

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23767

研究課題名（和文）単細胞真核生物の世代交代における表現系切換えのエピジェネティクス制御

研究課題名（英文）Epigenetic regulation of phenotypic switching in a unicellular eukaryote

研究代表者

廣岡 俊亮（Hirooka, Shunsuke）

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任助教

研究者番号：70843332

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：ポリコム複合体2（PRC2）を介したヒストンH3の27番目リジンのトリメチル化修飾（H3K27me3修飾）は単細胞から多細胞の真核生物に共通の遺伝子抑制機構である。単細胞生物におけるH3K27me3修飾はトランスポゾン等の外来配列の不活化が主な役割だと考えられているが、未だに不明な点が多い。本研究では、独自に開発を進めている単細胞真核生物を用いてH3K27me3修飾を受ける遺伝子の探索を行った。その結果、H3K27me3修飾が1倍体、2倍体の表現系切換えに関与している可能性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単細胞真核生物におけるH3K27me3修飾はトランスポゾン等の外来配列の不活化が主な役割だと考えられており、分化等の細胞形態の表現系切換えの制御は多細胞生物が独自に発展させた機能だと考えられていた。しかしながら、本研究では単細胞真核生物においてH3K27me3修飾が1倍体、2倍体の表現系切換えに関与している可能性を示唆する結果を得ており、単細胞から多細胞における真核生物一般におけるエピジェネティクス制御の理解につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Tri-methylation of lysine 27 of histone H3 (H3K27me3) is a mark deposited by Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), which are highly conserved in both unicellular and multicellular organisms. In unicellular eukaryotes, it is considered that the role of H3K27me3 has been in defense responses against transposable elements and other genomic parasites. In this study, we investigated genes marked by H3K27me3 modification in certain unicellular eukaryote, and found that H3K27me3 modification may be involved in the phenotypic switching.

研究分野：遺伝子発現

キーワード：エピジェネティクス制御 単細胞真核生物

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスはDNAの塩基配列の違いによらない遺伝子発現の多様性を生み出すしくみであり、細胞分化、トランスポゾン、外来ゲノム配列の不活化等において重要な役割を果たしていることが明らかにされてきた。ヒストン修飾による遺伝子発現制御は真核生物特有のエピジェネティクス機構であり、中でもポリコーム複合体2 (PRC2) を介したヒストン H3 の 27 番目リジンのトリメチル化修飾 (H3K27me3 修飾) による遺伝子発現抑制は多細胞生物における個体発生、細胞分化に関わる重要なヒストン修飾である。しかしながら、モデル単細胞生物である酵母に本系が存在しないことから、長らく多細胞生物特有の制御機構だと考えられてきた。ところが、近年のゲノム解析研究により、幅広い系統の単細胞真核生物が PRC2 を有すること、つまり H3K27me3 修飾が単細胞から多細胞の真核生物に共通の機構であることが分かり、その真核生物における起源的な機能が注目されるようになり、研究が進み始めた。そして、近年の研究から単細胞生物における H3K27me3 修飾はトランスポゾン等の外来配列の不活化が主な役割だと考えられるようになった。しかしながら、単細胞真核生物の H3K27me3 修飾に関する研究は未だに少なく、詳細な理解には程遠いのが現状である。

2. 研究の目的

我々が独自に株の樹立及び開発を進めてきた単細胞真核生物は 1 倍体と 2 倍体で表現系切換えが起こる (主に形態的特徴が変化)。この表現系切換えがどのように制御されているのかを明らかにすることを旨とし、研究を行う過程で、H3K27me3 修飾が 1 倍体と 2 倍体の表現型切換えに関与している可能性を見いだした。そこで本研究では、1 倍体と 2 倍体の表現系切換えに関わる遺伝子群の発現制御と H3K27me3 修飾の関係を明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

(1) トランスクリプトーム解析を用いた 1 倍体及び 2 倍体特異的発現遺伝子の同定

対象とする単細胞真核生物において、1 倍体と 2 倍体の表現系切換えに関わる遺伝子群を網羅的に明らかにする為に、1 倍体及び 2 倍体それぞれのトランスクリプトームデータ (増殖期の細胞) を RNA-Seq により取得し、比較解析を行う。

(2) ChIP-Seq 解析を用いた H3K27me3 修飾を受ける遺伝子群の同定

H3K27me3 修飾を受けている遺伝子群を明らかにする為に、ヒストン修飾抗体 (抗 H3K27me3 抗体) を用いた ChIP-Seq 解析を 1 倍体、2 倍体のそれぞれで行う。これらの結果と比較トランスクリプトーム解析の結果を対応させることで、H3K27me3 修飾と 1 倍体、及び 2 倍体特異的発現遺伝子群の発現制御にどのような関係があるのかを明らかにする。

(3) 遺伝子破壊株の作成と表現型の観察

表現系の切換えに関わる遺伝子群の抑制に関与している事が予想される H3K27me3 修飾を解除することで、遺伝子発現パターン及び細胞形態がどのように変化するのかを解析する。その為に、H3K27me3 修飾に関わるポリコーム抑制複合体 2 (PRC2) のヒストンメチル化酵素 E(z) の遺伝子破壊株を 1 倍体において作成する。遺伝子が破壊されているか PCR によって確認後、抗 H3K27me3 抗体を用いたイムノプロットにより、H3K27me3 のシグナルが消失しているかを確認する。その後、顕微鏡下での細胞形態の観察、野生株及び E(z) 遺伝子破壊株それぞれのトランスクリプトームデータ (増殖期の細胞) を RNA-Seq により取得し、比較解析を行う。

(4) ゲノム上の複数箇所を編集する技術の開発

後述のようにゲノム上の複数箇所を編集する必要が生じた為、導入した薬剤マーカー遺伝子を除去する方法の開発を行う。酵母等で使われている自殺遺伝子 HSVtk (単純ヘルペスウイルス由来チミジンキナーゼ) は細胞毒性の弱い 5Fdu を細胞毒性の強い 5 FdUMP に変換する為、HSVtk が発現する細胞を 5Fdu の添加により選択的に除去することが可能である。そこで、マーカー配列 (HSVtk + 薬剤マーカー) の上流と下流に 250bp の相同配列を組みこんだ株を作成する。この株を薬剤無し培地で暫く培養することで、相同配列間で組み換えが起こり、マーカー配列が完全に抜け落ちた細胞が低頻度で生じる。その後、5Fdu を添加した培地で培養すると、マーカーが残っている細胞は生育できない為、マーカー配列が完全に抜け落ちた細胞だけを選択することが出来る。

4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析を用いた 1 倍体及び 2 倍体特異的発現遺伝子の同定

1 倍体、2 倍体の比較トランスクリプトーム解析の結果、約 70 個の 1 倍体特異的発現遺伝子、約 200 個の 2 倍体特異的発現遺伝子を同定することが出来た。1 倍体特異的発現遺伝子群の中には 2 個の転写因子、シグナル伝達に関わると考えられる遺伝子等が含まれ、2 倍体特異的発現遺伝子群の中には 5 個の転写因子、細胞壁合成、シグナル伝達に関わると考えられる遺伝子等が含まれていることが明らかになった。

(2) ChIP-Seq 解析を用いた H3K27me3 修飾を受ける遺伝子群の同定

抗 H3K27me3 抗体を用いた ChIP-Seq 解析の結果、1 倍体、2 倍体の両方で、テロメア、サブテロメア領域が H3K27me3 修飾を受けていることを明らかにすることが出来た。また、それら以外の領域においては 2 倍体特異的に発現する遺伝子群の多くが 1 倍体においてのみ、H3K27me3 修飾を受けていることを明らかにすることが出来た。本結果は、H3K27me3 修飾による遺伝子群発現制御機構によって、2 倍体(発現 ON)と 1 倍体(発現 OFF)の表現型が切換えられる可能性を示唆している。

(3) 遺伝子破壊株の作成と表現型の観察

相同組み換えによる遺伝的改変技術を用いて $E(z)$ 遺伝子破壊株を作成した。抗 H3K27me3 抗体を用いたイムノプロット解析を行ったところ、野生株と比較して $E(z)$ 遺伝子破壊株においては H3K27me3 レベルの顕著な低下を確認できたが、そのシグナルは完全には消えていなかった。続いて、野生株と $E(z)$ 遺伝子破壊株の形態観察と比較トランスクリプトーム解析を行ったが、どちらにおいても顕著な違いは見られなかった。理由として以下の 2 つが考えられた。

H3K27me3 のシグナルが完全には消失していない為、発現抑制機構の解除が不十分であった可能性。対象とする生物のゲノム上には $E(z)$ 遺伝子以外にもターゲット不明のヒストンメチル化酵素遺伝子が 4 個存在する為、これらの何れかが H3K27me3 修飾に関与している可能性が考えられた。

H3K27me3 修飾による発現抑制機構の解除に加え、発現を誘導する為の機構(転写因子等の発現等)が活性化されていない可能性。2 倍体特異的に発現する 5 個の転写因子(4 個は H3K27me3 修飾を受けており、1 個は受けていない)が存在することから、これらの転写因子を強制発現させることで 2 倍体特異的発現遺伝子の転写を活性化させることが出来る可能性がある。

上記の可能性を検討する為に、ゲノム上の複数箇所を編集する必要が生じた為、その開発を進めた。

(4) ゲノム上の複数箇所を編集する技術の開発

使用できる薬剤マーカー遺伝子に限りがある為、複数箇所の編集を行う為には、導入した薬剤マーカー遺伝子を除去する必要があった。マーカー配列(HSVtk+ 薬剤マーカー)の上流と下流に 250bp の相同配列を組みこんだ株(HSVtk 株)を作成した。5Fdu を添加した培地で野生株と HSVtk 株を培養したところ、HSVtk 株は野生株と比較し、低濃度の 5Fdu 存在下で生育阻害を起こすことが確認された。HSVtk 株を薬剤無し培地で暫く培養した後に、5Fdu 存在下で 3 週間培養したところ、僅かながら細胞の増殖が確認された。これらの細胞を単離し、マーカー配列が除去されている事を PCR で確認した。

本系を用いることで、ゲノム上の複数箇所の編集が可能になり、今後の表現系切換え機構の解明を目指す上で、強力なツールとなるはずである。これまで適切な研究材料の欠如により未解明であった、単細胞真核生物における、エピジェネティクス制御によるゲノムワイドな遺伝子発現切換え、その結果としての 1 倍体と 2 倍体の表現系切換え機構を明らかにする最適なモデル系となることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

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

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