

令和 2 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14675

研究課題名（和文）ヘテロクロマチンのパターンニングによる遺伝子発現制御の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular mechanism of heterochromatin patterning involved in gene regulation

研究代表者

前田 亮（Maeda, Ryo）

大阪大学・生命機能研究科・特別研究員（PD）

研究者番号：90814575

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：真核生物のDNAは、ヒストンとよばれるタンパク質に巻きついた状態で核内に存在する。この巻きつきが強くなると、遺伝子の発現は抑制される。この状態をヘテロクロマチンと呼び、細胞の独自性を決める基盤であると考えられている。本研究では、どのようにヘテロクロマチンが作られるのか、その分子メカニズムの解明を目的とした。ヘテロクロマチンを構成するタンパク質の一つであるHP1に着目し、HP1を細胞から取り除くことで、その分子機能を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類にはおよそ30000の遺伝子が存在するが、細胞ごとに発現する遺伝子は異なる。本研究は、不必要な遺伝子をいかに発現させない状態にするか、ということに着目し、その状態の形成に必要なタンパク質の機能を明らかにした。この研究成果は、生物の発生や、遺伝子発現異常によって引き起こされるがんなどの病気に対して、根本的な知見をもたらすことが期待できる。

研究成果の概要（英文）：Eukaryotic DNA is wrapped around a protein called histone. Heterochromatin, which is a highly condensed histone-DNA structure and represents a repressive state of gene expression, is essential for maintaining cell identity. In this study, I aimed to elucidate the underlying mechanism of heterochromatin formation. I focused on HP1, which is a component protein of heterochromatin, and clarified its molecular function using knockout analysis.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヘテロクロマチン HP1

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クロマチンの凝集領域であるヘテロクロマチンは、ヒストン H3K9 のトリメチル化 (H3K9me3) に H3K9me3 認識タンパク質 HP1 が結合することで作り出される (Shiv ら *Nat Rev Genet* 2007)。これは全ての真核生物に共通な機構である。しかしながら、H3K9me3 の修飾酵素は、分裂酵母において 1 種類しか存在しないのに対して、ほ乳類では 5 種類報告されている。このことからほ乳類は、**HP1-H3K9me3 修飾酵素群のより複雑な相互作用によりヘテロクロマチンパターンを形成すると考えられるが、その詳細な分子メカニズムは明らかにされていない**。2017 年度に、ヘテロクロマチンは互いに集合し、巨大な転写抑制領域を形成することが実証された (Larson ら *Nature* 2017, Strom ら *Nature* 2017)。そのため、細胞特異的なクロマチン構造をつくるためのヘテロクロマチン形成機構や、転写制御におけるヘテロクロマチンの機能が再認識されていた。

上記の背景から、**ヘテロクロマチン形成の要である HP1 に着目した**。ほ乳類において、HP1 は高度に保存された 3 種のホモログが存在する。HP1 がヘテロクロマチン形成に重要であることは数多くの研究から示されているが、これまで HP1 のホモログ全てのノックアウトはおこなわれておらず、HP1 の正確な機能は未知のままであった。そこで、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を用いて条件的に HP1 を全てノックアウト可能な HP1 完全欠損 ES 細胞を樹立し、ヘテロクロマチン形成における HP1 の機能の評価を試みた。その結果、HP1 の完全欠損により、H3K9me3 の消失とともにヘテロクロマチン構造がほぼ完全に欠損することを見出した (図 1)。このことから、**HP1 の完全欠損細胞の表現型を解析することで、ほ乳類特異的な H3K9me3 形成機構や、ヘテロクロマチン構造の意義を解明できる**と考えた。

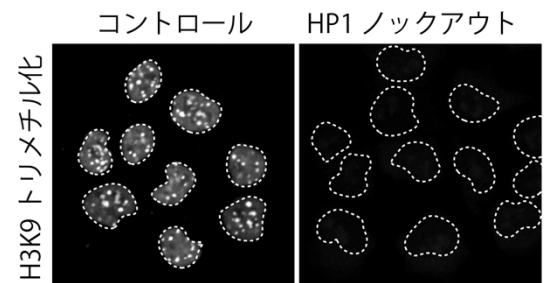


図 1. HP1 の完全欠損による H3K9me3 の消失
H3K9me3 は凝集し、ヘテロクロマチン構造を形成する (左)。HP1 の完全欠損により、それらの構造が消失する (右)。点線は核を示す。

2. 研究の目的

遺伝子発現制御におけるヘテロクロマチンの役割を確立する。そのために HP1 の真の機能を解明し、ヘテロクロマチンパターン形成の分子メカニズムを明らかにする。

3. 研究の方法

1. マウス ES 細胞における H3K9me3 形成機構の解明

HP1 の欠損による H3K9me3 の消失の程度を調べるために、CRISPR/Cas9 システムを用いて、H3K9me3 を修飾する酵素をノックアウトしたマウス ES 細胞を作製した。免疫染色や H3K9me3 の ChIP シーケンス解析をおこない、HP1 と H3K9 メチル化酵素の、H3K9me3 維持への寄与を調べた。RNA シーケンス解析をおこない、HP1 と H3K9 メチル化酵素の欠損により変動する遺伝子を調べた。H3K9me3 を認識するタンパク質として、HP1 ファミリーのほかに Cdy1 ファミリーと Mpp8 が存在する。HP1 を完全欠損可能な細胞をベースに、Cdy1 ファミリーや Mpp8 の多重ノックアウトを作製した。それらの細胞も同様に RNA シーケンス解析および H3K9me3 の ChIP シーケンス解析をおこなった。

2. 未分化/分化細胞における HP1 の機能の解析

H3K9me3 の局在や機能は、未分化細胞と分化細胞で異なることが報告されている。そこで、マウス ES 細胞 (未分化細胞) と比較するために、胎児線維芽細胞 (分化細胞) を材料に、H3K9 メチル化認識タンパク質 HP1 の欠損細胞を作製した。HP1 欠損後の細胞の増殖を計測した。

免疫染色やウエスタンブロット法により、両者における H3K9me3 の局在や量を調べた。RNA シーケンス解析により、HP1 欠損後に発現変動する遺伝子や、レトロトランスポソンの発現量を比較した。

4. 研究成果

1. マウス ES 細胞における H3K9me3 形成機構の解明

マウスの細胞には、H3K9me3 を修飾する酵素として Suv39h1/2 と Eset が存在する。Suv39h1 のノックアウトでは、H3K9me3 の凝集構造の消失がみられた(図 2)。一方で、Eset の単独ノックアウトにおいて H3K9me3 の顕著な減少はみとめられなかったが、Suv39h1/2 と Eset の重複ノックアウトにより、ほぼ完全に H3K9me3 が消失した。HP1 のノックアウトは、Suv39h1/2 や Eset の重複ノックアウトと同程度に H3K9me3 量が少なかったことから、HP1 はほぼ全ての H3K9me3 を制御していることが考えられた。RNA シーケンス解析により、HP1 のノックアウトと H3K9 メチル化酵素のノックアウトにより発現変動する遺伝子は共通したことから、HP1 は H3K9 メチル化酵素の活性制御因子であることが考えられた。

次に HP1 以外の H3K9me3 結合因子である Cdy1/Cdy12 や Mpp8 を HP1 のノックアウトに重ねて欠損させた。その細胞における発現変動遺伝子や H3K9me3 の量を HP1 ノックアウトのみの細胞と比較したが、顕著な違いはみられなかった。以上のことから、マウス ES 細胞において、HP1 は H3K9me3 によるヘテロクロマチン形成に不可欠な因子であることが明らかとなった。

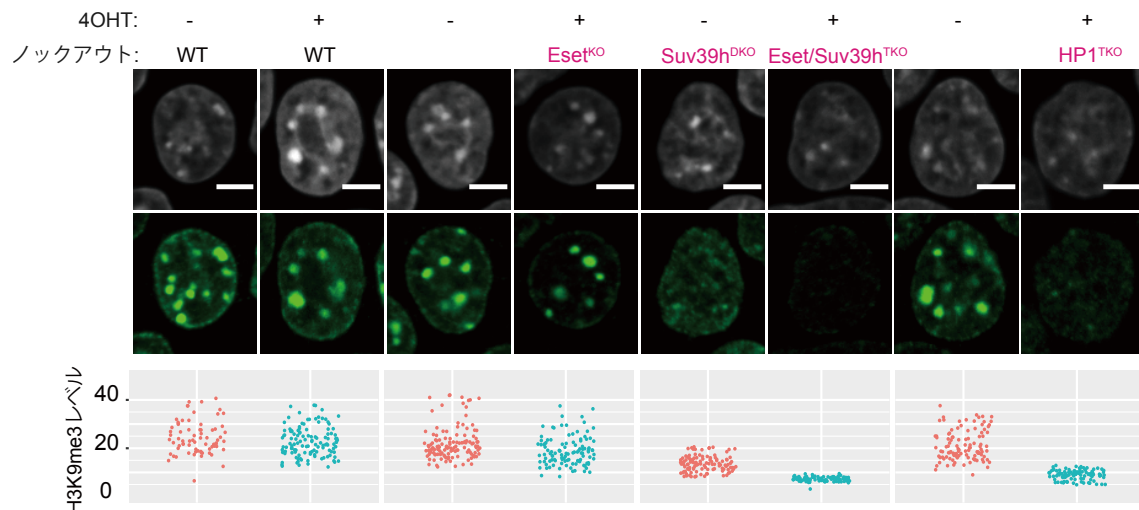


図 2. H3K9 メチル化酵素ノックアウトと HP1 ノックアウト細胞における H3K9me3 量の比較
Eset および HP1 の欠損は致死となるため、タモキシフェン(4OHT)による条件的ノックアウトをおこなった。
H3K9me3 の定量値を下に示す(n > 100 細胞)。

2. 未分化/分化細胞における HP1 の機能の解析

胎児線維芽細胞を用いて HP1 の完全欠損を作製し、H3K9me3 の量の変化をマウス ES 細胞と比較したところ、H3K9 メチル化修飾酵素や HP1 の欠損細胞は、いずれにおいても H3K9me3 の著しい減少を引き起こす一方で、発現変動する遺伝子は大きく異なることが判明した。また、ES 細胞ではこれらの遺伝子の欠損によりレトロトランスポソンの発現が大きく上昇するのに対して、胎児繊維芽細胞ではほとんどみとめられなかった。これらの結果から、分化細胞と未分化細胞では、H3K9me3 による遺伝子の発現制御機能が異なり、未分化細胞では、レトロトランスポソンの抑制に対して HP1-H3K9me3 機構の寄与が大きいことが考えられた。この分子メカニズムを解明することで、分化する過程におけるヘテロクロマチンの機能を明らかにできると考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuroki S, Nakai Y, Maeda R, Okashita N, Akiyoshi M, Yamaguchi Y, Kitano S, Miyachi H, Nakato R, Ichiyangi K, Shirahige K, Kimura H, Shinkai Y, Tachibana M.	4. 巻 10
2. 論文標題 Combined loss of Jmjd1a and Jmjd1b reveals critical roles for H3K9 demethylation in the maintenance of embryonic stem cells and early embryogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Stem Cell Rep	6. 最初と最後の頁 1340-1354
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.stemcr.2018.02.002	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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----