

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25年 6月3日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22570176

研究課題名（和文） 細胞機能からのアプローチによるヒストンメチル化制御機構の解析

研究課題名（英文） Analysis of the mechanism of histone methylation by using genetic approaches

研究代表者

林 亜紀 (AKI HAYASHI)

独立行政法人理化学研究所・クロマチン動態研究チーム・研究員

研究者番号：80399534

研究成果の概要（和文）

ヒストン修飾によるエピジェネティクスの分子機構の解明を目的とし、分裂酵母を用いた遺伝学的スクリーニングによって、遺伝子発現が抑制されたヘテロクロマチン領域の新規形成因子を同定した。スクリーニングから得られた2つの機能未知因子のうち、Ers1はヘテロクロマチン結合蛋白質HP1とRNAi機構に働くRNAヘリケースHrr1と結合することがわかった。続く遺伝学的解析と生化学的解析によって、Ers1がHP1を介してヘテロクロマチン上にRNAi機構をリクルートし、転写抑制に必要なsiRNA合成を促進する役割を果たすことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Epigenetics plays an important role for regulation of gene expression during developmental stages in eukaryote. To understand the molecular mechanism of epigenetic regulation, I analyzed the mechanism of histone modification at heterochromatic region of fission yeast by using genetic approaches. I obtained two uncharacterized genes involved in the formation of heterochromatin by screening. One of the genes, Ers1, binds both of heterochromatin protein 1 (HP1) and an RNA helicase Hrr1 functioned in RNAi pathway. Genetic and biochemical analysis revealed that Ers1 recruits the RNAi machinery to heterochromatic region and facilitates siRNA generation through the binding of HP1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	0	0	0
2009年度	0	0	0
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：ヘテロクロマチン、RNAi機構、ヒストン修飾、HP1

1. 研究開始当初の背景

エピジェネティクスは DNA 配列に依存しない遺伝子制御が次世代に継承される事象であり、生物にとって発生、分化において必須な事象である。生物は発生段階において転写因子による DNA 配列依存的な遺伝子発現制御に加えて、エピジェネティックな制御である DNA メチル化やヒストン修飾、クロマチンリモデリングによって組織形成や個体の維持をおこなう。高等真核生物では染色体が蛋白質と共に高度に凝縮した構造体ヘテロクロマチン領域で、ヒストン H3 の 9 番目のリジンに特異的なメチル化修飾(H3K9me)による発現抑制をおこなう。ヘテロクロマチンは繰り返し配列を持つセントロメア、テロメア、トランスポゾン挿入部位などの染色体に形成され、染色体分配、染色体末端の維持と染色体の安定性に寄与する。ヘテロクロマチン形成機構は種間で高度に保存されており、H3K9me を認識して結合するヘテロクロマチン蛋白質 1 (HP1)や H3K9 メチル基転移酵素等によって制御されている。分裂酵母のヘテロクロマチン領域では HP1 ホモログの Swi6、Chp2 と H3K9 メチル基転移酵素 Clr4 が機能し、特にセントロメア領域では RNAi 機構を介したヘテロクロマチン形成が起きることが報告されている。また近年では次世代シーケンサーや質量分析器を用いた網羅的な生化学的手法によってヘテロクロマチン形成因子の同定と機能の解析が精力的に進められている。

2. 研究の目的

分裂酵母はヘテロクロマチン形成機構を解析するうえで優れたモデル生物であり、これまでの解析からヘテロクロマチン形成に関与する多くの因子が報告されている。しかしその細胞内機能の解析が進んでおらず、また RNA プロセッシングや遺伝子複製など、細胞周期における複数の他の制御機構との関与が示唆されているが、その詳細な相互のメカニズムはほとんど明らかになっていない。そこでエピジェネティクスの詳細な分子機構の解明を目的として、遺伝学的解析や分子生物学的解析が容易である分裂酵母を用いて、RNAi 機構を介したヘテロクロマチン形成機構に働く新規ヘテロクロマチン形成因子の同定をおこなった。

3. 研究の方法

これまでの解析に用いられた生化学的手法は多くの結合因子が少ない時間で検出できる利点を持つが、一過的または弱い相互作用をする因子の同定は難しい。一方遺伝学的スクリーニングは時間がかかるが生化学的手法では検出しにくい一過的または弱い結

合を示す因子や、機能的変異体を得ることができる。そこで下等真核生物の利点である容易な遺伝的手法を用いて、ヘテロクロマチン形成に関わる因子の同定をおこなった。まず二つの遺伝学的スクリーニング系を作成して新規ヘテロクロマチン形成因子の同定を試みた。

【①合成致死系】 出芽酵母では二つの変異が同時にゲノムに挿入されると致死となる合成致死のスクリーニング系が確立されており、互いに遺伝的相関がある未知の遺伝子を同定することができる。分裂酵母ではプラスミドの不安定性から従来のプラスミド保持型の合成致死系が確立していない。そこで新規の分裂酵母の合成致死スクリーニング系として、ゲノム挿入による安定な目的遺伝子の発現と、細胞毒性が少ない組み換え酵素 Recombinase を組み合わせた部位特異的なゲノムからの切り出しをおこなう合成致死系を作成した。Recombinase を発現するプロモーターとして複数のプロモーターを用いて系を作成したが、チアミン存在下で発現を誘導する nmt1 プロモーターが他のプロモーターより制御しやすく、系として働くことを確認した。

【②ヘテロクロマチン領域へのマーカー遺伝子挿入による系】

分裂酵母のヘテロクロマチン領域のうち、セントロメア 2 カ所と性決定領域 (MAT) にそれぞれ異なるマーカー遺伝子を挿入した株を作成した。野生株ではヘテロクロマチン領域に挿入した遺伝子発現が抑制される (サイレンシング) が、ヘテロクロマチン形成遺伝子の変異体ではマーカー遺伝子の発現が上昇する (図 1)。

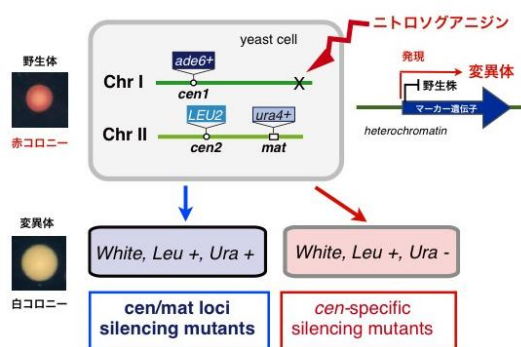


図 1 ヘテロクロマチン形成欠損を示す変異体のスクリーニングの概要

作成した株の細胞に DNA 変異原のニトロソグアニジンを加えて DNA に変異を導入し、ヘテロクロマチンに挿入したそれぞれのマ

カー発現が上昇する細胞を細胞色と選択培地での生育の有無から選択して、ヘテロクロマチン形成に欠損をしめす変異体を単離した。この系ではセントロメアのみでの発現が上昇する変異体は RNAi 機構を介したヘテロクロマチン形成因子の変異体であり、また MAT とセントロメア両方のマーカー遺伝子の発現が上昇する変異体は、すべてのヘテロクロマチン形成に関与する変異体と分けることができる。

4. 研究成果

第2のスクリーニング系からヘテロクロマチン形成全体に関与する4因子と RNAi 機構に関与する8因子とを同定した(表1)。

Phenotype	Gene	No. of alleles
Ade+/Leu+/Ura+	<i>clr4+</i>	6
ヘテロクロマチン形成	<i>rik1+</i>	3
	<i>raf1+</i>	5
	<i>raf2+</i>	2
Ade+/Leu+/Ura-	<i>hrr1+</i>	10
RNAi 関連因子	<i>ago1+</i>	5
	<i>dcr1+</i>	5
	<i>rdp1+</i>	4
	<i>SPBC582.04c</i>	3 = <i>dsh1+</i>
	<i>arb1+</i>	2
	<i>chp1+</i>	1
	<i>ers1+</i>	1

表1 第2スクリーニング系から得られたヘテロクロマチン形成因子

このうち RNAi 機構に関与する機能未知因子として二つの因子、Ers1 と Dsh1 が得られた。*ers1* 変異体はセントロメア領域でのサイレンシングに欠損を示し、また RNAi 機構で働く siRNA 合成が減少することがわかった。しかし Ers1 因子はアミノ酸配列中に既知のドメインがなく、推測できる機能が全く不明であった。*ers1* 変異体の遺伝子を同定するために分裂酵母ゲノムライブラリーと RNAi 因子を持つ複数のプラスミドを形質転換したところ、*ers1* 変異体のサイレンシング欠損が部分的に相補する因子(サプレッサー)としてヒストン H3K9 メチル基転移酵素 Clr4 と、RNAi 機構に働く RNA ヘリカーズ Hrr1 が単離された。

これらのサプレッサーと Ers1 の間に遺伝的相互作用があることが考えられたため、酵母ツーハイブリッド法と免疫沈降法からそれぞれの結合を解析した結果、Ers1 は Hrr1 と結合することが明らかになった。しかし Ers1 は Clr4 とは結合しないため、Ers1 と H3K9 メチル基との関与を調べるために H3K9

メチル基に結合するクロモドメインを持つ4つの因子(Clr4, Swi6, Chp2, Chp1)の欠失株でのEGFP-Ers1の局在を蛍光顕微鏡で観察した(図2)。

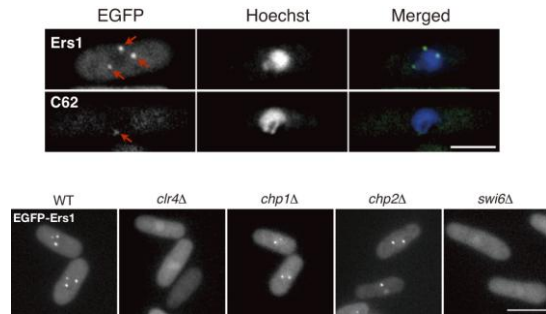


図2 Ers1の細胞内局在。EGFP-Ers1は野生株では核内にドット状に局在するが、*clr4*、*swi6*変異体では核内に拡散する。

その結果 Ers1 は野生株ではヘテロクロマチン上にドットとして局在するが、*clr4* 変異体と *swi6* 変異体では局在が核内に拡散することがわかった。そこで Ers1 と HP1 ホモログである Swi6 に直接的な相互作用があることを調べるために、酵母ツーハイブリッド法と免疫沈降法の二手法による両者の結合を検出した。その結果両方での手法で Ers1 と Swi6 の結合が確認された。またさらに分裂酵母の cDNA ライブラリーを用いて Ers1 の結合因子を酵母ツーハイブリッド法によるスクリーニングから単離したところ、Swi6 が結合因子として同定された。これよりと HP1 ホモログである Swi6 には直接的な相互作用があることが示された。

またクロマチン免疫沈降法によって *swi6* 変異体では RNAi 因子のヘテロクロマチン上での局在が減少することを明らかにした。続いて免疫沈降法によって *swi6* 変異体では siRNA 合成に必要な二重鎖 RNA 合成複合体 RDRC と siRNA に結合する Argonaut 複合体 (RITS) の結合が検出されないことを示した。

さらに *swi6* 変異体株に Ers1、Hrr1 と H3K9 メチル基結合ドメインを融合させた蛋白質を大量発現させて強制的にヘテロクロマチンに結合させたところ、*swi6* 変異体株でのヘテロクロマチン形成欠損を部分的に相補できることがわかった。これらの結果から Ers1 は HP1 との結合を介して RNAi 機構をヘテロクロマチン上にリクルートし、HP1 が RNAi 機構の土台として siRNA 合成を促進する役割を果たすことがわかった。

上記の結果をまとめて論文として発表し、残る一因子 Dsh1 も北大チームとの共同研究によってその研究成果を報告した。

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 3 件)

1. Hayashi A, Ishida M, Kawaguchi R, Urano T, Murakami Y, Nakayama J.
Heterochromatin protein 1 homologue Swi6 acts in concert with Ers1 to regulate RNAi-directed heterochromatin assembly. Proc Natl Acad Sci U S A. 109, 6159-6164 (2012) 査読有

2. Kawakami K, Hayashi A, Nakayama J, Murakami Y.
A novel RNAi protein, Dsh1, assembles RNAi machinery on chromatin to amplify heterochromatic siRNA. Genes Dev. 26:1811-24 (2012) 査読有

3. Ishida M, Shimojo H, Hayashi A, Kawaguchi R, Ohtani Y, Uegaki K, Nishimura Y, Nakayama J.
Intrinsic nucleic acid-binding activity of Chp1 chromodomain is required for heterochromatin assembly. Mol Cell. 47.1-14 (2012) 査読有

[学会発表] (計 6 件)

1. 林 亜紀.
Ers1 因子は HP1 を介してヘテロクロマチン上に RNAi 機構をリクルートする
日本遺伝学会 第 8 4 回大会 博多 (口頭)
2012 年 9 月 24-26 日

2. 林 亜紀.
Ers1 は HP1 を介して RNAi 機構をヘテロクロマチンにリクルートする
第 4 5 回 酵母遺伝学フォーラム 宇治
2012 年 9 月 4-6 日 (口頭)

3. Aki Hayashi.
HP1/Swi6 Acts in Concert with Ers1 to Regulate RNAi-directed Heterochromatin Assembly.
22nd CDB meeting: RNA Sciences in Cell and Developmental Biology II. Kobe,
June 11-13, 2012 (oral)

4. 林 亜紀.
HP1/Swi6 acts in concert with Ers1 to drive RNAi-directed heterochromatin assembly
第 3 4 回 日本分子生物学会 横浜
2011 年 12 月 13-16 日
(口頭+ポスター)

5. Aki Hayashi.
Ers1 links heterochromatin and RNAi machinery.

6th International Fission Yeast Meeting, Boston, U.S.A. June 25-30, 2011 (poster)

6. 林 亜紀.
分裂酵母へテロクロマチン形成と RNAi 機構のリンク
第 2 8 回 染色体ワークショップ 山代
2011 年 1 月 11-13 日 (口頭)

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
林 亜紀 (AKI HAYASHI)
独立行政法人理化学研究所・クロマチン動態研究チーム・研究員
研究者番号: 80399534

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
中山 潤一 (NAKAYAMA JUN-ICHI)
名古屋市立大学・システム自然科学研究科・准教授
研究者番号: 60373338