

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770211

研究課題名(和文)クロマチン修飾制御を介した生殖細胞特性の形成・維持メカニズム

研究課題名(英文)The mechanism of chromatin modifications that establish and maintain germline property

研究代表者

高崎 輝恒(Takasaki, Teruaki)

神戸大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30615539

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文):生殖細胞と体細胞の違いを生み出すメカニズムの解明を目指し、線虫*C. elegans*のクロマチン修飾制御機構に着目した解析を行なった。クロモドメイン蛋白質MRG-1が、ヒストンメチル化とヒストンアセチル化の仲介機能を果たすこと等、生殖細胞遺伝子座に特徴的なクロマチン修飾が生み出される分子基盤を明らかにした。また、MRG-1が始原生殖細胞の転写抑制制御にも関与することを見出し、始原生殖細胞の未分化状態維持に働くクロマチン修飾制御の一端を明らかにした。さらに、3' UTRを介したmRNAの安定性制御を利用して、母性供給されたクロマチン制御因子群を始原生殖細胞に限局させるシステムがあることを見出した。

研究成果の概要(英文):To understand the molecular mechanism that establishes and maintains germline property, we analyzed chromatin modifiers in the nematode *C. elegans*. We found that the chromodomain protein MRG-1 acts as an interpreter of histone methylation and promotes histone acetylation, generating a unique histone modification pattern on the germline gene-specific loci. We also found that MRG-1 is involved in preventing transcription in premature primordial germ cells. In addition, we revealed an mRNA stability control that restricts maternally supplied chromatin modifiers in primordial germ cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：生殖細胞 クロマチン ヒストン修飾 エピジェネティクス 線虫*C. elegans*

## 1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の体は基本的に同一のゲノム DNA を持つ細胞により構成されている。その為、個々の細胞が多様な細胞特性を発揮するには、ゲノム情報を選択的に発現調節する必要がある。DNA 配列を変えずにゲノム情報発現を局所的に活性化・不活性化させるメカニズムとして、クロマチン修飾制御が知られている。ヒストンのメチル化やアセチル化に代表されるクロマチン修飾のパターンは『細胞記憶』として娘細胞に受け継がれる(Turner, 2002. Cell)。このような性質を持つクロマチン修飾制御は、細胞特性(細胞のアイデンティティ)の確立、ひいては秩序だった組織形成・個体発生を担う必須の遺伝子発現制御機構であると考えられるようになってきた。しかしながら、その分子機構の詳細については酵母の分子遺伝学的解析などから理解が進んでいるものの、多細胞生物の細胞運命決定システムとしてどのような調節制御が行われているのか不明な点が多い。

動物のからだは多種多様な細胞で構成されるが、なかでも生殖細胞は次世代を生み出す能力を秘めた特別な細胞であることから、その細胞特性や形成メカニズムの理解は、生命科学における最重要課題の一つとして勢力的に研究が進められている。これまでに研究代表者は、線虫 *C. elegans* を実験材料に用いて、クロモドメイン蛋白質 MRG-1 が生殖細胞の形成・維持に必須であることを明らかにしている。研究代表者の発見以前にも、国内外の研究グループによって線虫 *C. elegans* の生殖細胞形成・維持過程に関わるクロマチン制御因子が多数同定されていたが、それら因子間の相互の連携や作用機序は未解明のまま残されており、生殖細胞特性を生み出すクロマチン修飾制御の全体像はつかみきれていないという状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、多細胞生物の細胞運命決定システムにおけるクロマチン修飾制御の分子基盤の解明を目的としている。本研究期間内では、線虫 *C. elegans* の発生分化過程をモデルに、生殖細胞の形成・維持に必須なクロマチン制御因子群に着目した解析を行ない、それら因子間相互の時空間的な連携や作用機序を解き明かすことによって、生殖細胞と体細胞の違いを生み出すクロマチン修飾制御機構の全体像の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

これまでの研究代表者らの研究成果を踏まえ、クロモドメイン蛋白質 MRG-1 は、他

のクロマチン制御因子群の仲介役として機能しているのではないかと作業仮説を立てている。具体的には、①ヒストンメチル化酵素 MES-4 によって生殖細胞の遺伝子発現プロファイルの記憶が次世代へ受け継がれた後、②クロモドメイン蛋白質 MRG-1 がそのヒストン修飾を認識して生殖細胞遺伝子座に結合し、③アセチル化酵素 MYS-2 を呼び込み、④生殖細胞遺伝子特異的なアセチル化修飾パターンを生み出す一方で、⑤体細胞では NuRD による修飾消去がなされ、体細胞型と生殖細胞型のアセチル化修飾パターンが生じる、との作用機序モデル(図1)を立てている。

本研究では、上記の仮説に基づき、遺伝学的解析、免疫組織化学的解析、クロマチン免疫沈降解析、分子遺伝学的解析等を併用した検証を行ない、クロマチン修飾制御因子群の作用機序を解析した。

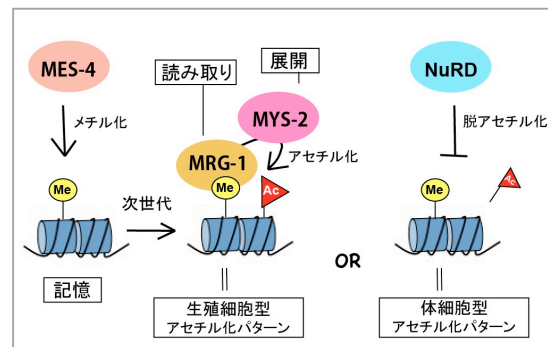


図1 作用機序モデル

MRG-1が仲介役となり、ヒストンメチル化酵素 MES-4 と、ヒストンアセチル化酵素 MYS-2 が連携して機能する。

## 4. 研究成果

### (1) MRG-1 は H3K36 メチル化修飾されたクロマチンを認識する

MRG-1 は、クロマチン制御因子に特徴的なモチーフの1つであるクロモドメインを有している。クロモドメインは、メチル化ヒストンに結合する性質を持つモチーフとして近年注目を集めていることから、MRG-1 も何らかのメチル化ヒストンを認識して結合する機能を持つのではないかと考え、検証した。

線虫 *C. elegans* の生殖細胞形成・維持に必須な因子として、ヒストンメチル化酵素 MES-4 が同定されている (Bender et al., Development 2006)。MES-4 は、ヒストン H3 の 36 番目のリジン残基 (H3K36) を特異的にメチル化する。MES-4 の細胞内分布は MRG-1 と非常によく似ており、常染色体上への局在を示す。また、*mes-4* 欠失変異体は、*mrg-1* 欠失変異体と同様に母性効果不稔の表現型を示す (Garvin et al., Genetics 1998)。以上のように、MRG-1 と MES-4 の性質には

多くの共通点が見られることから、研究代表者は、MRG-1はMES-4によってメチル化修飾されたヒストン H3K36me3 に結合するのではないかと考えた。

in vitro の結合実験では、MRG-1とメチル化ヒストン H3K36 との間に強い結合性は認められなかったが、in vivo での解析系の構築を試みた。線虫 *C. elegans* には、MET-1とMES-4、2つの H3K36 メチル化酵素が存在し、MET-1とMES-4を欠く変異体は、H3K36 メチル化が完全に消失する。この二重欠失変異体の♀個体に野生型の♂個体を交配すると、得られた受精卵内において、卵由来のクロマチンは H3K36 メチル化修飾されておらず、精子由来のクロマチンのみ H3K36 メチル化修飾を持つという現象を発見した。この現象を利用することによって、単一の細胞内に、異なる H3K36me3 レベルを持つ染色体セットを人為的に作成することが可能となる。この、ヒストン修飾状態を人為的に変化させた細胞を用いて MRG-1 蛋白質の分布を免疫染色法により観察した結果、MRG-1は H3K36 メチル化修飾されている精子由来の染色体上に優先的に局在する様子が観察され、MRG-1は H3K36 メチル化状態を認識してクロマチンに結合する性質を持つことが明らかとなった (図4)。

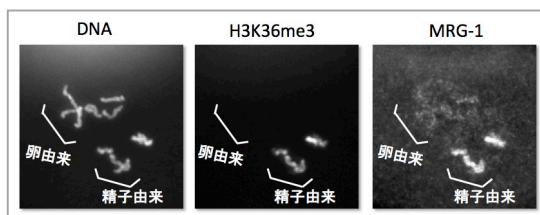


図4 MRG-1はH3K36メチル化修飾されたクロマチンに優先的に結合する

### (2) MRG-1はH3K36メチル化修飾を利用して生殖細胞遺伝子座に結合する。

研究代表者は、これまでの解析においてMRG-1が常染色体上に局在することを明らかにしていたが、MRG-1の染色体上の結合領域をより詳細に特定するため、クロマチン免疫沈降実験を行なった。初期胚におけるMRG-1のクロマチン免疫沈降物をマイクロアレイにて網羅的に解析した結果、MRG-1は、生殖細胞で発現する遺伝子群のコード領域に特異的に結合することが明らかとなった。

研究代表者らは、MES-4が生殖細胞遺伝子座のコード領域に結合することを以前の研究において見出していたが、今回の解析結果から、MES-4とMRG-1の結合遺伝子座に高い相関が見られることが明らかとなった。さらにMES-4とMRG-1の結合遺伝子座の関係をより直接的に解析するため、mes-4遺伝子の発現をRNAi法で阻害し、MRG-1の染色体上の分布に変化が生じるかを検証した。その結果、mes-4(RNAi)個体では、MRG-1

の生殖細胞遺伝子座への結合性が著しく低下することが明らかとなった。

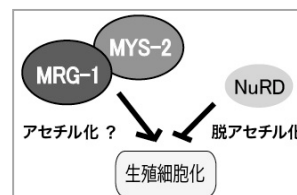
これまで、生殖細胞の遺伝子発現の記憶(どの遺伝子がONであったか)が、MET-1とMES-4の連携によるヒストン H3K36メチル化修飾によって次世代へ伝達されることが示されていたが、そのメチル化修飾情報が、次世代の発生分化過程においてどのように利用されているかは不明であった。本研究の解析結果は、そのメチル化修飾情報を読み取る因子が存在することを示す極めて重要な知見となった。

### (3) MRG-1はヒストンアセチル化酵素MYS-2と相互作用する。

発生初期の線虫の体細胞は、脱アセチル化複合体NuRDの働きによって、生殖細胞への分化が抑制されている(Unhavaithaya et al., Cell. 2002)。したがって、生殖細胞遺伝子の発現促進には、何らかのヒストンアセチル化修飾が関与すると推察される。NuRD複合体の構成因子を欠く変異体では生殖細胞特異的な遺伝子が全身に発現し致死となる。研究代表者は以前に、NuRD変異体における生殖細胞遺伝子の誤発現を指標にした遺伝学的解析によって、MRG-1が生殖細胞遺伝子の発現促進に必須であることを見出している。この結果を踏まえ、MRG-1がヒストンアセチル化修飾に関与しているのではないかと考え検証した。

MRG-1のショウジョウバエホモログは、MYST型ヒストンアセチル化酵素MOFと複合体を形成し、遺伝子量補償に機能する。MOFの線虫ホモログMYS-1とMYS-2についてMRG-1との相互作用を解析した結果、NuRD変異体を用いた遺伝学的解析において、mys-2遺伝子の阻害時に、mrg-1遺伝子の阻害時と同様に、NuRD変異体の表現型が抑えられることから、MRG-1とMYS-2の間に遺伝学的相互作用が認められる(図5)。

図5 MRG-1とMYS-2の遺伝学的相互作用



そこで、MRG-1とMYS-2が複合体を形成して機能している可能性を検証する為、in vitro 結合実験を行なった。ウサギ網状赤血球を用いたin vitro 翻訳システムで合成したリコンビナント蛋白質を用いた結合実験の結果、MRG-1とMYS-2の間に結合性が確認された。以上の解析結果から、MRG-1が、MYS-2との結合性を利用してヒストンアセチル化修飾に寄与している可能性が強く示唆された。

### (4) MRG-1の結合遺伝子座とヒストンアセチル化修飾と相関

上記で述べたように、MRG-1とMYS-2の

間に相互作用が見られたことから、MRG-1がヒストンアセチル化修飾に関与している可能性が高い。そこで、MRG-1のクロマチン上の結合領域とヒストンアセチル化修飾との間に相関が見られるかについて解析を試みた。

MYS-2はMYS-1と機能的な重複を持ち、両者を同時に阻害することによって胚致死、不稔の表現型を示す。また図6に示すように、始原生殖細胞において、H4K16のアセチル化レベルが著しく減少することも見出しており、MYS-2はMYS-1とともにH4K16特異的なアセチル化修飾酵素であると考えられる。そこで、H4K16アセチル化修飾のゲノム上の分布をクロマチン免疫沈降の結果をもとに網羅的に解析した結果、生殖細胞遺伝子座上に特徴的な蓄積パターンがあることが明らかとなった。生殖細胞遺伝子座にはMES-4とMRG-1も局在している。そこで、より直接的にMES-4やMRG-1がヒストンアセチル化修飾へ関与しているかを検証するため *mes-4* 遺伝子の発現を阻害した胚におけるヒストンH4K16アセチル化修飾パターンを解析した。その結果、生殖細胞遺伝子座に見られた特徴的なH4K16アセチル化修飾パターンが消失することが確認できた。以上の結果は、MES-4によるヒストンH3K36メチル化を認識したMRG-1が、MYS-2との相互作用を介して生殖細胞遺伝子座のヒストンアセチル化修飾を促すという、研究代表者が提案した先の作業仮説と非常によく合致する結果であった。

本研究の成果によって、生殖細胞遺伝子座においてヒストンメチル化からアセチル化まで連携したクロマチン制御機構が機能していることが明らかになった。

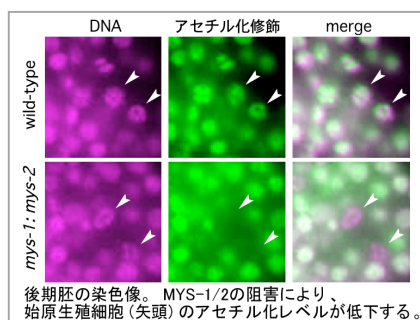


図6 後期胚の染色像。MYS-1/2の阻害により、始原生殖細胞(矢頭)のアセチル化レベルが低下する。

(5) MRG-1の始原生殖細胞への限局は3'UTRを介したmRNAの安定性制御によって成し遂げられる。

MRG-1やMES-4は、胚発生の初期には全ての細胞の核に存在するが、胚発生後期になると始原生殖細胞に限局して観察される。生殖顆粒をはじめ、始原生殖細胞に局在する母性因子の多くは第一卵割の頃から非対称分配によって排他的に生殖系列の割球に受け継がれることが知られているが、MRG-1やMES-4の発現様式は、胚発生がある程度進行してから始原生殖細胞に限局するという点

において大きく異なっており特徴的である(図7)。

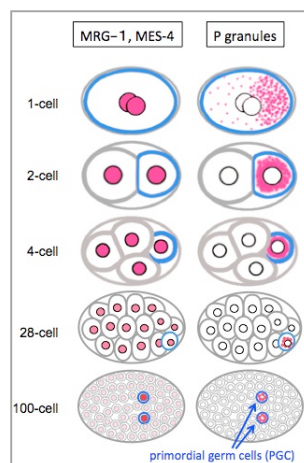


図7 MRG-1、MES-4の発現様式と、生殖顆粒(P granules)の非対称分配様式との比較

MRG-1型の発現様式を生むメカニズムを明らかにするため、トランスジェニック技術を用いてレポーター遺伝子の動態変化を指標に解析を行なった。はじめに、*mrg-1*遺伝子のプロモーター活性についての解析を行なった結果、始原生殖細胞に限局して見られるMRG-1蛋白質は、卵形成期までに転写された母性遺伝子産物由来であることが明らかとなった。次に、MRG-1蛋白質を始原生殖細胞に限局させる要素の探索を行なったところ、*mrg-1*遺伝子の3'非翻訳配列(3'UTR)を付加したレポーターmRNAが始原生殖細胞で安定化されるという結果が得られた(図8)。以上の結果から、MRG-1の

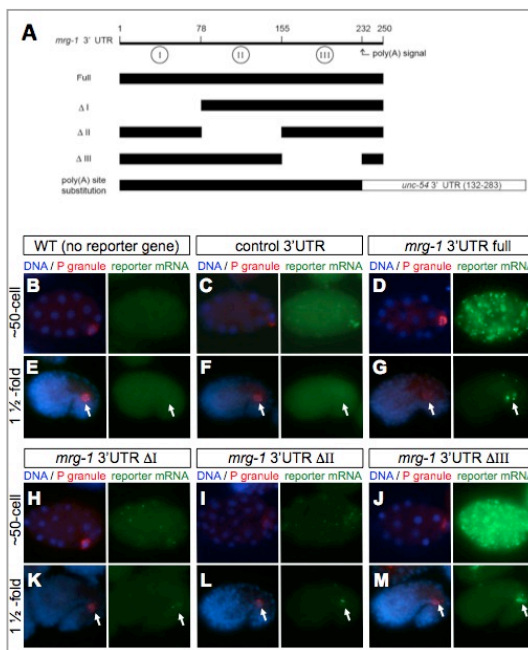


図8 *mrg-1*遺伝子の3'UTRを付加したレポーターmRNAは、始原生殖細胞で安定化される。

始原生殖細胞への限局は 3'UTR を介した mRNA の安定性制御によって成し遂げられていることが明らかとなった。

(6) 生殖顆粒とは独立したシステムによって、母性供給されたクロマチン制御因子を始原生殖細胞に限局させる機構が存在する。

一般に、mRNA の安定化制御には RNA 結合蛋白が重要な役割を果たしている。線虫の生殖系列細胞には、RNA と RNA 結合蛋白質に富んだ、特徴的な顆粒状の構造物(生殖顆粒)が存在する。そこで、この生殖顆粒が *mrg-1* mRNA の安定化制御に機能しているのではないかと考え、検証した。

生殖顆粒の非対称分配に必須な *PPTR-1* の発現を阻害する方法で上記の可能性を検証した結果、生殖顆粒の局在が失われた胚においても、*MRG-1* の始原生殖細胞への限局が観察された(図 9)。この結果より、生殖顆粒の分配とは独立したシステムによって、*MRG-1* の始原生殖細胞への限局が成し遂げられていることが明らかとなった。さらに、同様の結果は、*MES-4* の限局についても観察された(図 9)。以上の結果から、線虫の胚発生過程において、生殖顆粒とは独立したシステムによって、母性供給されたクロマチン制御因子を始原生殖細胞に限局させる機構が存在することが明らかとなった。

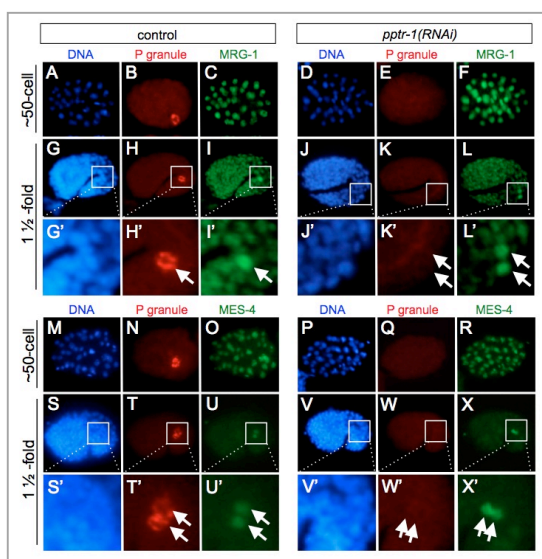


図 9 *MRG-1* と *MES-4* は、生殖顆粒 (P granules) の局在とは独立した機構によって、始原生殖細胞に限局する。

## 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 4 件)

[学会発表] (計 14 件)

- ① 已波 孝至、井上 邦夫、坂本 博、高崎 輝恒、Analysis of the mechanism to enrich a chromodomain protein MRG-1 into primordial germ cells in *C. elegans*、第 47 回日本発生生物学会、愛知、2014 年 5 月
- ② 已波 孝至、井上 邦夫、坂本 博、高崎 輝恒、線虫 *C. elegans* におけるクロモドメイン蛋白質 MRG-1 の始原生殖細胞への限局メカニズムの解析、第 37 回日本分子生物学会、横浜、2014 年 11 月
- ③ 已波 孝至、高崎 輝恒、井上 邦夫、坂本 博、線虫 *C. elegans* におけるクロモドメイン蛋白質 MRG-1 の始原生殖細胞への限局メカニズムの解析、第 5 回サイエンスフロンティア研究発表会 神戸大学(兵庫県)、2014 年 10 月
- ④ Takashi Miwa, Kunio Inoue, Hiroshi Sakamoto, Teruaki Takasaki, The mechanism for enrichment of a chromodomain protein MRG-1 into the primordial germ cells in *C. elegans*、*C. elegans* Development, Cell Biology and Gene Expression Meeting in Association with The 6th Asia-Pacific *C. elegans* Meeting、奈良、2014 年 7 月
- ⑤ 已波 孝至、高崎 輝恒、井上 邦夫、坂本 博、線虫 *C. elegans* における生殖細胞形成に関与するクロモドメインタンパク MRG-1 の局在機構の解析、関西地区線虫勉強会ジョイントミーティング、2014. 1. 16、関西学院大学梅田キャンパス(大阪府)
- ⑥ 土橋 匠、高崎 輝恒、井上 邦夫、坂本 博、線虫 *C. elegans* 生殖細胞におけるスプライシング関連タンパク質リン酸化酵素 SPK-1 の機能解析、関西地区線虫勉強会ジョイントミーティング、2013. 10. 24、関西学院大学梅田キャンパス(大阪府)
- ⑦ 土橋 匠、高崎 輝恒、井上 邦夫、坂本 博、線虫 *C. elegans* 生殖細胞におけるスプライシング関連タンパク質リン酸化酵素 SPK-1 の機能解析、RNA フロンティアミーティング 2013、2013. 9. 3-5、ラフォーレ修善寺(静岡県)
- ⑧ 已波 孝至、高崎 輝恒、井上 邦夫、坂本 博、線虫 *C. elegans* における生殖細胞形成に関与するクロマチンリモデリング因子群の局在機構の解析、RNA フロンティアミーティング 2013、2013. 9. 3-5、ラフォーレ修善寺(静岡県)
- ⑨ Teruaki Takasaki, Thea Egelhofer,

Andreas Rechtsteiner, Hiroshi Sakamoto, Susan Strome, MRG-1 acts as an epigenome interpreter of Lys36 methylation on histone H3, The 19<sup>th</sup> International C. elegans meeting, 2013. 6. 26-30, ロサンゼルス (アメリカ)

該当なし

(4) 研究協力者

Andreas Rechtsteiner

University of California, Santa Cruz

• Bioinformatist

- ⑩ 高崎 輝恒、生殖細胞と体細胞の違いを生み出す線虫 *C. elegans* のヒストン修飾制御機構、関西地区線虫勉強会ジョイントミーティング、2013. 1. 17、関西学院大学梅田キャンパス (大阪府)
- ⑪ 高崎 輝恒、Thea Egelhofer、Andreas Rechtsteiner、坂本 博、Susan Strome、生殖細胞と体細胞の違いを生み出す線虫 *C. elegans* のヒストン修飾制御機構、第85回日本生化学会大会、2012. 12. 14-16、福岡国際会議場 (福岡県)
- ⑫ 茂山 恵里那、高崎 輝恒、坂本 博、線虫 *C. elegans* の生殖細胞分化に関わるエピジェネティック制御、関西地区線虫勉強会ジョイントミーティング、2012. 10. 18、関西学院大学梅田キャンパス (大阪府)
- ⑬ 土橋 匠、高崎 輝恒、坂本 博、線虫生殖腺におけるスプライシング因子 SPK-1 の解析、関西地区線虫勉強会ジョイントミーティング、2012. 10. 18、関西学院大学梅田キャンパス (大阪府)
- ⑭ 高崎 輝恒、Thea Egelhofer、Andreas Rechtsteiner、Susan Strome、線虫 *C. elegans* の生殖細胞分化能を規定するヒストン修飾制御機構、第6回日本エピジェネティクス研究会年会、2012. 5. 14-15、学術総合センター (東京都)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.research.kobe-u.ac.jp/fsci-rna/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高崎 輝恒 (Takasaki, Teruaki)

神戸大学・大学院理学研究科・特命助教

研究者番号：30615539

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者