

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21247001

研究課題名（和文）動的クロマチン高次構造であるヘテロクロマチンの構造・機能ネットワークの解明

研究課題名（英文）Analysis of dynamic structure-function network of heterochromatin

研究代表者

村上 洋太 (Murakami Yota)

北海道大学・大学院理学研究院・教授

研究者番号：20260622

研究成果の概要（和文）：

ヘテロクロマチンは遺伝子発現制御や遺伝情報維持に重要なクロマチン高次構造である。本研究はモデル生物である分裂酵母を用いて RNAi 機構に依存して形成されるヘテロクロマチンに着目しその形成・機能の解明を目指した。その結果、RNAi 依存ヘテロクロマチン形成過程およびヘテロクロマチン内転写の制御で機能する転写関連因子ネットワークの一部を明らかにした。また新規因子の機能解析から核膜近傍に「RNAi 依存ヘテロクロマチン形成場」が作られるという新規概念を提唱した。

研究成果の概要（英文）：

Heterochromatin is an important for epigenetic gene regulation and maintenance of genetic information. Using fission yeast as a model organism, we focused on RNAi-directed heterochromatin formation and tried to understand the molecular mechanism of its formation and function. We revealed a part of network of transcription factors that regulate the formation and function of heterochromatin. In addition, we also presented a novel concept: factory for RNAi-directed heterochromatin formation is formed at nuclear periphery.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	13,400,000	4,020,000	17,420,000
2010 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2011 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
年度			
年度			
総計	33,200,000	9,960,000	43,160,000

研究分野：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：ヘテロクロマチン、RNAi

1. 研究開始当初の背景

ゲノム上で多様なクロマチン高次構造が動的に変化することにより、細胞の増殖分化が調節され細胞ごとの個性を作り出している。クロマチン高次構造のなかでも特異な凝

縮した構造をもつヘテロクロマチンは従来「不活性」なクロマチン構造としてとらえられてきたが、近年の研究から非常にダイナミックな構造体であり、エピジェネティックな遺伝子発現制御、反復配列やトランスポゾンか

らのゲノムの保護、染色体分配維持など多彩な機能を持つことが明らかになってきた。そしてその構造形成・維持・機能に non-coding RNA を含む非常に多くの因子が寄与していることもわかってきた。

ヘテロクロマチン研究には高等真核細胞と類似しつつも単純なヘテロクロマチンを持ち、遺伝学的解析が容易な分裂酵母がモデル生物として大きな役割を果たしてきた。特にヘテロクロマチン領域で non-coding RNA(ncRNA)の転写がおこり、それをもとに機能する RNAi 機構がヘテロクロマチン形成に関与するという発見は、驚きを持って迎えられた。そしてこのシステムは近年注目を集める ncRNA の機能を考える上で重要な知見である。図 1 に RNAi 依存ヘテロクロマチン形成機構の概略を示す。

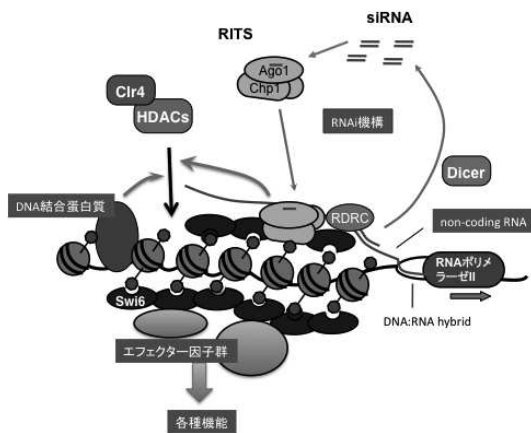


図 1. 分裂酵母ヘテロクロマチン形成モデル
ヘテロクロマチン形成には DNA 結合蛋白質依存性機構と RNAi 依存性機構の二つがある。どちらも最終的にヘテロクロマチン特異的ヒストン修飾に必要な酵素(ヒストンメチル化酵素, Clr4; ヒストン脱アセチル化酵素, HDAC) をクロマチンに呼び込む。さらに修飾されたヒストンをヘテロクロマチン蛋白質 Swi6 (HP1 ファミリー蛋白質) が認識結合する。RNAi 経路ではヘテロクロマチンで転写される ncRNA から RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RDRC)、Dicer により siRNA が合成される。この siRNA を取り込んだ RITS 複合体が DNA:RNA hybrid を作りクロマチンに結合する ncRNA に結合し Clr4, HDAC および RDRC の呼び込みをおこなう。ヘテロクロマチンの様々な機能はヘテロクロマチンに結合する種々の effector 因子により担われている。

我々は分裂酵母ヘテロクロマチン関連因子の同定や、RNAi 依存性ヘテロクロマチンにおける ncRNA の動態の解析をおこなってきて、いくつかの、興味深い因子や現象を発見し報告してきた。そして、新規の因子特に RNAi に関与する因子を次々に発見している。これらのことから、ヘテロクロマチンは想像以上にダイナミックで複雑な構造体であり、予期せぬメカニズムの発見も期待できると考えている。そこで、今までの研究をより推進し、各因子のさらなる同定と、因子間の物理的ネットワークをシステムティック

に展開することが重要と考え、本研究課題の提案に至った。

2. 研究の目的

本研究課題は分裂酵母をモデルとして、ヘテロクロマチンの形成と機能制御に関与する因子群をできる限り網羅的に同定し、さらにそれらの因子が形成する複雑なネットワークの一端を明らかにしようとするものである。

3. 研究の方法

- (1) 遺伝学的スクリーニングによりヘテロクロマチン関連因子を同定する。また同定した因子のうち重要性が高いと予想される因子について物理的に相互作用する因子を two hybrid 法、複合体精製～質量分析の方法を使い同定していく。
- (2) 生化学的にヘテロクロマチンを精製単離する方法を確立し、ヘテロクロマチンに結合する因子群の同定を試みる。
- (3) それぞれの因子がヘテロクロマチンの形成過程、機能制御のどのステップに関与するか判定し、分類をおこなう。
- (4) 特に RNAi ヘテロクロマチンに特異的に関与する因子群および、サイレンシング、姉妹染色体着などヘテロクロマチン機能に関与する因子群に焦点を絞り、それらの因子間の物理的・機能的ネットワークを明らかにする。

4. 研究成果

【ヘテロクロマチン因子のスクリーニング】
上記計画した (1) (2) のヘテロクロマチン因子のスクリーニングのうち、(2) の生化学的手法については、ヘテロクロマチンの精製手法の確立ができなかった。ひとつには後述するようにヘテロクロマチンは核膜と相互作用しているため精製に必要な可溶化が困難であったことがある。さらに、可溶化の条件を詳細に探す必要があるであろう。(1) の遺伝学的スクリーニングについては、ヘテロクロマチン変異株のスクリーニングをおこない、RNAi 依存性ヘテロクロマチン形成にかかわる新規因子 Dsh1 の同定に成功した。また、逆遺伝学的手法からは転写調節因子が数多く同定した。

【同定した因子の機能解析と機能的ネットワーク】
遺伝学的手法により同定された因子さらに既知の因子も含め他因子間の機能解析をおこない、ヘテロクロマチン形成・調節にかかわる興味深い知見が数多く得られた。以下にその詳細をまとめる。

(1) 新規因子 Dsh1 と RNAi 依存ヘテロクロマチンにおける siRNA 増幅場の形成 (Kawakami et al. Genes Dev, in revision)

EMS 処理により変異を導入した細胞からヘテロクロマチンに異常を示す変異株のスクリーニングをおこない、9 株の変異株を得た。そのうち、典型的なヘテロクロマチン異常の表現型を示す株 2 株について、遺伝学的マッピングと DNA シークエンシングをおこない、原因遺伝子を突き止めたところ 1 株は既知の遺伝子 *dcr1* であったが、もう一株は新規遺伝子 SPBC582.04c であり *dsh1* (defect in silencing at heterochromatin 1) と名付けさらに詳細な解析を進めた。他の 7 株は現在科学研究費「ゲノム支援」の支援を得て Deep sequencing による原因遺伝子の同定をおこなっている。

Dsh1 破壊株ではヘテロクロマチン特異的ヒストン修飾である Histone H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9me) の減少とヘテロクロマチン由来の siRNA の消失、ヘテロクロマチン ncRNA の蓄積が見られた。この表現型は RNAi 因子の *dcr1* 破壊株と同一で、Dsh1 は Dcr1 と同様に RNAi 依存性ヘテロクロマチン形成の必須因子であることが明らかとなった。さらに詳細な解析をおこなったところ、Dsh1 はヘテロクロマチン ncRNA から二本鎖 RNA を合成する複合体 RDRC とその二本鎖 RNA から siRNA を合成する Dcr1 と相互作用しつつ、ヘテロクロマチンに結合することで、ヘテロクロマチン上で両者の反応を効率よく共役させて siRNA の増幅過程を推進していることが明らかとなった。また、Dsh1 は膜貫通ドメインによく似たドメイン (TML ドメイン) をもち、TML ドメイン依存的に核膜内膜近傍に局在し Dcr1 と結合している。TML ドメインの欠により Dsh1 の核膜局在が失われると、RNAi 依存性ヘテロクロマチン形成がおこらない。つまり、ヘテロクロマチン形成に必要な siRNA の増幅は核膜内側に局在するヘテロクロマチン上の「siRNA 増幅場」あるいは「RNAi 依存ヘテロクロマチン形成場」とも言うべき構造体でおこり、Dsh1 はその場を形成する主要因子であると考えられた (図 2)。

siRNA amplification factory

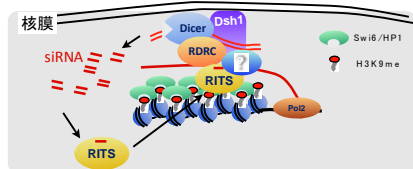


図2. RNAi依存ヘテロクロマチン形成場

ほぼすべての真核細胞でヘテロクロマチンは核膜近傍に局在が知られているが、その生理的意味は知られていなかった。本研究はそ

の意義の一端を明らかにしたものである。

(2) 核膜とヘテロクロマチンの関連

Dsh1 の解析から、ヘテロクロマチン制御における核膜の重要性があきらかとなった。さらにこの観点から解析を進め、以下の結果を得ている。

① ヘテロクロマチンの核膜局在は広く真核生物で保存されているがその機構は明らかではない。前述の「siRNA 合成場」の結果から RNAi 因子やヘテロクロマチン形成が核膜局在に及ぼす影響を検討した結果、RNAi 因子やヘテロクロマチン形成因子がヘテロクロマチンの核膜局在に重要であることがわかった。しかし、同時に他の機構もヘテロクロマチンの核膜近傍局在に機能していると考えられる。(Kawakami et al. unpublished data)

② 核膜のヘテロクロマチン形成への関与を調べるために既知の核膜内膜蛋白質 Imal, Lem2, Man1 の遺伝子破壊をおこない、ヘテロクロマチンへの影響を調べた。その結果 Lem2 破壊によりセントロメアヘテロクロマチン形成が阻害され、核膜蛋白質が何らかの形でヘテロクロマチン形成に関与することが示唆された。(Higashi unpublished data)

以上の結果は核膜機能とヘテロクロマチン機能に密接な関連があることを強く示唆している。ヘテロクロマチン解析のひとつの方向性を示していると考えている。

(3) 転写制御関連因子と RNAi 依存ヘテロクロマチン形成

我々以前 RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) が RNA 依存ヘテロクロマチン形成に重要な ncRNA の転写をおこない、その ncRNA から siRNA を合成する過程に関与する事を示した (Kato, Science 2005)。RNAPII の転写制御には多くの因子が関わるが、これらの中にはヘテロクロマチン形成に重要な因子が存在する可能性があると考えた。そこで、逆遺伝学的手法により既知の転写制御関連因子からヘテロクロマチンに影響を与える因子を複数同定した。それらの因子のうち比較的解析が進んだ物について以下にまとめる。

① CTD リン酸化 (Kajitani et al. in preparation)

CTD は 7 アミノ酸からなる配列の繰り返しで真核細胞の RNAPII に共通してみられ、分裂酵母では 26 回繰り返している。繰り返し配列の 2, 5, 7 番目のセリンがリン酸化修飾を受ける。2, 5 番目のリン酸化の機能は表 1 に示すように解析が進んでいるが 7 番目のリン酸化についてはその機能ははっきりとはわかっていない。

ベルギー Namur 大学の D. Hammand 博士との

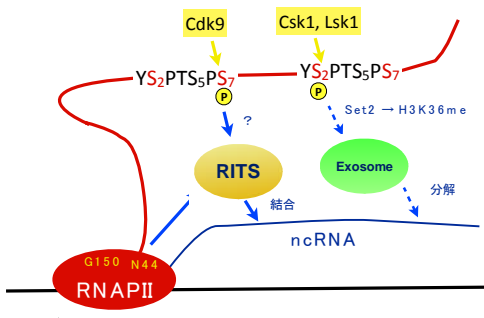
共同研究により CTD のリン酸化をうけるセリンをアラニンに置換した変異を作成したところ、5 番目のセリンの変異株 (S5A) は致死であったが、2、7 番目のセリンの置換変異株 (S2A, S7A) は生育可能で、この二つの株についてヘテロクロマチンにおよぼす効果について詳細な解析をおこなった。

		S2P	S5P	S7P
kinase	mamal	CDK9	CDK7, CDK8	?
	<i>S. pombe</i>	Cdk9, Lsk1	Mcs6, Srb11	?(Cdk9?)
Function		Elongation Termination 3' processing	initiation 5'-capping	snRNA, snoRNA?

表1 RNAポリメラーゼII CTDのリン酸化
Rpb1のCTDリン酸化部位のキナーゼと機能をまとめた。赤字は本研究の逆遺伝学的解析からヘテロクロマチンに関与することが判明したキナーゼ遺伝子

S2A, S7A 両変異株共にヘテロクロマチンによる遺伝子発現抑制の解除がおこるが、その機構は全く別であった。最近、異常 RNA 分解に関わる Exsome による RNA 分解がヘテロクロマチンの gene silencing に機能する事が示唆されているが CTD-S2 リン酸化はこの過程に必要な物と思われる。また、このリン酸化はヒストン H3K36 をメチル化する Set2 複合体によって認識されることが知られている。実際 set2 破壊株も CTDS2A 変異株と同様の表現型を示し、CTD-S2 リン酸化と Exsome による RNA 分解が Set2 によるヒストン (あるいは他の蛋白質のメチル化修飾) を介してつながる可能性が高く、現在その検証をおこなっている (図3)。

図3 CTDリン酸化による differential なヘテロクロマチン制御



一方、CTD-S7 のリン酸は RNAi に依存するヘテロクロマチン形成に必要であった。さらにその分子機構の解析から、S7 は RNAi 依存ヘテロクロマチン形成の鍵となる反応である RITS 複合体による ncRNA への結合に必要なことを明らかにした。つまり RITS 複合体は転写されつつある ncRNA に CTD-S7 リン酸化依存的に結合することになる。(図3)

以上の解析から CTD のリン酸化が RNAi 経路の differential な制御にかかわることが明らかになると共に、今まで未知であった CTD-S7 リン酸化の機能を明らかにすることができた。

② メディエーターによる ncRNA 転写制御
メディエーターは転写因子による RNAPII 制御を橋渡しする因子として同定された 30 以上のサブユニットからなる巨大な複合体で立体構造から head, middle, tail 三つのドメインから成る。RNAPII による転写制御に広く関与する事は知られているがその機能は明らかでない。メディエーターがヘテロクロマチンにおける RNAPII の機能に関与する可能性を考え、既知のメディエーターサブユニットのうち non-essential なサブユニット遺伝子を系統的に破壊し、RNAi 依存性ヘテロクロマチンへの影響を解析した。その結果、ヘッドドメインに属する *pmc6* (*med18*), *med20* の破壊により、RNAi 依存性ヘテロクロマチン構造が損なわれることがわかった。その後の解析からヘテロクロマチン内での ncRNA 転写制御に関与することを示唆する結果を得ている。

③ ヒストンシャペロン FACT

FACT は三つのサブユニットからなるヒストンシャペロン複合体で広く真核生物で保存されている。先行論文により、一つのサブユニット *pob3* 遺伝子の破壊によりヘテロクロマチンによる遺伝子発現抑制が解除されることが示されていたが、その機構は不明であった。そこでヘテロクロマチンによる遺伝子発現抑制における FACT の役割について解析をすすめた。*pob3* 破壊株ではヘテロクロマチン構造は維持されているが、RNAPII の局在は増えていた。さらにヒストン H2B, H3 の局在を調べるとヒストン H3 は変化しないが、H2B がヘテロクロマチンで大きく減少していた。FACT は H2A, B のシャペロンとして知られており、Pob3 はヘテロクロマチンで H2A-B を維持するのに必要であり、破壊株では通常の H2A, B, H3, 4 それぞれ 2 個ずつの 8 量体ではなく、6 量体が増加しそのことがヘテロクロマチン内での転写の増加につながると考えられる。この結果はヘテロクロマチンでもヌクレオソーム構造はダイナミックに変化しうることを示し、ヌクレオソーム 6 量体 8 量体変化による転写制御という、新しい転写制御機構の存在を示唆している。

④ Epe1 による転写制御

Epe1 はヘテロクロマチン・ユークロマチン境界でヘテロクロマチンの拡張を抑制する因子として同定された因子である。その後 Epe1 はヘテロクロマチンへの RNAPII のリクルートを促進することや、*epe1* 破壊により RNAi 依存性ヘテロクロマチン不安定化する事が報告されている。Epe1 は *jmjC* ドメインと呼ばれる、ヒストン脱メチル化酵素に共通して見られるドメインを持つが現在まで実際に脱メチル化活性をもつことは示されておらず、Epe1 の作用機構は全く不明である。この Epe1 に着目し解析を進めた。

〔雑誌論文〕（計 4 件）

1. Hayashi A., Ishida M., Kawaguchi R., Urano T., Murakami Y. and Nakayama J-I.; Heterochromatin protein 1 homologue Swi6 acts in concert with Ers1 to regulate RNAi-directed heterochromatin assembly. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **109**:6159-6164 (2012)
2. Nakama, M., Kawakami, K., Kajitani, T., Urano, T. and Murakami, Y.; DNA-RNA hybrid formation mediates RNAi-directed heterochromatin formation. **Genes to Cells** **17**:218-233 (2012)
3. Shimada A. and Murakami Y., Dynamic regulation of heterochromatin via phosphorylation of HP1-family proteins., **Epigenetics** **5**: 30-33 (2010)
4. 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)

〔学会発表〕（計 10 件）

1. 村上洋太、高畑信也、梶谷卓也、鈴木詔大、千田香織、森美由紀「Non-coding RNA binds to heterochromatin via DNA:RNA hybrid to mediate RNAi-directed heterochromatin formation」第 34 回日本分子生物学会年会シンポジウム 2011 年 12 月 16 日パシフィコ横浜（横浜市）
2. 村上洋太「Dsh1 assembles RNAi machinery and forms siRNA generation factory at Nuclear Periphery in fission yeast.」第 63 回日本細胞生物学会大会シンポジウム 2011 年 6 月 27 日北海道大学
3. 村上洋太「Non-coding RNA binds to heterochromatin via DNA:RNA hybrid to mediate RNAi-directed heterochromatin formation.」International Symposium, “Physicochemical Field for Genetic Activities” 2011 年 1 月 25 日淡路夢舞台（淡路市）
4. 村上洋太、仲間美奈、川上慶、梶谷卓也、浦野健「Non-coding RNA binds to heterochromatin via DNA:RNA hybrid to mediate RNAi-directed heterochromatin formation.」第 33 回日本分子生物学会年会ワークショップ 2010 年 12 月 8 日神戸国際会議場（神戸市）
5. 村上洋太「RNAi 依存性ヘテロクロマチンにおける non-coding RNA の動態と機

能制御」日本遺伝学会大会第 82 回大会シンポジウム 2010 年 9 月 20 日北海道大学

6. 村上洋太「Non-coding RNA binds to heterochromatin via DNA:RNA hybrid to mediate RNAi-directed heterochromatin formation.」Sweden-Japan Joint Colloquium, Epigenetics 2011 年 9 月 7 日ストックホルム（スウェーデン）
7. 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 10 日パシフィコ横浜（横浜市）
8. 村上洋太「Dynamic Regulation of Heterochromatin」The fifth International Fission Yeast Meeting 2009 年 10 月 28 日 国立オリンピック記念青少年総合センター（東京都）
9. 村上洋太「トランスポゼース由来の分裂酵母 CENP-B ホモログはキネトコアとヘテロクロマチンの境界で機能する」第 82 回日本生化学会大会シンポジウム 2009 年 10 月 24 日 神戸国際会議場（神戸市）
10. 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 22 日 ガトーキングダム札幌（札幌市）

〔その他〕
ホームページ等

<http://barato.sci.hokudai.ac.jp/~bo/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村上 洋太 (Murakami Yota)
北海道大学・大学院理学研究院・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

(3) 連携研究者

なし