

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 23 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25250022

研究課題名(和文) RNAi 依存性ヘテロクロマチンシステムと核膜による遺伝子発現調節機構

研究課題名(英文) Regulation of gene expression through RNAi dependent heterochromatin formation and nuclear membrane

研究代表者

村上 洋太 (Murakami, Yota)

北海道大学・理学(系)研究科(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) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：凝集した構造をもち、遺伝子・染色体制御に重要なヘテロクロマチンは、真核細胞で核膜内側に局在するが、その分子機構・生理的意義は不明である。我々は分裂酵母を用いて遺伝子発現を負に制御するRNAi因子が核膜内側にヘテロクロマチン形成場を作ることを示してきた。

本研究ではRNAi因子がヘテロクロマチンの核膜局在にも寄与することを発見した。また、核膜タンパク質の機能解析から、核膜蛋白質Lem2がヘテロクロマチン形成・核膜局在で、RNAiとは独立して機能することを見出した。Lem2は生育条件に応じてヘテロクロマチン形成を制御する。これは環境応答におけるエピジェネティック制御を考える上で重要な発見である。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotic cells, heterochromatin, which is important for the gene and chromosome regulation, localizes at nuclear periphery, but its mechanism and physiological functions are not understood. We previously found that RNAi factors, which negatively regulate gene expression, form factories for heterochromatin formation at nuclear periphery in fission yeast.

In this study, we found that RNAi factors contribute to the nuclear periphery localization of heterochromatin. In addition, analysis of nuclear membrane proteins revealed that Lem2 plays a role in the formation and the nuclear periphery localization independently on RNAi factors. Especially, Lem2 regulates heterochromatin in response to the growth condition. These findings are important for the understanding of epigenetic response to environmental changes.

研究分野：分子生物学

キーワード：クロマチン エピジェネティクス 核膜 環境応答 分裂酵母

## 1. 研究開始当初の背景

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、染色体維持など多彩なゲノム機能を持つことが示された。ヘテロクロマチンは種を越えて核膜のすぐ内側に局在する。しかし、この核膜局在の生理的意義は不明であった。最近の研究で、核膜近傍は遺伝子発現抑制の場として働くことが示唆されているが、一方で核膜孔付近で活性化がおこるとの報告もある。このような遺伝子の核内配置と遺伝子発現調節の関係は、ゲノムワイドなエピジェネティックな遺伝子発現調節の観点から最近注目をあつめているが、その実体はまだ明らかではない。

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もち、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必要であるという発見は、驚きを持って迎えられた[Volpe et al. Science 2002]。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も重要な知見である。RNAi に依存したヘテロクロマチン形成システムは高等植物にも存在し、動物でもその存在が示唆されており、普遍的なシステムである。

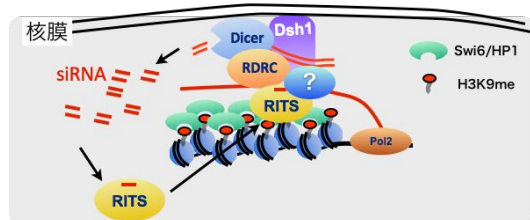
我々は分裂酵母ヘテロクロマチン関連因子の同定や、RNAi 依存性ヘテロクロマチンにおける ncRNA の動態の解析をおこなってきた。特に CENP-B ホモログ[Nakagawa et al. Genes Dev 2002]や RNA ポリメラーゼ II(Pol2) [Kato et al. Science 2005]に関する解析、リン酸化を介したヘテロクロマチン機能制御 [Shimada et al. Genes Dev 2009]、DNA:RNA hybrid の関与[Nakama et al. Genes Cells 2012]、転写メディエーターの関与[Ohya et al. Plos Genet. 2013]、Pol2 の CTD (C-terminal repeats)のリン酸化の関与など、ユニークな研究でこの分野に貢献してきた。さらにその後の解析から以下のような興味深い知見を得ている

またヘテロクロマチンの核膜局在の意義に関して、以下の非常に重要な知見を得ていた。

新規 RNAi 関連因子 Dsh1 を突然変異株スクリーニングにより単離し、その機能を解析した。その結果、Dsh1 は、図に示すように、核膜内側で Dicer、RDRC (RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ複合体)、ヘテロクロマチンと相互作用し、ヘテロクロマチン形成に必須の siRNA の増幅をおこなう「場」を形成することを明らかにした[Kawakami et al. Genes

Dev 2012] (図 1)。これはヘテロクロマチンの核膜局在の意義の一つを示している。さらに、核内膜タンパク質 Lem2 の欠損によりヘテロクロマチン形成と核膜局在が同時に損なわれることも見いだしていた(川上、東、未発表)。

図 1 siRNA 合成場



最近 Dicer が核膜孔タンパク質と相互作用し核膜周辺に局在すること、また Dicer がストレス応答性遺伝子の basal level の発現を抑制することが示唆された[Woolcock et al. Genes Dev 2012]。一方、我々は上記の Pol2-CTD のリン酸化、メディエーターの解析の過程で、Dicer 欠損によるストレス応答性の遺伝子の発現上昇と同様の発現上昇が、CTD、メディエーター変異株でも見られ、両者に高い相関があることに気付いた(梶谷、大屋、未発表)。これは、ヘテロクロマチンで Pol2 と共役しておこる siRNA 合成系がユークロマチン上の制御をおこなっている可能性を強く示している。

## 2. 研究の目的

本研究では以下の 4 点を明らかにすることを目的とした。

- (1) RNAi 依存性ヘテロクロマチンシステムにおける siRNA 合成場の形成と核膜のつながりを明らかにする。
- (2) siRNA 合成場が転写と共役して形成されるメカニズムを明らかにする。
- (3) ヘテロクロマチン形成における核膜の関与の詳細、特に各膜蛋白質の関与について見当する。
- (4) この核膜を介したシステムがゲノム全体の転写制御にどのように関わるのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) siRNA 合成場と核膜のつながり  
siRNA 合成場と核膜をつなぐ鍵となる因子 Dsh1 について、その相互作用因子を免疫沈降と質量分析を用いて同定し、核膜局在きこうとその制御機構を明らかにする。

(2) 転写と siRNA 合成場の共役

Pol2 の CTD リン酸化は転写と転写後の RNA プロセッシングを共役させる機能をもつことが推測されている。そこでこのリン酸化について repeat 内のリン酸化標的になる Ser のうち 2 番目、7 番目の Ser を Ala に置換した変異株を作成し、RNAi 依存性ヘテロクロマチン形成に及ぼす影響を詳細に解析する。

転写に共役してメチル化されるヒストン H3K36 のメチル化に関して、メチル化酵素の Set2 破壊株を用いて RNAi 依存性ヘテロクロマチン、および非依存性ヘテロクロマチン形成機構における H3K36me の機能を解析する。

### (3) ヘテロクロマチン形成における核膜タンパク質の関与

分裂酵母で知られている 3 種の核膜タンパク質 Ima1, Man1, Lem2 の破壊株を作製しヘテロクロマチン形成に対する効果を検討する。

### (4) RNAi 依存性ヘテロクロマチンと核膜を介したシステムがゲノム全体で果たす役割

CTD リン酸化部位変異株および RNAi に必須の因子 Dcr1 欠損株双方で影響を受ける遺伝子について(2) の解析で明らかになった機構が機能しているか検討する。

## 4. 研究成果

### (1) siRNA 合成場と核膜のつながり

核膜内側に局在し RNAi 因子と相互作用することから核膜と RNAi 合成場をつなぐ因子と予想される Dsh1 (図 1; [Kawakami et al. Genes Dev, 2012]) について、特に核膜局在機構を知ることを中心に相互作用因子の探索をおこなった。方法としては、tag のついた Dsh1 を発現する株から Dsh1 の免疫沈降をおこない、共沈する因子を質量分析を用いて解析する事にした。しかし、Dsh1 の発現量が低く、さらに不溶性画分に多くの部分が存在するために、質量分析に必要なタンパク質を沈降することができなかった。

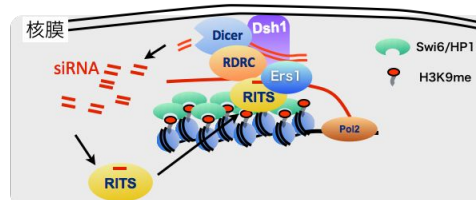
そこで、誘導可能なプロモーターを用いて Dsh1 を 5 倍程度過剰発現する条件下で細胞抽出液を作成し、免疫沈降をおこなったところ、質量分析可能な量が回収できた。

質量分析の結果、唯一 RNAi 因子の Ers1 との相互作用が確認できたが、他の因子との有意な相互作用は確認できなかった。

Ers1 は、中山等により RNAi 因子の RDRC と RITS を機能的につなぐコネクタール因子として報告されている因子である [Hayashi et al. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 2012]。一方、我々は Dsh1 は Dcr1 と RDRC と共沈することを見出していた [Kawakami et al. Genes Dev. 2012]。Ers1 は Dcr1 とは直接結合しないことから、Dsh1 と Ers1 が結合することにより、siRNA 合成場全体をコーディネートしていることが考えられる (図 2)。

通常の免疫沈降 + ウエスタンブロットで検出できる Dsh1 と RDRC の相互作用が質量分析で検出できなかったことは、十分な量の Dsh1 が免疫沈降できていなかったことを示している。今後、Dsh1 の回収率を上げるために、我々が最近開発した、遠心分離を用いない、細胞抽出液作成法を用いるなどの工夫が必要と考えている。

図2 Dsh1とErs1はRNAi因子のコネクタールとして機能する。



### (2) 転写と siRNA 合成場の共役

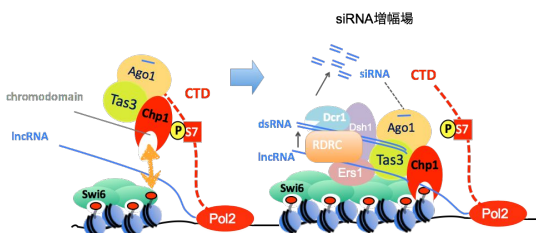
#### Pol2-CTD リン酸化と RNAi 増幅場形成

CTD を形成する 7 つのアミノ酸のうち、2 番目、7 番目の Ser(CTD-S7, CTD-S2) を Ala に変換した変異株 (*ctdS2A*, *ctdS7A*) をそれぞれ作成した。

両株とも、ヘテロクロマチンによるサイレンシングに異常をきたしたが、*ctdS2A* は siRNA、ヘテロクロマチン構造に異常はなく、転写後のサイレンシング、恐らくは RNA 分解に関与する事が示唆された。一方、*ctdS7A* では siRNA が合成されず RNAi 依存性ヘテロクロマチンが形成されない。そこで、*ctdS7A* について詳細な解析をおこなったところ、以下の様な CTD-S7 リン酸化が転写と共役したクロマチン上での siRNA 合成場における機能を明らかにした。

転写中の Pol2 の CTD-S7 リン酸化特異的に RNAi 因子の一つ RITS 複合体が Pol2 に結合する。RITS 複合体の構成蛋白質の一つ Chp1 はそのクロモドメインで H3K9me に結合するが、それと独立して RNA 結合能をもつ [Ishida, Mol. Cell, 2012] ため、H3K9me と転写された RNA に同時に結合することでヘテロクロマチン上に RNA を留める。この RNA 上で RITS, Ers1-Dsh1 を核として siRNA 合成場が構築される (図 3; [Kajitani et al. 投稿中])。

図3 Pol2-CTD-S7リン酸化はsiRNA増幅場形成を促す

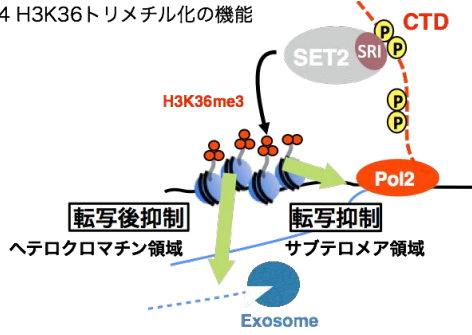


### H3K36me の機能

H3K36 はヒストンメチル化酵素 Set2 によりメチル化される。Set2 は転写中の Pol2 と CTD-S2 リン酸化特異的に相互作用して、転写に共役してトリメチル化をおこなう。この H3K36me がヘテロクロマチンに及ぼす影響を解析した。その結果、H3K36 トリメチル化はヘテロクロマチンで転写された RNA の Exosome による分解を介した、転写後抑制に必要であることが明らかとなった (図 4; [Suzuki et al. Nuc. Acid. Res. 2016])



図4 H3K36トリメチル化の機能



なお、この結果は(2) の CTD-S2 リン酸化が転写後抑制に関与するという結果とよく一致する。

(3) ヘテロクロマチンにおける核膜タンパク質の関与。(大阪大学、平岡博士との共同研究)

分裂酵母で既知かつ、他の生物種で保存されている核膜タンパク質 Ima1, Man1, Lem2 について破壊株を作成したところ、Ima1, Man1 についてはヘテロクロマチンに影響はないが、*lem2* 欠損株ではセントロメアヘテロクロマチンの H3K9me が大きく減少する。しかし、H3K9me を認識して結合する HP1 ホモログの Swi6 の量は Lem2 破壊でほとんど変化せず、他のヘテロクロマチン関連因子とは異なる興味深い表現型を示す。Lem2 はセントロメアヘテロクロマチンには局在しないが、ヘテロクロマチンに囲まれたキネトコア領域に局在する。

詳細な解析から、野生型株では EMMG から YES に培地をシフトすると H3K9me の量が3~4倍増加するが *lem2* 破壊株ではこの増加が起きないことが示された。つまりヘテロクロマチンへの Lem2 の関与は YES 培養時

に見られ、EMMS 培養時には見られない。さらに Lem2 は YES 培養条件下ではキネトコアクロマチンに結合するが、EMMG 培養条件下ではセントロメア領域のクロマチンから消失する。これらの結果は核膜蛋白質 Lem2 が栄養条件という環境変化に応答して、クロマチン結合パターンを変化させ、ヘテロクロマチンを制御していることを示す。

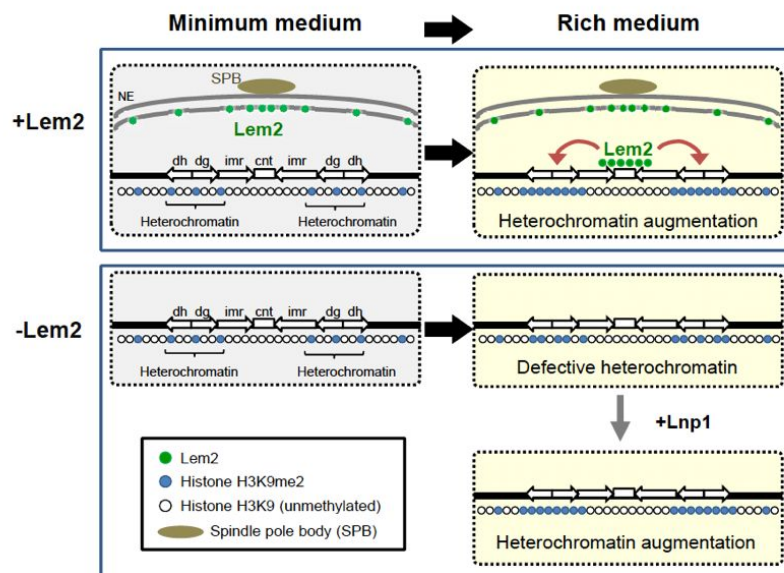
Lem2 欠損株はヘテロクロマチン異常の他に、生育遅延、染色体分配異常を示すが、いずれも YES 培養時にその表現型が観察され、EMMG 培養時ではみられない。さらに、これら3つの表現型はいずれも Lnp1 という ER タンパク質の増幅により抑制され、Lem2 のヘテロクロマチン制御と増速制御・染色体分配制御の間に相関がある。[Tange et al. Genes to Cells, 2016]

この結果は核膜蛋白質が環境変化に応じてクロマチン構造の変化を誘起すると言う初めての報告である。

(4) RNAi 依存性ヘテロクロマチンおよび核膜を介したシステムによるゲノム制御

(2) の CTD-S7 リン酸化欠損株では一部のストレス応答遺伝子の発現が上昇する。同じ遺伝子が Dcr1 欠損株でも同様の発現上昇を示すことから、CTD-S7 リン酸化がヘテロクロマチンと同様に RNAi 因子を転写された RNA にリクルートし RNAi による RNA 分解を介して遺伝子発現を抑制している可能性が示唆された。そこで CTD-S7 リン酸化依存的に RITS 複合体が標的遺伝子の RNA 産物に結合するか検討したところ、確かに結合することが確認できた。これはユークロマチン上でも H3K9 メチル化はないものの、転写と共役して CTD-S7 リン酸化依存的に RNAi 因子が呼び込まれて遺伝子抑制を行って

図5 Lem2による培養条件に応答するヘテロクロマチン制御



ることを示唆している(Kajitani et al 準備中)。今後、この機構の詳細を検討していく必要がある。

また、H3K36 メチル化についても、解析をすすめたところ、サブテロメア領域に存在する一群の遺伝子が H3K36 トリメチル化依存的に、転写段階で遺伝子抑制をうけることがあきらかになった。これは H3K36 メチル化の新規機能を明らかにしたものである。[Suzuki et al. Nuc. Acid. Res. 2016]

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tange, Y., Chikashige Y., Takahata S., Kawakami K., Higashi M., Mori C, Kojidani T., Hirano Y., Asakawa H., Murakami Y., Haraguchi T., and Hiraoka Y.: Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions. (2016) Genes to Cells, in press (査読あり)

Suzuki, S., Kato, H., Suzuki, Y., Chikashige, Y., Hiraoka, Y., Kimura, H., Nagao, K., Obuse, C., Takahata, S. and Murakami, Y.: Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. (2016) Nucleic Res. in press (DOI: 10.1093/nar/gkw008) (査読有り)

Suzuki, S., Nagao K., Obuse C., Murakami Y. and Takahata S.: A Novel Method for Purification of the Endogenously Expressed Fission Yeast Set2 Complex. (2014) Protein expression 97:44-49 (DOI: 10.1016/j.pep.2014.02.005)(査読有り)

〔学会発表〕(計 4 件)

鈴木詔大、高畑信也、村上洋太 ”H3K36 tri-methylation but not H3K36 di-methylation is required for gene silencing in Schizosaccharomyces pombe” The 8<sup>th</sup> international fission yeast meeting, 2015 年 6 月 21-26 日, 生田会館(兵庫県神戸市)

村上洋太 “Roles of putative jmjC-domain demethylase Epe1 in pericentromeric cohesion and epigenome maintenance” The 8<sup>th</sup> international fission yeast meeting, 2015 年 6 月 21-26 日, 生田会館(兵庫県神戸市)

梶谷卓也., Hermand D., 村上洋太 “Ser7 phosphorylation of RNAPII-CTD ensures on-chromatin retention of nascent

ncRNAs triggering RNAi-dependent heterochromatin formation.” Cell Symposia on Transcription Regulation in Development, 2014 年 7 月 13-17 日, シカゴ(米国)

村上洋太 “A CTD code of RNA polymerase II promotes heterochromatin formation via lncRNA and RNAi.” IIAS Research Conference 2014 “Chromatin decoding” 2014 年 5 月 12-15 日 国際高等研究所 精華町(京都府)

〔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

加藤 太陽 (KATO, Hiroaki)  
島根大学医学部 助教  
研究者番号: 40548418

##### (3) 連携研究者

高畑 信也 (TAKAHATA, Shinya)  
北海道大学大学院理学研究院 助教  
研究者番号: 50381588