

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22248004

研究課題名(和文) 遺伝子組換え昆虫ゲノムのエピジェネティック制御

研究課題名(英文) Epigenetic control of the genome functions of transgenic insect

研究代表者

日下部 宜宏 (Kusakabe, Takahiro)

九州大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：30253595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,800,000円、(間接経費) 10,440,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ヒストンコードの解読と構成的なヘテロクロマチン形成の分子機構の理解を通じて、そのエピジェネティックな変化がDNA修復・組換えや染色体構造の安定化に及ぼす影響を明らかにすることを目的に研究を行った。

まず、ヒストンH3を中心に解析を行い、カイコヒストンコードを解読した。次に、H3K9-HP1とH3K27-Polycombシステムに関する因子の解析を行い、その分子基盤を明らかにした。一方、カイコ分散型動原体染色体における特異的な動原体形成機構と細胞分裂各ステージにおける、動原体形成因子の機能を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In order to understand the molecular relationship between the epigenetic modification of chromatin and DNA metabolism, and maintenance of chromosomal structure, we analyzed the histone code of silkworm holocentric chromosomes and its role on the formation of constitutive heterochromatin. First, the histone code of silkworm histone H3 was determined. Then, almost all components of H3K9-HP1 and H3K27-Polycomb systems had been cloned and their roles on the formation of constitutive heterochromatin were analyzed. Finally, the molecular structure of silkworm kinetochore was revealed.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：応用昆虫

キーワード：ヘテロクロマチン 染色体 エピジェネティクス ヒストンコード

1. 研究開始当初の背景

カイコやショウジョウバエなどの昆虫では遺伝子組換え昆虫を作製する技術が確立・普及して来ている。特に、カイコは昆虫工場の宿主として、鱗翅目害虫のモデル昆虫として、また、昆虫特異機能の解明とその応用において、組換え昆虫を利用した新規機能の導入や遺伝子機能の解析の必要性が増大している。これまで、組換え昆虫関連の研究分野では、効率良く組換え昆虫を得る方法の開発が主体であり、作製した遺伝子組換え昆虫の制御に関する研究は少ない。我々は、カイコ *AGO2* タンパク質が外来 DNA の染色体への相同組換え (ジーンターゲットング) の阻害に参与していることを示した。この組換え阻害の分子基盤は明らかとはなっていないが、カイコ細胞は DNA の存在部位を認識し、その認識に *AGO2* を介したクロマチン構造のエピジェネティックな変化が関与している可能性が高いと考えられる。このような分子基盤を理解し、局所的または一時的に遺伝子組換えが起こりやすいクロマチン構造を人工的に作り出すことができれば、遺伝子導入効率を飛躍的に向上させることが可能となる。また、遺伝子組換え昆虫において、一度導入した外来遺伝子が導入直後は活発に転写されていたのに、世代を減るにつれエピジェネティックな修飾を受け次第に発現量を低下させる現象が知られている。この現象の克服は、導入した遺伝子周辺のクロマチンにどのような経時的な変化が生じ、なぜそのような変化生じるのか、どうすればそのような変化を回避できるのかなど、昆虫エピジェネティクスの総合的な理解が必要であり、今後は、昆虫ゲノムのエピジェネティクスと DNA メタボリズムの関連を理解した上で、組換え昆虫を作製・利用することが重要となる。哺乳類においては、エピジェネティクス研究は DNA メチル化修飾の解析を中心に進められて来た。しかし近年、ヒストンのアミノ末端の多彩な化学修飾とクロマチン構造との関連が明らかにされ、クロマチンの暗号とも呼ぶべきヒストンコードが次々と解読されている。一方、昆虫では、ショウジョウバエ、カイコ、ハマダラカ、コクヌストモドキなどのゲノムが解読されているが、ポストゲノム研究は発展途上であり、ショウジョウバエ以外の昆虫ではヒストンコードさえも不明である。さらに、昆虫ゲノムのクロマチン構造はいくつかの特異な性質を有するという問題がある。ショウジョウバエゲノムには DNA 塩基のメチル化修飾自体が存在しないが、カイコではメチル化修飾を受ける、カイコ染色体は分散型動原体を有する (1 染色体に 1 動原体が一般的)、ショウジョウバエとカイコはともにテロメアの維持にトランスポゾンを利用しているなどの特徴が知られている。特に動原体やテロメア領域はヘテロクロマチンを形成していることが知られているが、カイコにおいてこれらの領域がヘテロクロマチン化されて

いるのか否かさえ不明である。このような特徴は、昆虫エピジェネティクス研究進展の困難さを予想させる一方で、昆虫を材料にエピジェネティクス研究を行うことの重要性を示唆しており、遺伝子組換え昆虫の利用を含めた次世代の応用昆虫学には不可欠であると考えられる。

2. 研究の目的

これまで、トランスクリプトーム、タンパク質の発現プロファイルから生命現象に迫るプロテオーム、そして細胞内代謝物の網羅的解析を行うメタボローム研究は着実に成果を揚げつつあり、ゲノム解析からメタボロームにいたる研究手法は、DNA 複製 mRNA 発現 タンパク質合成 機能発現 (代謝) という遺伝子発現のセントラルドグマの過程を下流へと辿って来た。しかし、本来、ゲノム解析からトランスクリプトームの間に位置するはずのエピジェネティクス解析は、その解析の困難さ故に敬遠されてきた。

ほぼ同一のゲノム組成を有する多細胞性生物の多様な組織の細胞が、各組織に特異な個性を発現する分子機構の解明は、トランスクリプトームやプロテオーム解析などの従来のアプローチのみでは限界がある。また、生物の加齢に伴う疾患の発症や、遺伝子組換え生物における外来遺伝子の経時的な発現抑制には、正常な細胞の分化プログラムの進行を伴わないクロマチン構造変換が関与していることが知られている。狭義のエピジェネティクスは、クロマチンへの後天的な修飾により遺伝子発現が制御されることに起因する遺伝学をさすが、本課題では、昆虫クロマチン修飾の分子基盤の解明とそのエピジェネティックな変化が DNA 修復・組換えや染色体構造の安定化に及ぼす影響を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、① カイコヒストンコードの解読し、ヒストン修飾の組み合わせとクロマチン構造の対応関係を解析する。② 構造的なヘテロクロマチンのランドマークとされる H3K9-HP1 システムと、限定的な局所ヘテロクロマチンのランドマークとされる H3K27-Polycomb システムを中心に、分散型動原体を有するカイコ染色体におけるヘテロクロマチン形成 (コア構造) の分子基盤を解析する。③ ヘテロクロマチン形成の制御に関わる遺伝子群の機能解析、特に Argonaute 遺伝子群を中心とした外来核酸へのゲノム防御の分子基盤を解析する。④ カイコゲノムへの外来遺伝子の経時的な発現量変化とエピジェネティックな修飾変化について解析する。

4. 研究成果

① カイコヒストンコードの解読については、ヒストン H3 とそのバリエーション (H3.3)

を中心に解析を行い、H3K4、H3K9、H3K14、H3K18、H3K23、H3K27 についてのメチル化及びアセチル化修飾の組み合わせを明らかとした。一方、アルギニン残基とリン酸化を受けるセリン、スレオニン残基の修飾についてはほとんど未修飾であることが明らかとなった。また、カイコ特異的な修飾が存在する可能性が示唆された。そこで、カイコH3における特異修飾の機能を明らかにするために点突然変異を導入した。まず、内在性のヒストン遺伝子のみをノックダウンし、外来の突然変異遺伝子を発現するシステムを構築した。人工合成した遺伝子は内在遺伝子を相補することができたが、細胞の増殖速度が低下した。次に、ヒストンN末端の修飾残基をアラニンに置換した突然変異体(K4, K9, K27, S10)を作製し、細胞に導入後、内在性のH3遺伝子をノックダウンしたところ、S10については細胞周期のM期遅延がみとめられ、その他の変異体についても細胞増殖の抑制が認められた。

② カイコは分散型動原体染色体という特殊な染色体構造を有しており、セントロメア周辺のヘテロクロマチン構造が染色体上の多くの遺伝子発現に影響を与えていると予測された。そこで、H3K9-HP1とH3K27-Polycombシステムに関与する因子の解析を行った。セントロメア周辺のヘテロクロマチン構造の形成に関わるカイコH3K9-HP1システムについてCHIP-seq解析を行ったところ、トランスポゾンの中でもかたよった配列の領域がヘテロクロマチン化されていることが示唆され得た。また、3種のHP1タンパク質、HP1a、HP1b、HP1cについては、ノックダウン細胞での顕著な表現型は現れず、RNA-Seq解析によりトランスポゾンや反復配列の転写が亢進していることが明らかになった。これと関連して、カイコSIWI、AGO3タンパク質がHP1依存的な転写抑制に関与していること、また、HP1bはHP1aを介してSIWI、AGO3タンパク質と相互作用していることを明らかにした。ヘテロクロマチンコア構造の解析に関しては、カイコH3K27-Polycombシステムに関与する因子の解析を行った。カイコゲノムよりシステムに関与する13遺伝子をクローニングし、RNAi法を用いた遺伝子機能阻害実験によりこれらの遺伝子がH3K27のモノメチルからトリメチルへの修飾に関わっていることを示した。また、H3K27-Polycombシステムに関してはノックダウン時のマイクロアレイ解析をにより、Polycomb複合体のfull assemblyに依存した遺伝子発現抑制経路とPho-Scmにのみ依存した経路の少なくとも2種の経路が存在することが明らかとなった。さらに、ポリコム遺伝子ノックダウン細胞のマイクロアレイ解析から同定されたカイコゲノム上のPolycombシステム標的遺伝子ASNSについて、その転写が細胞周期に依存したPolycombによる抑制とC/ebpに依存した活性化の競合に

より制御されていること、またその制御にかかるプロモーター上の領域を同定した。

一方、動原体形成において重要な役割を担っているCPC複合体の解析から、カイコ染色体においては、分裂中期の染色体の整列に染色体から発生した紡錘糸が重要な役割を果たしていること、その形成にCPC複合体の働きが必須であることを明らかにした。また、分裂中期以降の染色体の分配には、中心体からの二極性紡錘糸の形成が必要であることも確認した。

③ カイコヘテロクロマチン制御に関わる遺伝子群の機能解析については、既に4種のカイコArgonaute遺伝子をクローニングしていたが、これらの遺伝子のノックダウン時における遺伝子発現への影響をマイクロアレイで解析した。その結果、カイコSIWI及びAGO3によって制御されている反復配列群を同定した。また、カイコSIWI、AGO3遺伝子が相互作用する際には、顆粒状の構造体を形成し、この構造体は生殖細胞に認められるNurge様の構造であることが明らかとなった。この構造体には、Yb-bodyに含まれるタンパク質は存在しないことも明らかにした。Nurge様の構造へのSiwi-Ago3複合体の局在にはカイコVasaタンパク質の存在が必須であった。カイコアルゴノート遺伝子SIWIとAGO3がH3K9-HP1システムと核において相互作用し、その相互作用は転写に抑制的に働くことを明らかにした。カイコHP1bはHP1aと比較して強い転写抑制活性を示すが、SIWI-AGO3に依存して転写調節領域にリクルートされた場合、その効果はHP1aに依存することも明らかにした。

④ 遺伝子組換えカイコを用いた導入遺伝子の安定性制御とエピジェネティックな発現制御機構の解明については、導入したレポーターカセットの挿入部位周辺のクロマチン構造と転写活性を解析するために次世代シーケンサーを用いたHP1及びPolycombについてのChip-Seq解析を行ったが、現在まで特徴的なヘテロクロマチン誘導は観察されていない。そこで、遺伝子組換えカイコにおける導入遺伝子の安定性制御とエピジェネティックな発現制御機構には、カイコ細胞核内におけるクロマチン領域の空間制御に関する理解が必要であると考え、クロマチンループ形成におけるカイコインシュレーターCTCFとその相互作用因子CP190をクローニングした。これらの遺伝子のノックダウン細胞を作製し、次世代シーケンサーを用いたRNA-Seq解析を行ったところ、200個以上の転写亢進遺伝子を見出した。

細胞核において遺伝子発現制御に大きな役割を担っているカイコDNAのメチル化修飾については、BmDnmt1ノックダウン細胞では17遺伝子が発現量の低下、27遺伝子が上昇すること、BmDnmt2ノックダウン細胞では37遺伝子が発現量低下、7遺伝子が発現量上昇することを明らかにした。

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10件)

Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Yutaka Kawaguchi, Takahiro Kusakabe, (2011) Double-strand breaks repair by gene conversion in silkworm holocentric chromosomes. *Mol. Genet. Genomics*, 286, 215-224.

Hiroaki Mon, Makiko Izumi, Hitoshi Mitsunobu, Tsuneyuki Tatsuke, Kazuhiro Iiyama, Hiroyuki Jikuya, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2011) Post-translational modifications of the N-terminal tail of histone H3 in holocentric chromosomes of *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 41, 902-908.

Zhiqing Li, Tsuneyuki Tatsuke, Kosuke Sakashita, Li Zhu, Jian Xu, Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2012) Identification and characterization of Polycomb group genes in the silkworm, *Bombyx mori*. *Mol. Biol. Report*, 39, 5575-5588.

Hitoshi Mitsunobu, Makiko Izumi, Hiroaki Mon, Tsuneyuki Tatsuke, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2012) Molecular Characterization of heterochromatin proteins 1a and 1b from the Silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Mol. Biol.* 21, 9-20.

Zhiqing Li, Daojun Cheng, Hiroaki Mon, Tsuneyuki Tatsuke, Li Zhu, Jian Xu, JaeMan Lee, Qingyou Xia, Takahiro Kusakabe, (2012) Genome-wide identification of Polycomb target genes reveals a functional association of Pho with Scm in *Bombyx mori*. *PLoS ONE*, 7, e34330.

Ryohei Sugahara, Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2012) Monoubiquitination-Dependent Chromatin Loading of FancD2 in Silkworms, a Species Lacking the FA Core Complex. *Gene*, 501, 180-187.

Tsuneyuki Tatsuke, JaeMan Lee, Kazuhiro Iiyama, Hideki Sezutsu, Keiro Uchino, Takahiro Kusakabe, (2013) Tightly controlled Tetracycline-inducible transcription system for explosive gene expression in cultured silkworm cells. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 82, 173-182.

Ryohei Sugahara, Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2014) Middle region of FancM interacts with Mhf and Rim1 in silkworm, a species lacking the FA core complex. *Insect Mol. Biol.* in press

Tsuneyuki Tatsuke, Hitoshi Mitsunobu, Li

Zhu, Kaito Yoshimura, Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, (2014) Roles of Piwi proteins in transcriptional regulation mediated by HP1s in cultured silkworm cells. *PLoS ONE*, in press

Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Kazuei Mita, Marian Goldsmith, Takahiro Kusakabe, (2014) Chromatin-induced spindle assembly mediated by chromosome passenger complex plays an important role in metaphase congression of silkworm holocentric chromosomes. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 45, 40-50.

[学会発表](計7件)

Takahiro Kusakabe, Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Xu Jian, Li Zhiqing, Soaking RNAi and its application on insect sciences. 2013年5月2日~5月3日、韓国蚕糸学会本会、大韓民国平昌郡。

吉末真吾、田附常幸、阪下浩介、門宏明、李在萬、日下部宜宏、カイコにおける RNAi 経路の解析。日本蚕糸学会第82回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2012年3月18日~3月19日、福岡市。

Li Zhu, Tsuneyuki Tatsuke, Hiroaki Mon, JaeMan Lee, Takahiro Kusakabe, BmTudor-sn interact with BmAgo1 and BmAgo2 not to be involved in RNAi pathway, while to participate in stress granule formation in BmN4 cells. 日本蚕糸学会第82回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2012年3月18日~3月19日、福岡市。

藤井美江、門宏明、高橋将晃、光延仁志、李在萬、日下部宜宏、カイコ培養細胞NHEJにおける修復関連遺伝子ノックダウンの影響。日本蚕糸学会第82回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2012年3月18日~3月19日、福岡市。

永田祐大、副嶋泰彦、門宏明・李在萬、日下部宜宏、カイコ培養細胞における N-グリコシル化経路の改変とタンパク質発現系への応用。日本蚕糸学会第82回大会 蚕糸・昆虫機能利用学術講演会、2012年3月18日~3月19日、福岡市。

祝力、田附常幸、李志清、門宏明、李在萬、日下部宜宏、Analysis of P-bodies and stress granules in silkworm BmN4 cells. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日~12月16日、横浜市。

永田祐大、副嶋泰彦、門宏明、李在萬、日下部宜宏、カイコ-N-acetylglucosaminidase (BmFDL) のノックダウンが N-グリカン形成に与える影響 / Effect of RNAi for BmFDL in the N-glycosylation pathway. 第34回日本分子生物学会、2011年12月13日~12月16日、横浜市。

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日下部 宜宏(クサカベ タカヒロ)
九州大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号: 30253595

(2) 研究分担者

山本 公子(ヤマモト キミコ)
独立行政法人農業生物資源研究所・その他
部局等・その他
研究者番号: 40370689

(3) 研究分担者

李 在萬(リ ジャエマン)
九州大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 26660271