

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19199

研究課題名（和文）エピジェネティック変異の多様性増大を介した環境適応機構の探索

研究課題名（英文）Exploration of environmental adaptation mechanism via increased diversity of epigenetic mutations

研究代表者

村上 洋太（Murakami, Yota）

北海道大学・理学研究院・教授

研究者番号：20260622

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：分裂酵母を用いた最近の解析から異所的なヘテロクロマチン（ectopic heterochromatin: EHC）の分布に多様性が存在し、EHCによる遺伝子発現抑制（エピジェネティック変異）が環境適応に寄与するとの仮説の検証をおこない、以下の2点を明らかにした。1) ストレス環境でのEHCの分布の多様性の増大がおこることを示した。2) 人為的にEHC多様性を増大させると、薬剤耐性や栄養要求性を示す株の出現確率が増え、それがEHCに由来する表現型の変化であることを示した。以上の結果はEHCの多様性が環境適応に寄与していることを示す結果である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

環境適応は基本的に突然変異と自然選択によりおこると考えられているが、本研究によりエピジェネティックな変化も環境適応に寄与する事を示すことができた。エピジェネティックは即時的な環境変化への応答と遺伝的な適応の間の中期的時間帯で働くものと考えられ、生物の適応戦略を考える上で興味深い。今後、このエピジェネティックな環境適応が遺伝的な環境適応に影響を与える可能性を検討することで、適応進化に新しい概念を導入できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Recent analyzes using fission yeast revealed diversity in the distribution of ectopic heterochromatin (EHC), and we hypothesized that EHC-mediated gene suppression (epigenetic mutation) contributes to environmental adaptation, and clarified the following two points. 1) We showed that the diversity of EHC distribution increased under stressful conditions. 2) Artificially increased EHC diversity increased the probability of emergence of strains exhibiting drug resistance and auxotrophy, indicating that these were phenotypic changes derived from EHC. The above results indicate that EHC diversity can contribute to environmental adaptation.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 環境適応

1. 研究開始当初の背景

真核細胞のクロマチン構造には凝集した構造をもち遺伝子発現を抑制するヘテロクロマチンと弛緩した構造で遺伝子発現が可能なユークロマチンの2種類が存在する。ヘテロクロマチンはセントロメアやテロメアに恒常的に存在しヒストン H3 の Lys9 のメチル化修飾(H3K9me)で規定される。加えて、ユークロマチン上に異所的なヘテロクロマチン (ectopic heterochromatin: EHC) が一時的に形成され遺伝子発現抑制を行う場合がある。私は異所的なヘテロクロマチン (ectopic heterochromatin: EHC) 形成により細胞の表現型が変化し、それが安定に維持され世代を超えて伝播することを最近報告した(Sorida et al. Plos Genet. 2019)。続いて EHC 形成がカフェイン耐性獲得に寄与する事が報告された(Torres-Garcua et al. Nature 2020)。また、EHC がグルコースや窒素の栄養源枯渇、低温培養、低濃度のカフェインなどのストレス環境により変化することも報告されている(Yamanaka et al. Nature 2012, Oya et al. Epigenetics & Chromatin, 2019, Gallagher et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2018, Torres-Garcia, Nature 2020)。これらは、このような EHC を介したエピジェネティック変異が環境変化への適応に寄与しうることを強く示唆している。このようなエピジェネティック変異は突然変異にくらべ不安定ではあるが、柔軟性に富み、突然変異による進化のような長期にわたる適応と、ホルモンや遺伝子発現制御による短期の適応の間の、中間的タイムスパンでの適応戦略として適している。さらに、申請者や他のグループにより EHC が Epe1 や Clr4 といったヘテロクロマチン制御因子の活性・量により変化すること、その変化がある程度維持され得ることが明らかとなった(Sorida et al. Plos Genet. 2019, Iglesias, Nature 2018)、以上から申請者は、「生物はストレス環境化で EHC によるエピジェネティック変異の多様性を積極的に増大させ、環境変化に適応する可能性を増大させる。さらにそれを「記憶」することで適応度を上げている。」のではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究では生物の環境適応に関し、「生物が危機的環境変化(ストレス環境)に曝された時に、クロマチン構造変化を基礎とするエピジェネティックな変異の頻度を上昇させることでエピジェネティックな多様性を増大させ、環境適応度をあげる。」という可能性の検証を目的とした。

具体的には実験材料として、クロマチン解析のモデル生物である分裂酵母を用いて、以下の2項目について検討をおこなった。

- 1) ストレス環境での EHC 多様性の増大：ストレス環境に曝された分裂酵母で EHC の分布に多様性が生じるのか。
- 2) EHC 多様性増大による適応度の増大：EHC の分布に多様性が増大した時にストレス環境への適応度が増大するのか。

3. 研究の方法

本研究ではストレス環境としてすでに EHC の分布の増加が報告されている低温条件 (18°C:通常は 30°C)(Gallagher et al. Nat. Struct. Mol. Biol. 2018)、窒素源枯渇 (Oya et al. Epigenetics & Chromatin, 2019)を用いる。

1) ストレス環境での EHC 多様性の増大

それぞれのストレス環境に一定時間暴露した酵母を通常寒天培地にまき、生じた複数のコロニーについて通常培地で増やした後 ChIP-seq により異所的ヘテロクロマチンが形成されやすい領域での H3K9 レベルをクローン間で比較する。

2) EHC 多様性増大による適応度の増大

Clr4 の発現や活性の増大が EHC を増大させ、多様な EHC 分布を生み出す (Iglesias et al. Nature 2018)。そこで、培地中のチアミンの有無で発現調節の可能な *nmt41* プロモーターを用いて Clr4 の発現を調節できる細胞株を構築した。この系を用いて、通常環境条件で一時的に EHC の多様性を増大させた後、致死量のカフェイン含有培地に撒き、カフェイン耐性株の出現頻度を測定する。この結果を EHC 増大操作無しの結果と比較することで EHC 多様性増大が環境適応へ与える影響を評価する。さらにカフェイン耐性を示したクローンについて Clr4 の発現を抑制し、ヘテロクロマチンを消失させたときにカフェイン耐性が影響を受けるか確認する。

4. 研究成果

1) ストレス環境での EHC 多様性の増大

通常温度 (30°C) 栄養条件、低温条件 (18°C)、窒素源枯渇条件 (-N) 条件下で 24 時間培養と、通常培地のプレートにまき、それぞれの条件について出現したコロニーを 5 つずつピックアップし、その H3K9me を ChIP-seq 法により解析をおこなった。その結果を表 1 に示す EHC が生じやすい領域 (Sorida et al. Plos Genet 2019) 30 箇所について H3K9me のレベルを比較した結果を表 1 に示す。通常培養条件では EHC の分布はクローン間で差がないが、低温、窒素源枯渇条件下では EHC の出現が促進していて、さらにクローン間でその出現パターンにバラツキがあることがわかる。この結果はストレス条件下で EHC 形成が促進し、さらにその出現にクローン間で差があることを示している。つまり、ストレスにより EHC の多様性が増大することがわかった。

2) EHC 多様性増大による適応度の増大

nmt41 プロモーターにより Clr4 の発現の ON/OFF の調節ができる株を作製した。このとき OFF 状態ではほぼ Clr4 の発現は確認出来ず、ON 状態では通常発現量の 5 倍程度の Clr4 が発現する。

培地からチアミンを除去し Clr4 の発現を誘導する条件と、チアミンを加え Clr4 の発現を ON にした状態で 20 世代に相当する時間培養をおこない、その細胞をカフェインを含むプレート上にまき、カフェイン耐性を示す細胞の数をカウントした。

Clr4 発現を抑制した状態で培養したものでは $1.4 \times 10^{-6} \sim 5.2 \times 10^{-6}$ の頻度でカフェイン耐性の細胞が出現するのに対して、Clr4 発現を誘導した状態で培養したものでは $0.8 \times 10^{-5} \sim 7.8 \times 10^{-5}$ の頻度で体制細胞が出現した。つまり Clr4 発現により 10 倍程度カフ

エイン耐性を示す細胞が増大したことになる。

次に、Clr4 発現を誘導した条件で耐性を示したコロニー10 個について、チアミンを加えた培地で Clr4 発現を OFF にした状態で 20 世代培養し、そのごカフェイン耐性について検討をおこなったところ、10 クローンともにカフェイン耐性を失っていた。この結果はカフェイン耐性の表現型が Clr4 に依存していることを示している。言い換えると、Clr4 の発現により生じた EHC がカフェイン耐性の原因となっていることを示している。

以上の結果は、「生物が危機的環境変化（ストレス環境）に曝された時に、クロマチン構造変化を基礎とするエピジェネティックな変異の頻度を上昇させることでエピジェネティックな多様性を増大させ、環境適応度をあげる。」という、仮説を支持している。

エピジェネティック変化と環境適応についての報告はまだ少ない。特に、本研究の環境ストレスによるエピジェネティック変異多様性の増大という概念は明確に認識されておらず、本申請のような系統的解析は行われていない。今まで生物の表現型の多様性の増大のほとんどは突然変異を介していると認識されていた。さらにバクテリアでの SOS 応答のようにストレス環境で突然変異率が上昇することも知られているが、突然変異は不可逆で過度の突然変異率の上昇は生物にとつと致命的である。一方エピジェネティック変異は復帰可能であり、その変異率の上昇は短期～中期の環境適応という意味で有用な戦略と言えよう。

感染性病原体やがん細胞の薬剤耐性獲得の少なくとも一部にエピジェネティック変異が寄与している可能性が指摘されている(Torres-Garcia et al. Nature, 2020, Sorida & Murakami, Curr. Genet. 2019)。本研究で提案する仮説が実証された場合、エピジェネティックな多様性増大メカニズムを解明しそれを抑制する薬剤を開発することで、感染性病原体やがんの薬剤耐性獲得に対する新たな対処法の確立につながる。このように、本研究の仮説が証明された場合、学術的にも実用的な意味でもインパクトが大きく萌芽研究としてふさわしいと考える。

表 1

ChIP-seq peaks in different conditions

Position	Chromosome	Gene	30°C #1	30°C #2	30°C #3	30°C #4	30°C #5	18°C #1	18°C #2	18°C #3	18°C #4	18°C #5	-N #1	-N #2	-N #3	-N #4	-N #5
1	1	SPAC977.14c	4	4	4	4	4	3	2	2	3	4	4	3	1	3	2
2	1	SPAC13G6.13 <i>(aps1)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1
3	1	13A11.03 <i>(mcp7)</i>	2	2	2	2	2	2	3	4	2	1	2	3	2	2	3
		SPAC13A11.04c <i>(ubp8)</i>	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	3	2	2	3
4	1	SPAC3C7.14c <i>(obr1)</i> /SPAC25A8.03c	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1
5	1	<i>gpa2</i>	1	1	1	1	1	3	2	3	3	1	1	2	2	2	3
		SPAC23H3.14 <i>(av19)</i>	1	1	1	1	1	2	2	3	4	2	4	4	4	4	4
		SPAC23H3.15c	1	1	1	1	1	2	2	3	4	2	4	3	4	4	4
		<i>imj1</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	2	2	2	3
6	1	SPAC17A2.10c/SPAC17A2.11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1
7	1	SPAC959.05c <i>(pdi4)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1
8	1	SPAP7G5.03 <i>(prm1)</i> , <i>lys1</i> , SPAP7G5.05 <i>(pri1002)</i>	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	1	1	4
		SPAP7G5.06 <i>(per1)</i>	1	1	1	1	1	1	1	4	4	1	3	1	1	1	4
9	1	<i>rad50</i>	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1
10	1	SPAC27F1.05c/SPAC27F1.10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1
11	1	SPAC27D7.13c <i>(ssm4)</i>	2	2	2	2	2	2	3	1	1	1	4	2	2	4	
12	1	SPAC1B3.17c <i>(clr2)</i>	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	2	1
13	2	SPBPB21E7.09	4	4	4	4	3	2	3	1	3	4	4	1	1	2	1
14	2	<i>mcp5</i>	1	1	1	1	1	2	1	1	1	4	3	3	2	3	4
		SPBC216.03	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
15	2	SPBP35G2.10 <i>(mit1)</i>	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2
16	2	SPBC337.02c	1	1	1	1	1	1	2	2	1	3	3	1	2	2	1
17	2	<i>cdk9</i>	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1
		<i>mei4</i>	2	2	2	2	2	3	2	3	3	3	3	2	2	3	2
18	2	<i>sws1</i> -SPBC11B10.07c <i>(ivn1)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2
19	2	<i>cdk11</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	1
		<i>can1</i>	1	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1	1	3	1
		SPBC18H10.17c	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	3	1
20	2	SPBC18E5.04 <i>(rp11001)</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1
21	2	SPBC1711.03 <i>(emc3)</i> -SPBC1711.05 <i>(srp40)</i>	1	1	1	1	1	4	4	2	4	1	1	3	1	4	4
22	2	SPBC17G9.13c <i>(eno101)</i>	1	1	1	1	1	2	1	1	1	3	4	1	1	1	1
23	2	<i>pk1/sad1</i>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
24	2	SPBC24C6.09c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1
		SPBC24C6.09c/SPBC24C6.10c	3	3	3	3	3	3	4	3	3	4	3	4	3	3	4
25	2	<i>ade1-xdj1</i>	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1
26	3	SPCP20C8.01c	1	1	1	1	1	1	4	4	1	1	4	1	3	3	1
		SPCP20C8.01c/ <i>nic1</i>	1	1	1	1	1	3	4	2	2	2	3	1	1	3	2
27	3	SPCC1259.02c <i>(erm1)</i>	1	1	1	1	1	1	3	2	4	1	1	1	2	1	1
		SPCC1259.02c <i>(erm1)</i> / <i>rpa12</i>	1	1	1	1	1	2	4	2	3	4	3	2	3	4	3
28	3	<i>chk1-meu27</i>	1	1	1	1	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1
29	3	SPCC1450.09c	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1
30	3	SPCP1E11.10-SPCC569.06	1	1	1	1	1	4	1	4	3	4	1	1	4	2	
		SPCC569.03	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1	4	3	4	4	1
		SPCC569.01c	1	1	1	1	1	1	3	4	2	2	4	4	3	3	2

Intensity
 1 No peak
 2 Low
 3 Modest
 4 High

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