HP1 様タンパク質を特異的に認識する抗体を作成した。Pdd1p-G196 発現細胞の細胞抽出液から抗 G196 抗体を用いて免疫沈降

し、得られた画分にその他の HP1 様タンパク質が存在するかどうかを、作成した特異抗体を用いたウエスタンブロット法により解析した。

(4) HP1 様タンパク質のメチル化ヒストン認識能の解析

HP1 様タンパク質は、クロモドメインを介してメチル化されたヒストン H3 認識することが知られているが、今回注目したテトラヒメナの HP1 様タンパク質のメチル化ヒストン認識能は、一部を除き明らかではなかった。DNA 削減能を有する HP1 様タンパク質に関して、それぞれのクロモドメインをリコンビナントタンパク質として調製し、メチル化ヒストン H3 ペプチドとの相互作用をプルダウン法で検討した。

(5) ヘテロクロマチンタンパク質間の相互作用の網羅的解析

DNA 削減によって除去されるゲノム領域に形成されるヘテロクロマチン構造は、メチル化ヒストンに結合した各 HP1 タンパク質が形成する足場に、トランス作用因子がリクルートされることで形成されていることが考えられた。そこで、過去の報告および本研究から明らかになっている 28 のヘテロクロマチン関連タンパク質について、一対一の相互作用を酵母ツーハイブリッド法によって網羅的に解析した。

4. 研究成果

(1) HP1 様タンパク質の局在解析

作成したトランスジェニック細胞株について、テトラヒメナの栄養増殖期および有性生殖の各時間経過で、GFP 融合タンパク質の局在を観察した。その結果、作成した全てのトランスジェニック細胞株において、上記いずれかの時期に GFP の発現が確認でき、そのうち 3 つの HP1 様タンパク質は、DNA 削減が起こる有性生殖期の新大核に局在することがわかった。さらに、これら 3 つの HP1 タンパク質について、ヘテロクロマチンへの局在が既に知られている Pdd1p との局在の差異を解析した。Pdd1p-mCherry を発現するトランスジェニックテトラヒメナと、今回作成した各トランスジェニックテトラヒメナ細胞株を掛け合わせ、同一細胞内での両タンパク質の局在を比較した。その結果、これらの 3 つの HP1 様タンパク質は Pdd1p-mCherry と共局在した。したがって、本研究によって新たに見出された 3 つの HP1 様タンパク質と、既に明らかにされていた 4 つの HP1 様タンパク質を合わせて、少なくとも 7 つの HP1 様タンパク質が DNA 削減を制御するヘテロクロマチンに局在することが明らかになった。

(2) 異所性 DNA 削減アッセイ法による HP1 様タンパク質の DNA 削減能の解析

ヘテロクロマチンに局在する 7 つの HP1 様タンパク質について、それぞれの DNA 削減誘導能を検討した。これに先立って、LexA-LexO のシステムを用いて、目的タンパク質を DNA 上に直接リクルートする異所性 DNA 削減アッセイの実験系を開発した。LexA を付加した目的タンパク質を発現するコンストラクトと、LexA が認識する LexO 配列とを、有性生殖過程のテトラヒメナの新大核に同時に導入し、得られた子孫の LexO 配列の有無を PCR 法により解析するアッセイ法を開発した。本実験系を用いて、ヘテロクロマチンに局在する 7 つの HP1 様タンパク質を、それぞれ LexO 配列にリクルートしたところ、4 つの HP1 タンパク質について、顕著な LexO の消失が観察された。したがって、これら 4 つの HP1 様タンパク質は、DNA 削減に必要な全てのトランス作用因子をクロマチン上に集める中心的な役割を担うことが示唆された。

(3) HP1 様タンパク質間の相互作用の解析

異所性の DNA 削減を誘導できる HP1 様タンパク質について、それぞれを特異的に認識する抗体を作成した。Pdd1p-G196 細胞株と野生型のテトラヒメナ株を用いて有性生殖を誘導し、この細胞抽出液から、抗 G196 抗体を用いた免疫沈降で Pdd1p に相互作用するタンパク質を精製した。得られた精製画分をウエスタンブロッティング法により解析した結果、Pdd1p と共に、他の 3 つの DNA 削減誘導能を有する HP1 様タンパク質が確認できた。一方、この画分には、DNA 削減誘導能を有さない HP1 様タンパク質はほとんど確認されなかった。また、DNA と RNA を非選択的に分解する核酸分解酵素である Benzonase で処理をした場合でも、処理前に見られた相互作用に変化は見られなかった。したがって、異所性の DNA 削減を誘導することができる 4 つの HP1 様タンパク質は、核酸を介さずにヘテロクロマチン内で複合体を形成していることが示唆された。

(4) HP1 様タンパク質のメチル化ヒストン認識能の解析

多くの真核生物の HP1 様タンパク質は、クロモドメインを介して H3K9me を認識する。テトラヒメナの削減されるゲノム領域には、H3K9me3 に加えて H3K27me3 が蓄積していることが知られており、HP1 様のタンパク質である Pdd1p のクロモドメインは、H3K9me と H3K27me の両方を認識することが先行研究により明らかにされている。異所性 DNA 削減誘導能を有する 4 つの HP1 様タンパク質のメチル化ヒストン結合能を解析するために、それぞれのクロモドメインをリコンビナントタンパク質として調製した。これらについて、H3K9me3 または H3K27me3 を含むヒストン H3 ペプチドとの相互作用をペプチドプルダウン法により検討した。その結果、既に両メチル化ヒストンを認識することが知られている Pdd1p に加えて、もう一つの HP1 様タンパク質が H3K9me3 と H3K27me3 を含む両ペプチドと相互作用することが明らかになった。一方で、残りの 2 つの HP1 様タンパク質については、H3K9me3 と H3K27me3 への相互作用は確認されなかった。これらのことから、削減される DNA 上に蓄積する H3K9/27me3 は、2 つの異なる HP1 様タンパク質の協調的作用によって認識され、これら 2 つの HP1 様タンパク質によって認識されたメチル化ヒストンを含むゲノム領域に、さらに別の 2 つの HP1 様タンパク質が結合することによって、DNA 削減を起こすのに必要な因子をリクルートする特徴的な足場が形成されることが示唆された。

(5) ヘテロクロマチンタンパク質間の相互作用の網羅的解析

7 つの HP1 様タンパク質を含む 28 つのヘテロクロマチン関連因子について、それぞれの間の一対一対応の相互作用を、酵母ツーハイブリッド法を用いて網羅的に解析した。この結果、これまでに知られている因子間の相互作用に加えて、これまで明らかにされていなかった 48 対のタンパク質間相互作用を見出した。今回見出した複数の HP1 様タンパク質が形成するクロマチン上の足場に、様々なトランス作用因子がどのようにリクルートされるのかを時間経過に沿って解析し、ヘテロクロマチン形成のダイナミクスを明らかにすることが今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 片岡研介
2. 発表標題 ひとつの細胞にゲノムがふたつ、テトラヒメナのDNA削減機構
3. 学会等名 日本遺伝学会第91回大会シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡研介
2. 発表標題 Mechanistic understanding of heterochromatin formation in Tetrahymena DNA elimination
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 片岡研介、Eliot Geraud、Olivera Valentirovic、望月一史、中山潤一
2. 発表標題 テトラヒメナのDNA削減を担うヘテロクロマチンの形成機構
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------	---------