

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 23 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23724

研究課題名(和文)細胞分化に寄与する構成的ヘテロクロマチン関連因子の同定とその分子機構の解明

研究課題名(英文)Revealing the molecular mechanisms underlying constitutive heterochromatin transition during cellular differentiation

研究代表者

西淵 剛平(NISHIBUCHI, GOHEI)

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：50846508

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文):真核生物のゲノムDNAはクロマチン構造を形成しており、転写が行われない領域や繰り返し配列で構成されるゲノム領域は抑制的なヘテロクロマチン構造を形成している。本研究では、細胞分化時におけるヘテロクロマチン構造の変化や部位特異的なヘテロクロマチン構造の形成機構について、分子レベルで明らかにするための実験系の構築を行った。具体的には、ヘテロクロマチンの形成状態を評価できるレポーターシステムの構築を行い、任意のヘテロクロマチン構成因子を呼び込むことで転写が抑制されるアッセイ系の確立に成功した。また、dCas9-APEX法を用いた部位特異的なプロテオミクスを行うための細胞株を樹立し条件検討を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物は、使用する遺伝子の種類を細胞分化や発生の過程で巧みに使い分けることで複雑な個体を完成させている。可変的かつ安定的な遺伝子発現環境の構築のためにクロマチン構造を形成しているが、その制御メカニズムについては未だ不明な点が多い。本研究では、中でも抑制されたクロマチン構造がいかにして安定的に維持できるのか、またダイナミックに変化できるのかについて検証するための実験系の構築を行った。その結果として、遺伝子制御に寄与するヘテロクロマチン関連タンパク質の同定とその評価システムを完成することができ、今後この手法を活用することで、遺伝情報の遷移機構についてより理解を深めることができると考えられる。

研究成果の概要(英文):Eukaryotic genomic DNA forms a chromatin structure to pack into the nucleus, and non-transcriptional regions and repetitive sequences are forming repressive chromatin structure called heterochromatin. In this study, I established new biotechnological tools to reveal the molecular mechanisms of the changes in site-specific heterochromatin structure during cellular differentiation. At first, I constructed a reporter assay system to examine the heterochromatin structure establishment and succeeded to confirm transcriptional suppression activity by recruiting heterochromatin factors at reporter gene region. In addition, I established the cell line for site-specific proteomics using the dCas9-APEX method to reveal the heterochromatin binding proteins.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ヘテロクロマチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

真核生物は長大なゲノム DNA を核内にコンパクトに収納するために DNA がヒストン八量体に巻きついたクロマチン構造を形成している。転写される遺伝子領域などはユークロマチンと呼ばれる比較的緩んだ構造をとっているが、転写が抑制化された遺伝子領域や繰り返し配列で構成される領域は高度に凝集した構造をとっており、ヘテロクロマチンと呼ばれる。ヘテロクロマチン構造は染色体の安定性や遺伝子の不活性化に寄与しており、正常な細胞機能を支える基盤となる核内構造である。また、細胞分裂や発生、分化を通して安定的なヘテロクロマチン構造は構成的ヘテロクロマチンと呼ばれ、エピジェネティックに制御されていることが様々なモデル生物による解析から明らかにされてきた。一方で近年、一部の構成的ヘテロクロマチンを制御する因子やヒストン修飾が、発生や分化の際にその量や局在箇所が変化することがわかってきた。したがって従来のモデルだけでは説明できない、ヘテロクロマチンを制御する新しい分子メカニズムが存在することが示唆されている。しかしながら分化の過程でヘテロクロマチン構造がどのように制御されているのか、その分子レベルでのメカニズムはほとんど明らかとなっていない。

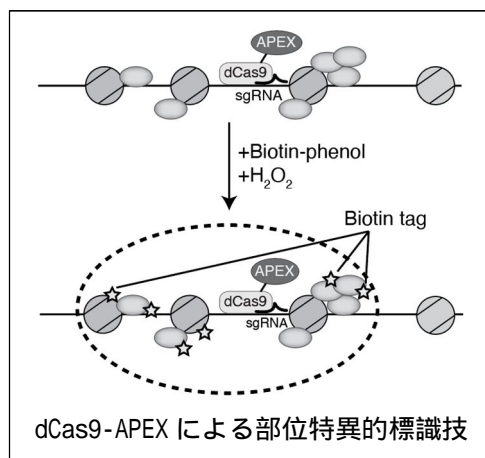
2. 研究の目的

本研究では、分化前後におけるヘテロクロマチン領域の結合因子を同定し、その因子のヘテロクロマチン形成への寄与を評価することで、分化時特異的に起こるヘテロクロマチン構造の遷移メカニズムについて分子レベルで明らかにすることを目標とした。また、新たな同定したヘテロクロマチン関連因子を検証するアッセイシステムの構築を目的とし研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 分化前後におけるヘテロクロマチン領域の結合因子の同定

研究開始当初はヘテロクロマチンの主要な構成因子である HP1 ファミリータンパク質の相互作用因子の探索を未分化な細胞と分化した細胞で行う予定であった。実際に未分化時に多くの相互作用因子の同定に成功したが、使用していた過剰発現システムでは、細胞増殖が抑制されることが判明した。そこで、研究期間中に CRISPR/Cas9 システムと近位標識システムを組み合わせ、dCas9-APEX 法を導入することでゲノムの特定の部位に近接する因子を同定することを試みた。CRISPR/Cas9 (dCas9) は、ゲノム編集ツールとして利用されているがそのヌクレアーゼ活性を欠いた dCas9 は guide RNA の示すゲノム領域にターゲティングさせるツールとして応用が進んでいる。また、APEX (Ascorbate peroxidase) はビオチンフェノールと過酸化水素水存在下で近位タンパク質にビオチンを付加する手法に使われている。これら dCas9 と APEX の融合タンパク質 (dCas9-APEX) を利用することで、特定のゲノム領域に結合あるいは近接するタンパク質を網羅的に同定することが可能である (右図参照)。本研究では、ターゲットとして代表的な構成的ヘテロクロマチンであるテロメア領域を研究対象とした。



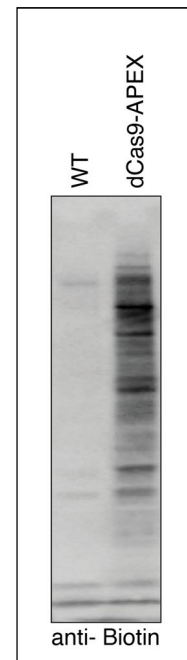
(2)同定したタンパク質のヘテロクロマチン形成能評価システムの構築

特定のタンパク質をレポーター遺伝子上の様々な場所にリクルートし、その転写調節機能を評価できるアッセイ系を構築し、同定したヘテロクロマチン関連タンパク質の転写抑制能を評価するシステムの確立を目指した。特定の遺伝子領域へのリクルートには(1)と同じく dCas9 システムを利用し、転写調節領域とレポーター遺伝子をマウス ES 細胞に組み込み既知のヘテロクロマチン関連因子を使用することで系の検証を行う。

4. 研究成果

(1) 分化前後におけるヘテロクロマチン領域の結合因子の同定

前項でも記載したが、ES 細胞において HP1 を過剰発現すると細胞増殖に影響が見られた。外来遺伝子の発現系を変更することも考慮したが、分化前後のクロマチン構造の変化を評価するにあたり、ヘテロクロマチン構造を変えうる過剰発現系ではなく dCas9-APEX 法を用いることにした。まず代表的なヘテロクロマチン構造を形成する部位として知られるテロメア領域に対して guide RNA を設計し、dCas9-APEX が機能するか検証することにした。その結果、dCas9-APEX 発現細胞でのみ、ビオチンフェノールと過酸化水素水を介した内在性タンパク質のビオチン化に成功した(右図参照)。また、ビオチン化タンパク質を、ストレプトアビジンビーズを利用して精製し、質量分析による解析を行った。その結果、一部のテロメアタンパク質を同定することができ、系の導入に成功した。しかしながら、既知の多くのテロメアタンパク質が同定できていないことから、さらなる条件検討が必要であると考えている。



(2)同定したタンパク質のヘテロクロマチン形成能評価システムの構築

マウス ES 細胞内に転写調節領域と GFP 遺伝子を組み合わせたレポーター遺伝子のカセットを導入し、細胞を樹立した。代表的なヘテロクロマチン構成因子である HP1 やその他の既知のヘテロクロマチン関連タンパク質をレポーター遺伝子上の様々な場所にリクルートし、その転写抑制能を評価した結果、HP1 を含む複数の因子で、転写の部分的な抑制が確認できた。

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