

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26840009

研究課題名(和文) 低分子RNAを介した染色体の空間的制御機構の解明

研究課題名(英文) Study on spatial organization of chromosomes mediated by small RNA

研究代表者

川上 慶 (KAWAKAMI, Kei)

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員

研究者番号：00722836

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子の発現を抑制するヘテロクロマチン(HC)構造は、核膜直下や核小体の近傍にクラスタリングされるが、その機構と意義に関しては、理解が遅れている。本研究では、分裂酵母をモデル生物に用いて、HCクラスター形成機構を明らかにすることを目的とした。染色体の腕部に、低分子RNAに依存するHCを人工的に誘導可能な系を構築した。この人工的に誘導したHCの核内における挙動を3C法(Chromosome Conformation Capture)により詳細に解析したところ、この領域が、セントロメアやテロメアといった既存のHC領域とクロマチンレベルで空間的に相互作用する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Although It is known that heterochromatin (HC) structure that suppresses the gene expression is clustered at nuclear periphery or around the nucleolus, its mechanism and biological significance are not well understood. In this study, I aimed to clarify the mechanism of HC cluster formation using fission yeast as a model organism. A system capable of artificially inducing HC dependent on small RNAs was constructed in the arm of the chromosome. The behavior of this artificially induced HC in the nucleus was analyzed in detail by the 3C method (Chromosome Conformation Capture). As a result, we revealed this artificially induced HC region spatially interacts with the native HC region such as centromere and telomere at the chromatin level. This result clearly showed that the RNAi-dependent HC structure has the ability to form clusters in the nucleus.

研究分野：核内構造

キーワード：ヘテロクロマチン 核内構造 低分子RNA 分裂酵母 RNAi

1. 研究開始当初の背景

近年、核内における遺伝子座位の空間的移動と遺伝子制御との関連性が注目を集めている。この遺伝子の空間制御様式は、ゲノム DNA 中の離れた複数の遺伝子座を空間的に一カ所に集めることで同時に制御が可能な利点がある。近年の精力的な研究により、この空間制御が核内の様々なイベントにおいて採用されており、遺伝子制御において普遍的な方法として用いられていることが明らかになった。

例えば、遺伝子発現の活性化を受ける複数の遺伝子群は、核内転写ファクトリーにおいてその活性化が一括で制御される (Papantonis et al 2010, PLoS Biology)。また、遺伝子の複製に関しても、複製ファクトリーと呼ばれる核内空間が存在し、複製に関する因子群が高密度で集合して複製が起こる。このような制御は、複数遺伝子のクロマチン上での二次元的なエピジェネティック制御を、核内で効率的かつタイミング良く実行する事を可能にする。染色体の空間的制御様式は、遺伝子の活発な活動だけでなく、遺伝子の不活性化においても採用されている。遺伝子の転写発現が不活性化染色体領域であるヘテロクロマチン構造は、酵母から高等生物まで、核膜や核小体近傍にクラスターを形成し安定に維持される (図 1)。遺伝子機能を不活性に保つヘテロクロマチン構造は、細胞の発生、分化、初期化、老化、ストレス応答などあらゆる局面において重要な機能を持つ。その機能は不必要な遺伝子の発現を抑制するだけでなく、ゲノムに散在する反復配列間の組換えを抑制したり、正常な染色体分配の足場として働くなど、多岐に渡る。一方で、ヘテロクロマチン構造の無作為な形成は遺伝子発現プロファイルを大きく狂わせ、ガン化や細胞死などに直結する。これらのことから、ヘテロクロマチン構造が核内で適切な時期に適切なタイミングで形成、維持されることは、ゲノムを安定に保つために大変重要である。複数の遺伝子座位を同一のタイミングで制御できる空間制御様式は、ヘテロクロマチンの本質的な機能を保証する上で鍵となる高次制御だと考えられる。

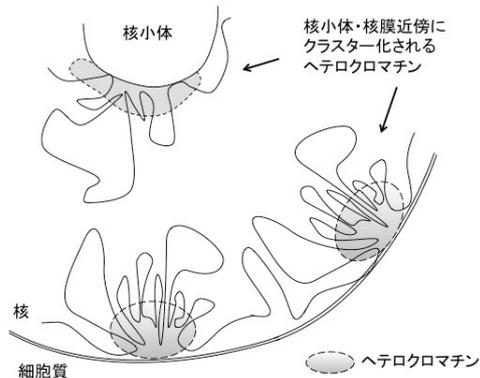


図 1: ヘテロクロマチンのクラスター制御

2. 研究の目的

ヘテロクロマチンを核内で数カ所にクラスタリングする機構に関しては未だ不明な点が多い。数少ない報告から、分裂酵母やハエにおいて、生体防御システムのひとつである RNAi 機構に関与する因子の変異体では、ヘテロクロマチンクラスターが崩壊し、核内に拡散することが分かっている (Hall et al 2003, PNAS) (Grimaud et al 2006, Cell)。この結果は、低分子 RNA (siRNA) が生産されるゲノム領域が、未知のメカニズムによって選択的にヘテロクロマチンクラスターに集約される可能性を示唆している (図 2)。そこで本研究では、そのような未だ不明瞭の「siRNA を介したヘテロクロマチンクラスター形成機構」を、分裂酵母を用いて解明することを目的とする。

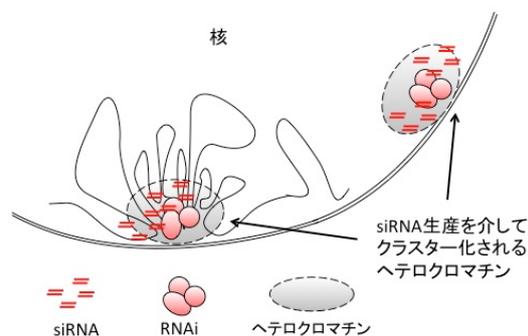


図 2: 低分子 RNA によるヘテロクロマチンのクラスター形成モデル

3. 研究の方法

分裂酵母において、既存のヘテロクロマチンは、セントロメアやテロメアといった大規模な染色体構造と隣り合わせで存在している。セントロメアやテロメアはそれ自身で核内におけるクラスタリング活性を有しており、隣接するヘテロクロマチンの挙動と区別し解析する事が困難である。そこで、本研究では、低分子 RNA に依存するヘテロクロマチン構造単独の核内における挙動をその規模と関連付けて詳細に解析するため、以下の方法で実験を行った。

(1) 二番染色体腕部におけるヘテロクロマチンの人為的誘導と ChIP 法によるヘテロクロマチンの規模や低分子 RNA への依存性の解析

(2) 3C (chromosome conformation capture) 法による、RNAi 依存的ヘテロクロマチンの核内挙動の解析

(3) 遺伝学的スクリーニングによるヘテロクロマチン構造の規模が変動する変異体の単離

4. 研究成果

(1) 二番染色体腕部におけるヘテロクロマチンの人為的誘導と ChIP 法によるヘテロクロマチンの規模や低分子 RNA への依存性の解析

セントロメアヘテロクロマチン領域に由来する転写ユニットを第二染色体腕部のユークロマチン領域に挿入することで、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化を伴うヘテロクロマチン構造を誘導した。H3K9me2 抗体を用いた ChIP アッセイ法により、このヘテロクロマチンの規模を解析した。その結果、挿入したセントロメア由来の配列の上流と下流に合わせて 27 kb ほどのサイズのヘテロクロマチンが形成されていることを確認した。この誘導したヘテロクロマチンの規模は既存のヘテロクロマチン構造と比べても遜色ないレベルであり、解析に十分な意義があると考えられた。

次にこの誘導したヘテロクロマチン構造が siRNA の合成経路に依存するかを解析した。分裂酵母における低分子 RNA の生合成酵素である Dcr1, Rdp1, Ago1 の変異体では、誘導した H3K9me2 は維持できず消失した。この結果から、今回人工的に形成したヘテロクロマチンが siRNA 合成系に依存することを確認できた。

これらの結果から、この人為的 RNAi 依存性ヘテロクロマチン座位の核内における挙動を詳しく解析することにした。

(2) 3C (chromosome conformation capture) 法による、RNAi 依存的ヘテロクロマチンの核内挙動の解析

3C 法は、核における染色体同士の相互作用をクロマチンレベルで解析可能な手法である。この解析法を用いて、二番染色体腕部にヘテロクロマチンを誘導する前と後で、その染色体座位がどのような染色体領域と空間的に相互作用するかを解析した。その結果、二番染色体腕部にヘテロクロマチンを誘導する前には他の染色体座位との明確な相互作用は認められなかった(図 3(A))が、ヘテロクロマチンを誘導した後、サブテロメア近傍のヘテロクロマチン領域(図 3(B))及び、セントロメア周辺のヘテロクロマチン領域との明確な相互作用を示す結果が得られた(図 3(C))。この結果から、RNAi 依存的ヘテロクロマチン構造は、それ単独で他のヘテロクロマチン領域と空間的に相互作用をすることが、クロマチンレベルで示された。

RNAi 依存的ヘテロクロマチン誘導前

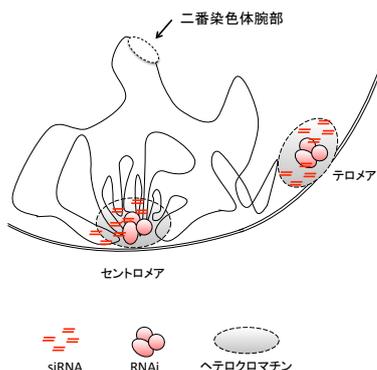


図 3(A) : RNAi 依存的ヘテロクロマチン誘導

前の二番染色体腕部の核内挙動

RNAi 依存的ヘテロクロマチン誘導後

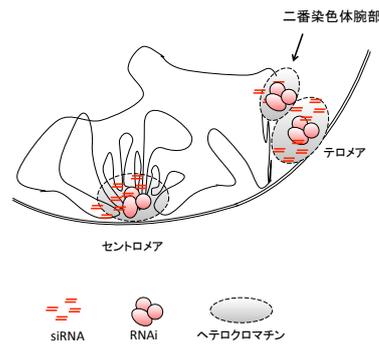


図 3(B) : RNAi 依存的ヘテロクロマチン誘導後の二番染色体腕部の核内挙動

RNAi 依存的ヘテロクロマチン誘導後

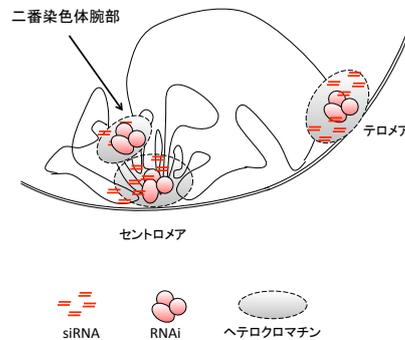


図 3(C) : RNAi 依存的ヘテロクロマチン誘導後の二番染色体腕部の核内挙動

最近の報告では、他生物種においてコヒーシ複合体が染色体間の相互作用やループ形成に関与することが知られており (Kagey et al 2010. Nature)、分裂酵母ではヘテロクロマチンに局在する事が知られている (Tomonaga et al 2000. Genes Dev)。研究代表者はコヒーシサブユニット Rad21 と、そのローディング因子である Mis4 のサブテロメアヘテロクロマチン局在が、*dcr1* 変異株で顕著に低下することを見出した (川上未発表データ)。これらの事から、RNAi がコヒーシをクロマチン上にリクルートする事で、ヘテロクロマチンクラスター形成を引き起こす可能性が考えられた。事実、サブテロメアヘテロクロマチンはコヒーシ依存的に安定化される事が分かっている (Dheur et al 2011. Mol Cell Biol)。今後、RNAi 依存的ヘテロクロマチン構造によってリクルートされるクラスタリングに必要な因子を同定することが重要だと考えられる。

(3) 遺伝学的スクリーニングによるヘテロクロマチン構造のサイズが変動する変異体の単離

前述の通り、ヘテロクロマチンのクラスタ

リングを担う因子はヘテロクロマチンをターゲットとして局在しうる可能性が高いと考えられた。そのため、ヘテロクロマチンのサイズを変動させることで、その核内挙動に影響が生じる可能性が考えられた。この可能性を検証するため、ヘテロクロマチンの拡張が阻害される分裂酵母変異体を遺伝学的にスクリーニングした。

スクリーニングには、セントロメアのヘテロクロマチンにマーカー遺伝子が挿入された株を使用した。セントロメアに挿入されたマーカー遺伝子のサイレンシングは、隣接するセントロメア周辺配列からのヘテロクロマチンの拡張に依存して起こる。この原理を利用し、セントロメア周辺部にヘテロクロマチンは確立されるが、それがマーカー遺伝子の上に拡張できない変異体をスクリーニングした。その結果、ヒストン H3K9me 酵素複合体のサブユニットである Raf1 タンパク質の点変異体 (*raf1-224*) の同定に成功した。

この変異体の表現型を詳細に解析したところ、性決定座位 (*mat* locus) やサブテロメアなどのヘテロクロマチンのサイズが大幅に縮小している結果を得た。興味深いことに、性決定座位の中にある *cenH* 配列や、サブテロメアにある *t1h* などの RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成に重要な配列上のヘテロクロマチンは、*raf1-224* 変異体においてもある程度維持されていることがわかった。

次に、*raf1-224* 変異体において、研究成果 (1) で述べた人為的ヘテロクロマチンを誘導させようとしたところ、野生株で 27 kb ほどのサイズだったヘテロクロマチンが、15 kb ほどに縮小される結果を得た。

今後は *raf1-224* 変異体を用いて研究成果 (2) で述べた 3C 解析を行い、ヘテロクロマチンの規模とクラスターリング形成能との関係性を解析できると期待される。

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 1 件)

(1) Inner nuclear membrane protein Lem2 augments heterochromatin formation in response to nutritional conditions
Yoshie Tange, Yuji Chikashige, Shinya Takahata, Kei Kawakami, Masato Higashi, Chie Mori, Tomoko Kojidani, Yasuhiro Hirano, Haruhiko Asakawa, Yota Murakami, Tokuko Haraguchi and Yasushi Hiraoka
Genes to Cells, Volume 21, Issue 8, Pages 812-832, **2016** doi: 10.1111/gtc.12385. 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

(1) Kei Kawakami, Yoshino Kubota and Kojiro Ishii
Histone methyltransferase complex CLRC

ubiquitinates and degrades the putative histone demethylase Epel to facilitate heterochromatin assembly.

9th international fission yeast meeting
May 14-19, **2017**

(2) Kei Kawakami and Kojiro Ishii
Histone methyltransferase complex CLRC regulates heterochromatin spreading.
Chromosome Operation System International Symposium
Hyogo, Japan March 01-03, **2016**

(3) Kei Kawakami and Kojiro Ishii
Histone methyltransferase complex CLRC regulates heterochromatin spreading independently of RNAi.
40th Naito Conference
Hokkaido, Japan, September 15-18, **2015**

(4) Kei Kawakami and Kojiro Ishii
Histone methyltransferase complex CLRC regulates heterochromatin spreading independently of RNAi machinery.
8th Fission Yeast Meeting
Hyogo, Japan June 21-25, **2015**

[図書] (計 1 件)

川上慶, 道家康平, 石井浩二郎

化学同人

ノンコーディング RNA - RNA 分子の全体像を俯瞰する - 廣瀬哲郎・泊幸秀 編

2016 年

372 頁中第 8 章:クロマチン関連 small RNA (83 頁 - 95 頁) を分筆

[その他]

ホームページ等

<https://research-er.jp/researchers/view/532659>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川上 慶 (KAWAKAMI, Kei)

大阪大学・生命機能研究科・特任研究員

研究者番号: 00722836