

平成23年 5月25日現在

機関番号： 82401
 研究種目： 若手研究(A)
 研究期間： 2007～2010
 課題番号： 19687001
 研究課題名(和文) ヘテロクロマチン構造の確立と維持を制御する分子機構
 研究課題名(英文) The molecular mechanisms of heterochromatin establishment and maintenance
 研究代表者
 中山 潤一 (NAKAYAMA JUN-ICHI)
 独立行政法人理化学研究所・クロマチン動態研究チーム・チームリーダー
 研究者番号： 60373338

研究成果の概要(和文)：本研究では、真核生物の染色体機能やエピジェネティックな遺伝子発現制御に重要なヘテロクロマチンが、どのように確立・維持されるのか、そのメカニズムの解明を目指した。クロマチン研究の優れたモデルである分裂酵母を用いた遺伝学的なスクリーニングによって、ヘテロクロマチン形成に必要な新規 RNAi 関連因子の単離に成功した。また変異体を用いた遺伝学的解析から、この新規因子がどのようにヘテロクロマチン形成を制御しているのか、その分子メカニズムの詳細が明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In this research program, we tried to gain a better understanding of the molecular mechanisms underlying the establishment and maintenance of higher-order chromatin structure, heterochromatin. Using fission yeast as an model organism, we employed an genetic screening and successfully identified novel RNAi-related factors involved in heterochromatin assembly. Further genetic analyses of mutant cells uncovered a novel insight into the molecular mechanisms of how RNAi effector complexes are recruited to the heterochromatin.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2008年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2009年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
2010年度	4,700,000	1,410,000	6,110,000
年度			
総計	19,200,000	5,760,000	24,960,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：遺伝子、発現制御、ヘテロクロマチン、RNA 干渉、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体に存在する高度に凝縮

したヘテロクロマチンは、染色体の恒常性維持ばかりでなくエピジェネティックな遺伝子発現制御にも重要な役割を果たしている。近年このヘテロ

クロマチン構造の形成に、その領域からの RNA の転写と、RNA 干渉 (RNAi) として知られる機構の関与が明らかにされた。生化学的解析によって RNAi 経路で働く中心的な因子が同定され、ヘテロクロマチン形成を制御する機構については徐々に明らかにされてきた。しかし、どのように RNA のシグナルがクロマチン構造変換を導くのか、その分子メカニズムの詳細については依然不明な点が数多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、ヘテロクロマチン研究の優れたモデルである分裂酵母を用い、遺伝学的なスクリーニングによってヘテロクロマチン形成を制御する新規因子の単離を試みるとともに、生化学的手法によって新規に単離された因子の機能解析を行い、RNAi 機構がどのようにヘテロクロマチン構造の確立と維持を制御しているのか、その分子メカニズムの詳細を明らかにする事を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規 RNAi 関連因子の単離と機能解析: ヘテロクロマチン形成に関わる因子の変異体では、ヘテロクロマチンに挿入したマーカー遺伝子の発現抑制 (サイレンシング) が解除される。特に RNAi 関連因子の場合、セントロメア特異的にこのサイレンシングの解除が観察される。そこでまず染色体の複数のヘテロクロマチン領域にマーカー遺伝子を挿入した酵母株を作製し、さらにこの酵母を変異源である MMS で処理することで、セントロメア特異的にサイレンシングが解除される変異体の単離を試みた。実際に変異体が単離されたら、次に各変異体に分裂酵母のゲノムライブラリーを導入し、サイレンシングの回復を指標として原因遺伝子の同定を進めた。原因遺伝子が同定された場合、その変異体と遺伝的に相互作用する遺伝子の単離・同定を試み、RNAi 機構がどのようにヘテロクロマチン形成を制御しているのか、その機構の解明を目指した。

(2) ヘテロクロマチン様局在を示す新規因子 Grc3 の機能解析: 分裂酵母の Grc3 は、網羅的な発現解析によってヘテロクロマチン様のドット局在を示すことが報告されている。一方他の生物種において、Grc3 と相同の因子がリボソーム RNA の代謝に関わることが示唆されている。Grc3 がどのように RNA の代謝を制御しヘテロクロマチンの形成に関与するのか、その詳細を明らかにするため、まず細胞生物学的な手法によって Grc3 の局在を解析するとともに、ヘテロクロマチン因子との関連について調べた。また生化学的解析によって Grc3 と相互作用する因子の単離を試みた。さらに *grc3* の温度感受性

変異株を単離し、変異がヘテロクロマチンやリボソーム生合成に及ぼす影響を調べるとともに、遺伝学的に相互作用する因子の単離を試みた。

4. 研究成果

(1) 新規 RNAi 関連因子の単離と機能解析: RNAi 機能に関わる因子の変異体に特徴的な、セントロメアのサイレンシングに異常が見られる変異体をスクリーニングし、65 個の変異体の単離に成功した。実際にセントロメア由来の RNA の発現を確認したところ、ほとんど全ての変異体でセントロメア由来の RNA が高発現していることから、これらは RNAi に関わる因子の変異体と考えられる。実際に分裂酵母の遺伝子ライブラリーを導入し表現型の回復を指標に原因遺伝子をの同定を試みたところ、*ago1+*や *dcr1+*など RNAi の中心的な因子をコードする遺伝子の変異体に加え、これまで機能解析がほとんど行われていない新規因子 *Ers1* の変異体が同定された。この *ers1* 変異体を用いて、*ers1* と遺伝的に相互作用する因子の解析を進めた。その結果、*Ers1* が RNA 依存 RNA ポリメラーゼ複合体 (RDRC) をヘテロクロマチンにリクルートする過程に重要な役割を果たす事が明らかになった。本研究の成果は、機能未知の因子 *Ers1* の役割を明らかにしたばかりでなく、どのように RNAi 関連因子がヘテロクロマチンへリクルートされるのか、これまでその詳細が不明であった分子メカニズムの一端を明らかにした画期的な成果と考えられる。

(2) ヘテロクロマチン様局在を示す新規因子 Grc3 の機能解析: 分裂酵母の Grc3 とヘテロクロマチンとの機能的な関連を解明するため、まず Grc3 の細胞内局在について解析を進めた。その結果、Grc3 は核内でドット状の局在を示すこと、このドットがヘテロクロマチン因子である *Swi6* と共局在すること、さらに Grc3 の局在が *swi6* の変異で消失する事が明らかになった。この結果は Grc3 が *Swi6* 依存的にヘテロクロマチンに局在していることを示す結果である。*grc3* の温度感受性変異株を単離しその解析を進めた結果、Grc3 はリボソーム RNA の生合成とヘテロクロマチンサイレンシングの両方の過程を制御している事が明らかになった。Grc3 を用いた生化学的解析から、Grc3 と同様に RNA の代謝に関わることが示唆されていた IPI 複合体や *Las1* が Grc3 と相互作用している事が明らかになった。またこれらの変異体が *grc3* 変異体と非常によく似た表現型を示すことを明らかにした。本研究は、Grc3 を中心とする RNA のプロセッシング過程が、ヘテロクロマチンの形成とリボソーム RNA の成熟過程に関わるといふ、これまで注目されてこなかった細胞内プロセスの連携を明らかにした成果である。

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 12 件)

- ① Kitano, E., Hayashi, A., Kanai, D., Shinmyozu, K., and Nakayama, J. Roles of fission yeast Grc3 protein in ribosomal RNA processing and heterochromatin gene silencing. *J. Biol. Chem.* 286, 15391-15402 (2011) 査読有
- ② Hiragami-Hamada, K., Shinmyozu, K., Hamada, D., Tatsu, Y., Uegaki, S., Fujiwara, S. and Nakayama, J. N-terminal phosphorylation of HP1 α promotes its chromatin binding. *Mol. Cell. Biol.* 31, 1186-200 (2011) 査読有
- ③ Hayakawa, T. and Nakayama, J. Physiological roles of Class I HDAC complex and Histone demethylase. *J. Biomed. Biotech.* 2011, 129383 (2011) 査読有
- ④ Shirai, A., Sadaie, M., Shinmyozu, K. and Nakayama, J. Methylation of ribosomal protein L42 regulates ribosomal function and stress-adapted cell growth. *J. Biol. Chem.* 285, 22448-60 (2010) 査読有
- ⑤ Hayakawa, T., Zhang, F., Hayakawa, N., Ohtani, Y., Shinmyozu, K., Nakayama, J., and Andressen, P.R. MRG15 directly binds to PALB2 and stimulates homology-directed repair of chromosomal breaks. *J. Cell Sci.* 123, 1124-1130 (2010) 査読有
- ⑥ Okada, S., Nagabuchi, M., Takamura, Y., Nakagawa, T., Shinmyozu, K., Nakayama, J., and Tanaka, K. Reconstitution of Arabidopsis thaliana SUMO pathways in E. coli: functional evaluation of SUMO machinery proteins and mapping of SUMOylation sites by mass spectrometry. *Plant Cell Physiol.* 50, 1049-1061 (2009) 査読有
- ⑦ Shimada, A., Dohke, K., Sadaie, M., Shinmyozu, K., Nakayama, J., Urano, T., and Murakami, Y. Phosphorylation of Swi6/HP1 regulates transcriptional gene silencing at heterochromatin. *Genes Dev.* 23, 18-23 (2009) 査読有
- ⑧ Hayashi, M.T., Takahashi, T.S., Nakagawa, T., Nakayama, J., and Masukata, H. The heterochromatin protein Swi6/HP1 activates replication origins at pericentromeres and silent mating-type locus. *Nat. Cell Biol.* 11, 357-62 (2009) 査読有
- ⑨ Sadaie, M., Kawaguchi, R., Ohtani, Y., Arisaka, F., Tanaka, K., Shirahige, K., and Nakayama, J. Balance between distinct HP1 family proteins controls heterochromatin assembly in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6973-88 (2008) 査読有
- ⑩ Iida, T., Nakayama, J., and Moazed, D. siRNA-mediated heterochromatin establishment requires HP1 and is associated with antisense transcription. *Mol. Cell* 31, 178-189 (2008) 査読有
- ⑪ Sadaie, M., Shinmyozu, K. and Nakayama, J. A conserved SET-domain methyltransferase, Set11, modifies ribosomal protein Rpl12 in fission yeast. *J. Biol. Chem.* 283, 7185-7195 (2008) 査読有
- ⑫ Chikashige, Y., Nakayama, J. (8人中5番目), and Hiraoka, Y. Gene expression and distribution of Swi6 in partial aneuploids of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. *Cell Struct. Funct.* 32, 149-161 (2008) 査読有

〔学会発表〕 (計 6 件)

- ① 中山潤一, 「高次クロマチン構造形成におけるクロモドメインタンパク質の役割」 第33回日本分子生物学会, 第83回日本生化学会合同年会, 2010年12月9日, 神戸市
- ② 中山潤一, 「Chromodomain proteins and RNAi-mediated heterochromatin assembly」 第32回日本分子生物学会年会, 2009年12月9日, 横浜市
- ③ 中山潤一, 「Distinct roles of chromodomain proteins in the formation of higher-order chromatin structure」, The 5th International Fission Yeast Meeting, 2009年10月29日, 東京都
- ④ 中山潤一, 「Distinct roles of chromodomain proteins in the formation of higher-order chromatin structure」, 第21回内藤カンファレンス, 2008年6月26日, 北杜
- ⑤ 中山潤一, 「高次クロマチン構造形成とRNA代謝ネットワーク」, 第2回日本エピジェネティクス研究会年会, 2008年5月10日, 三島市
- ⑥ 中山潤一, 「分裂酵母ヘテロクロマチン構造形成には2つのHP1タンパク質の別個の機能が必要である」, 第30回日本分子生物学会年会, 第80回日本生化学会合同年会, 2007年12月12日, 横浜市

〔図書〕 (計 7 件)

- ① 中山潤一「高次クロマチン構造とノンコーディング RNA」細胞工学 2011 年 7 月号 (印刷中)、2011 (学研メディカル秀潤社)
- ② 中山潤一, 「3 章 概観と概念 (Overview and Concept)」『エピジェネティクス (堀越正美 監訳)』p27-73, 培風館 (2010)
- ③ 中山潤一, 染色体サイクルのクロマチン制御: 概論, 蛋白質核酸酵素増刊「染色体サイクル」(正井久雄、升方久夫、釣本敏樹、仁木宏典、篠原彰編), 54 巻, 485-487, 2009 (共立出版)
- ④ 中山潤一, 「高次クロマチンの形成機構とエピジェネティック制御」蛋白質核酸酵素 2008 年 6 月号, 53 巻, 801-808, 2008 (共立出版)
- ⑤ 石田真由美・中山潤一, 「小分子 RNA とクロマチン動態」, 無敵のバイオテクニカルシリーズ『RNA 実験ノート (稲田利文・塩見春彦編)』16-17 (2008) (羊土社)
- ⑥ 定家真人・中山潤一, 「ヒストンのメチル化修飾と高次クロマチン構造の形成機構」蛋白質核酸酵素 2007 年 6 月号, 52 巻, 739-746, 2007 (共立出版)
- ⑦ 飯田哲史・中山潤一, RNAi によるヘテロクロマチン制御機構, 実験医学増刊「染色体サイクル」(正井久雄・渡辺良典編), 25 巻, 186-190, 2007 (羊土社)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中山 潤一 (NAKAYAMA JUN-ICHI)
独立行政法人理化学研究所・クロマチン動態
研究チーム・チームリーダー
60373338