

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780351

研究課題名(和文) ユビキチン化による高次クロマチン構造形成機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of ubiquitin modification regulating heterochromatin structure

研究代表者

白井 温子 (Shirai, Atsuko)

独立行政法人理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室・研究員

研究者番号：60525575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：ヘテロクロマチンは発生や疾患におけるエピジェネティックな遺伝子発現抑制など、様々な生命現象に重要な役割を果たす最も代表的な高次クロマチン構造であるが、その形成の仕組みの詳細は未だに不明な点が多い。本研究により、申請者は哺乳類でもヘテロクロマチン形成にノンコーディングRNA(ncRNA)が関与していることを明らかにし、保存性の高い因子であるRNAポリメラーゼIIの構成因子がCul4ユビキチンリガーゼによってユビキチン化修飾されることを見出した。

研究成果の概要(英文)：In eukaryotes, heterochromatin mediates diverse biological processes including gene silencing and regulation of long-range chromatin interaction. However, the mechanism underlying heterochromatin formation is poorly understood. Our study showed that non-coding RNA in mammals involved in heterochromatin formation and the subunit of highly conserved RNA polymerase II was ubiquitinated by Cul4 ubiquitin ligase.

研究分野：細胞生物学

科研費の分科・細目：境界農学、応用分子細胞生物学

キーワード：ヘテロクロマチン ユビキチン化修飾 Cul4ユビキチンリガーゼ ヒストンメチル化酵素 RNA

### 1. 研究開始当初の背景

DNA 解析技術の飛躍的な進歩により、近年、多くの生物でゲノム情報が解読されている。しかし、生命現象の多くは DNA の塩基配列の情報だけでは説明できず、DNA 配列の変化を伴わずに可逆的にゲノムの機能を調節するエピジェネティクスに注目が集まっている。このエピジェネティックな遺伝子発現制御に重要な役割を果たしているのがヘテロクロマチンである。ヘテロクロマチンは高度に凝縮したクロマチン構造で、染色体の維持や、発生や疾患におけるエピジェネティックな遺伝子発現抑制など、様々な生命現象に重要な役割を果たす最も代表的な高次クロマチン構造であるが、その形成の仕組みの詳細は未だに不明な点が多い。

一方で、Cul4 ユビキチンリガーゼ複合体によるユビキチン化がヘテロクロマチン形成に関与していることを示唆する研究結果が 2004 年に報告されたが、Cul4 ユビキチンリガーゼ複合体によってどのヘテロクロマチン因子がユビキチン化されるのかは明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

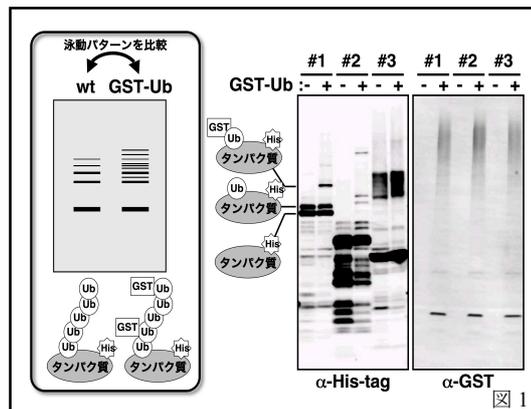
研究代表者は、以前の研究において、分裂酵母の全タンパク質について翻訳後修飾を受けるタンパク質を網羅的に同定していたが、この過程でユビキチン化タンパク質の候補として、ヘテロクロマチン形成に関与する因子を見出していた。そこで、本研究では、これらユビキチン化タンパク質の候補に加え、新たな手法を開発してヘテロクロマチン関連因子のユビキチン化修飾を見出すことによって、Cul4 ユビキチンリガーゼ複合体によってユビキチン化されるタンパク質を同定し、ヘテロクロマチン形成におけるユビキチン化修飾の役割の解明を目指した。

また、分裂酵母ではノンコーディング RNA の一つである siRNA (small interference RNA) による RNAi (RNA interference) 機構が核内のヘテロクロマチン形成にも関与していることが知られている。しかし、哺乳類ではノンコーディング RNA がヘテロクロマチン形成に関与しているかどうかは明らかになっておらず、進化的に保存性の高いヘテロクロマチン形成機構の解明が必須である。そこで、本研究では進化的に保存性の高いユビキチン化修飾に着目することにより、高等真核生物にまで保存されたヘテロクロマチン形成機構の解明を目指した。

### 3. 研究の方法

これまでの研究において、分裂酵母のゲノム計画で予測されたすべての遺伝子約 5,000 種類にタグを融合して発現させるリバースプロテオミクスの手法を用いて、様々なタンパク質翻訳後修飾を同定していたが、この過程で、ユビキチン化を受ける候補タンパク質としてヘテロクロマチン構造形成に関与す

るタンパク質を多数見出した。さらに、この候補タンパク質が本当にユビキチン化されるかどうかを個別に検証すると共に、他にもユビキチン修飾を受けるタンパク質が存在するか検証するため、ヘテロクロマチン関連因子 59 種類に注目し、迅速にユビキチン化タンパク質を検出する手法である GST-Ub 法の構築を始めた。GST-Ub 法とは、まず分裂酵母のユビキチンをコードしている 5 種類のユビキチン遺伝子の一つである *ubi5* 遺伝子の 5' 末端に GST タグを挿入した株 (GST-ub 株) に、候補タンパク質を発現させる (図 1)。その後、全細胞抽出液を調製し、SDS-PAGE に供した後、*ubi5* にタグを挿入していない株で発現させた場合との各タンパク質の泳動パターンの違いを検出するという方法である。ユビキチン化が起こっている場合、GST-Ub が取り込まれると分子量の異なる分子が生じて泳動パターンが変化すると考えられる。この泳動パターンの違いを標的タンパク質に付加してある His タグを認識する抗体で検出する事で、ユビキチン化タンパク質かどうかを判断する事が可能となる。



本研究では、これらの網羅的な手法によってユビキチン化の候補として挙げられたタンパク質が本当に修飾を受けるか、変性条件下で候補タンパク質を精製し、結合タンパク質を除去した後、GST-Ub 法を用いてユビキチン化修飾を受けるヘテロクロマチン関連因子の同定を試みる。

さらに、同定したタンパク質が Cul4 ユビキチンリガーゼ複合体によりユビキチン化されるかどうかを検証するため、リガーゼ複体の構成因子である Clr4 と Rik1 をコードする遺伝子の各破壊株を作製し、各タンパク質のユビキチン化レベルが変動するかどうかを検証する (Cul4 をコードする遺伝子を破壊すると生育が著しく低下するため)。

### 4. 研究成果

#### (1) ユビキチン化修飾を受けるヘテロクロマチンタンパク質の同定

以前の研究において構築した分裂酵母全タンパク質が受ける翻訳後修飾のデータと、先行する研究より構築した迅速にユビキチン化タンパク質を同定する GST-Ub 法から、複数タンパク質のユビキチン化を見出して

いた。

ただ、この手法はヘテロクロマチン関連遺伝子を過剰発現させるため、各タンパク質の生体内の機能を反映していない可能性がある。そのため、通常はユビキチン化修飾されていないタンパク質のユビキチン化を検出していたり、生体内ではユビキチン化されているはずのタンパク質のユビキチン化修飾を検出できていなかったりする可能性がある。そこで、生体内の発現量を反映できる、ヘテロクロマチン関連タンパク質をコードする遺伝子 59 種類の内在性の ORF の 3' 末端に小分子の 3×FLAG と His タグを挿入した約 100 株の構築を行い、上記 GST-Ub 法およびプロテアソーム阻害剤を用いた同定を行うことで、候補タンパク質を見出した。

しかし、この GST-Ub 法では全細胞抽出液を使用するため、抗 FLAG 抗体が認識する非特異的なタンパク質のバンドと本来検出したい FLAG 融合タンパク質のバンドが重なってしまうため泳動度の変化を見逃す場合や正確に判断できない場合がある。そのため、ユビキチン化の候補タンパク質が本当にユビキチン化修飾を受けているか、見逃していないか再度確認する必要がある。そこで、ユビキチン化タンパク質の候補および非特異的なバンドと重なってしまうために正確に判断できないタンパク質を、変性条件下で各 FLAG 融合タンパク質のみを精製し、結合タンパク質を除去した後、再度 GST-Ub 法を用いて（泳動度の変化を指標にして）ユビキチン化修飾をうけるヘテロクロマチン関連因子の同定を行った。その結果、ヘテロクロマチン関連タンパク質 59 種類のうち、25 種類のタンパク質のユビキチン化を同定した。これらのタンパク質の多くは、今までユビキチン化修飾を受けることが知られておらず、各タンパク質の新たな機能を明らかにする上で貴重なデータになると期待される。

## (2) Cu14 ユビキチンリガーゼ複合体の基質の同定

次に、Cu14 ユビキチンリガーゼ (Cu14-Rik1-Clr4) 複合体によってユビキチン化されるタンパク質の同定を行うため、Cu14 ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子を欠損させ、ユビキチン化修飾が消失するタンパク質を同定することにした。しかし、Cu14 をコードする遺伝子を破壊すると、細胞の生育が著しく低下する。そこで Cu14 ユビキチンリガーゼの構成因子をコードする *rik1* や *clr4* を破壊することにした。上記ユビキチン化タンパク質 25 種類を過剰発現もしくは生体内の量で発現する GST-ub 株および野生株から、Cu14 ユビキチンリガーゼの構成因子をコードする *rik1* や *clr4* を破壊した約 200 株を作製した。*rik1* もしくは *clr4* 破壊株から、変性条件下で各タンパク質を精製し、結合タンパク質を除去した後、再度

GST-Ub 法を用いて泳動パターンを野生株と比較することで、Cu14 ユビキチンリガーゼによってユビキチン化されるタンパク質を同定した。その結果、RNA ポリメラーゼ II の構成因子を基質の候補として見出すことに成功した。ヘテロクロマチン領域に限らず転写を担っている RNA ポリメラーゼ II だが、ヘテロクロマチン領域での活性の制御については不明なままである。今後、ヘテロクロマチン領域でのユビキチン化修飾による RNA ポリメラーゼ II の転写活性の制御が明らかになることで、ヘテロクロマチン形成解明のブレークスルーとなるかもしれない。

## (3) 高等真核生物におけるヘテロクロマチン形成へのノンコーディング RNA の機能解明

分裂酵母において、Cu14 ユビキチンリガーゼ複合体によって RNA ポリメラーゼ II の構成因子がユビキチン化修飾されていた。しかし、哺乳類ではヘテロクロマチン領域から転写される RNA の存在は報告されているが、RNA ポリメラーゼ II によるヘテロクロマチン領域の転写は報告されておらず、何によって転写されているか、その機能も明らかになっていない。そこで、Cu14 ユビキチンリガーゼ複合体および RNA ポリメラーゼ II が哺乳類のヘテロクロマチン形成に関与しているか検証していた過程で、Cu14 ユビキチンリガーゼ構成因子ヒストンメチル化酵素 Clr4 のマウスホモログ Suv39h1 が RNA 結合能を有することを見出した。さらに、分裂酵母 Clr4 は、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) がメチル化されているときに RNA と結合できるのに対して、マウス Suv39h1 はヒストン H3K9 のメチル化に関係なく、RNA と結合できるということを明らかにした。さらに、効率的なヘテロクロマチン形成にはヘテロクロマチン領域から転写された RNA による Suv39h1 のリクルートが重要であることを見出した。Suv39h1 によるヒストン H3K9 の特異的なメチル化修飾がヘテロクロマチン形成に重要であることは知られていたが、今までどのようにして、Suv39h1 がヘテロクロマチン領域にリクルートされてきて、ヘテロクロマチンが確立するか不明であった。今後、さらにこれにユビキチン化が関与しているかを明らかにしていく予定であるが、本研究期間に実施した研究によって、哺乳類でもヘテロクロマチン形成に ncRNA が関与していることを明らかにし、保存性の高い因子のユビキチン化修飾を見出したことは、保存性の高いヘテロクロマチン形成機構の解明のブレークスルーになると予想される。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 4 件)

- ① 白井 温子 : “ Elucidation of the mechanism underlying heterochromatin formation mediated by histone methyltransferase Suv39h1” , RIKEN EPIGENETICS in YOKOHAMA, 2 月 17 日 (2014) , 横浜理研 (神奈川県)
- ② 白井 温子 : “ Analysis of ubiquitin modification regulating heterochromatin structure” , 酵母からのエピジェネティクス研究へのメッセージ ~酵母が明らかにする生命科学の最先端~ (エピジェネティクス国際シンポジウム) , 9 月 3 日 (2013) , グランディア芳泉 (福井県)
- ③ 白井 温子 : “高次クロマチン構造を制御するユビキチン修飾系の解析” , 核ダイナミクス研究会, 10 月 27 日 (2011) , クラッセホテル北広島 (北海道)
- ④ 白井 温子 : “高次クロマチン構造を制御するユビキチン修飾系の解析” , 高次クロマチン構造研究会, 8 月 9 日 (2011) , 公立学校共済組合蒲郡保養所 蒲郡荘 (愛知県)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白井 温子 (SHIRAI ATSUKO)

独立行政法人理化学研究所・眞貝細胞記憶研究室・研究員

研究者番号 : 60525575

(2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

(3) 連携研究者

( )

研究者番号 :