

令和 3 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06071

研究課題名(和文) 哺乳類異所的高次クロマチン形成系の構築と解析

研究課題名(英文) Ectopic assembly of mammalian heterochromatin triggered by tandem repetitive DNA

研究代表者

白井 温子 (Shirai, Atsuko)

国立研究開発法人理化学研究所・開拓研究本部・研究員

研究者番号：60525575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトHEK293細胞のAAVS locus特異的に反復配列を挿入し、ヘテロクロマチン形成をモニターできる系の構築を行った。この方法は、GFPを反復配列の5'側に挿入しているため、もし反復配列が抑制されればGFPの発現が抑制される。今回ペリセントロメア領域の反復配列をAAVS領域特異的に挿入した時、GFPの蛍光が消失した。さらにGFP領域では、ヒストンH3K9me3の顕著な蓄積が検出され、またDNAメチル化が生じていた。以上の結果より、異所的に挿入した反復配列上でヘテロクロマチンが形成され、それをモニターできることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類のゲノムの半分以上を占めるヘテロクロマチン領域がなぜ存在しているか、どのように形成されているのかいまだに明らかになっていない。本研究によって、哺乳細胞では今まで構築できていなかった、異所的に新規のヘテロクロマチンを形成・検出できるモニターシステムを構築できた。本モニターシステムを使用することによって、進化的に保存されたヘテロクロマチン形成機構が明らかになると予想されることから、疾患研究や創薬研究への発展も期待できる研究成果である。

研究成果の概要(英文)：We constructed a system that can monitor heterochromatin formation by inserting repetitive DNA specifically in AAVS locus. In this method, GFP is inserted on the 5' side of the repetitive sequence, so if the repetitive sequence is suppressed, the expression of GFP is suppressed. When repetitive DNA were inserted specifically in the AAVS region, the fluorescence of GFP disappeared. Furthermore, in the GFP region, a remarkable accumulation of histone H3K9me3 was detected, and DNA methylation occurred. From the above results, it was clarified that heterochromatin was formed on the ectopically inserted repetitive sequences and could be monitored.

研究分野：細胞生物学

キーワード：ヘテロクロマチン

1. 研究開始当初の背景

近年、多くの生物のゲノム情報が解読された。しかし、生命現象の多くは DNA 塩基配列の変化だけでは説明がつかない。そのため、エピジェネティックな遺伝子制御が幅広い分野で注目されている。エピジェネティクスとは、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機構で、エピジェネティック異常ががんをはじめ神経疾患や循環器疾患など様々なヒト疾患の原因となることが知られている。また、近年では iPS 細胞に元の細胞のエピゲノム情報が残っていることから、再生医療においてもエピジェネティクスを理解することが急務になっている。

このエピジェネティックな遺伝子発現制御、特に転写抑制に重要な役割を果たしているのが高度に凝縮したクロマチン構造であるヘテロクロマチンである。発生・分化に関係なく凝縮した構造である構成的なヘテロクロマチンでは、ヒト SUV39H1 によるヒストン H3 の 9 番目のリジン残基 (H3K9) の特異的なメチル化 (トリメチル化) 修飾がヘテロクロマチン領域に特徴的に存在し、ヘテロクロマチン構造蛋白質である HP1 が、クロモドメイン (CD) を介してこの修飾を認識して結合することが解明され、ヒストンの修飾が高次のクロマチン構造変化に関わるという、多くの真核生物に保存された分子機構が明らかになった [Nakayama et al. Science, 2001]。この Suv39h をコードする遺伝子 (*Suv39h1*, *Suv39h2*) を欠損したマウスは染色体異常を起こすため、多くが致死になり、生き残ったマウスも癌になりやすい [Peters et al. Cell, 2001]。

分裂酵母では、siRNA (small interfering RNA) と呼ばれる二本鎖 RNA によって相補的な RNA を分解する 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明らかにされている [Volpe et al. Science, 2002] (図 1)。一方で哺乳類では、構成的なヘテロクロマチンであるペリセントロメアから ncRNA (siRNA ではなく複数の繰り返し配列から生成される ncRNA) が転写されることは知られていたが [Maison et al. Nat. genet. 2012]、ヘテロクロマチン形成に RNA が関与しているかはほとんど分かっていなかった。

申請者らは 2017 年に、*Suv39h1* は CD の RNA 結合能依存的に major satellite RNA と結合していること、RNA に結合できない変異 *Suv39h1* を *Suv39h* 欠損細胞に発現させるとヘテロクロマチン形成に異常がみられ、ヘテロクロマチン領域への *Suv39h1* 自身の蓄積が低下することを明らかにした [Shirai et al. eLife, 2017]。しかし、ペリセントロメアは繰り返し配列からなる Mb レベルの領域であることや CD の RNA 結合能を欠いた *Suv39h1* 変異体でもヘテロクロマチンは形成されることから、「ペリセントロメアからの ncRNA がヘテロクロマチン形成に如何に重要なのか？」に対する答え、その役割の詳細は未だ謎である。

2. 研究の目的

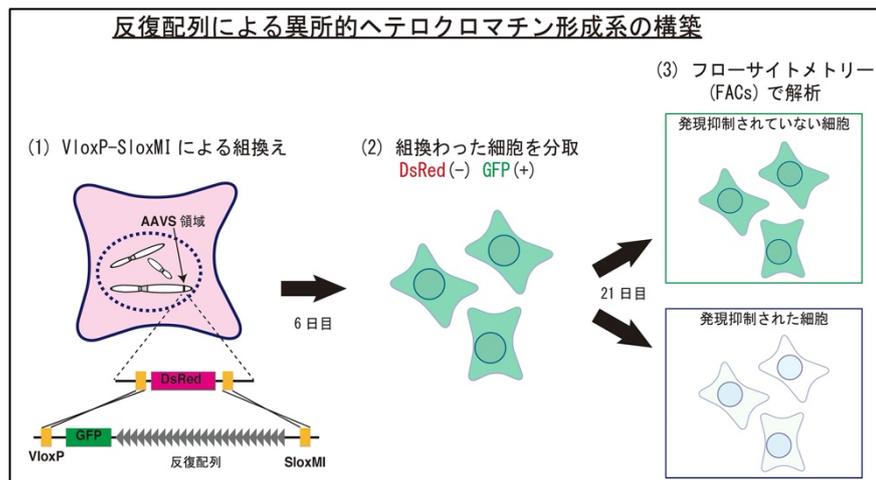
分裂酵母では、ヘテロクロマチンであるセントロメア領域の内部にウラシル遺伝子を挿入し、その DNA 断片を転写の活性な領域であるアデニン遺伝子座に異所的に導入することで、新規のヘテロクロマチン形成を誘導・検出する系が構築されている。一方、動物細胞では人工染色体でのセントロメア構造の解析は進んでいるものの、特定の染色体領域にペリセントロメア領域の DNA を挿入して新規のヘテロクロマチンが形成されるか、その形成を観察するシステムは構築されておらず、その詳細は分かっていない。しかし、新規のヘテロクロマチン形成やヘテロクロマチン領域からの ncRNA の役割を解析する上で、酵母と同様のシステムの構築は必要不可欠である。そこで本研究では、構成的なヘテロクロマチン領域である major satellite 配列を異所的に挿入することでヘテロクロマチンが形成されるかどうかをまず検討し、系が構築できたらその系を活用して転写産物 (ncRNA) のヘテロクロマチン形成における役割を解明する。

3. 研究の方法

分裂酵母では、ヘテロクロマチンであるセントロメア領域の内部にウラシル遺伝子を挿入し、その DNA 断片を転写の活性な領域であるアデニン遺伝子座に異所的に導入することで、新規のヘテロクロマチン形成を誘導・検出する系が構築されている。一方、動物細胞では人工染色体でのセントロメア構造の解析は進んでいるものの、新規のヘテロクロマチン形成を観察するシステムは構築されていない。そこで、代表的なヘテロクロマチンであるペリセントロメア領域を構成するマウスの major satellite 配列とヒトの alphoid DNA 配列を異所的に挿入し、新たにヘテロクロマチンが形成されるかどうかを検討することにした。major satellite DNA は 234 bp の繰り返しからなる配列のため、長鎖でクローニングすることは難しい。そのため、かずさ研本グループの協力 (大関研究員との連携) のもとで、major satellite DNA のクローニングを行い、長鎖の major satellite DNA を作製し、また長鎖の alphoid DNA を大関研究員から供与され、細胞内に導入することにした。マウス ES 細胞の Rosa26 locus (挿入遺伝子が抑制されにくいセーフハーバー領域) に挿入するための細胞株を作製すると共に、かずさ DNA 研究所の中山研究員らが開発した高頻度で部位特異的組換え反応を起こせる酵素システム (VloxP-SloxM1 システム)

を用いて、ヒト HEK293 細胞の AAVS 領域特異的に alphoid DNA や major satellite DNA を挿入し、ヘテロクロマチン形成をモニターできる系の構築を行った (図)。この方法は、GFP レポーターが反復配列の直近に位置するため、もし反復配列がヘテロクロマチン化を誘導すると GFP

の発現が抑制される。このモニターシステムを構築したのち、H3K9me3 修飾および DNA メチル化レベルを解析することで、ヘテロクロマチン形成を解析した。



4. 研究成果

major satellite DNA のクローニングを行い、かずさ研本グループの協力 (大関研究員との連携) のもとで、10 kbp の長鎖の major satellite を作製した。さらに、ヘテロクロマチン形成を簡単にモニタリング出来るように、上流に GFP を挿入したベクターを作製した。そして、研究分担者の中山ら (かずさ DNA 研) が開発した高頻度で部位特異的組換え反応を起こせる酵素システム (VloxP-SloxP システム) を用いて、上流に GFP を付加した alphoid DNA 7.5 kbp や major satellite 配列 10 kbp を HEK293 細胞の AAVS 領域に挿入した株の構築に成功した。そして、alphoid DNA を AAVS locus 特異的に挿入した時、GFP の蛍光が消失し、alphoid DNA がヘテロクロマチン化を誘導している可能性が示唆された。そのため、ChIP 解析を行い、ヒストン H3K9 のトリメチル化 (H3K9me3) レベルを解析した結果、GFP 領域では、ヒストン H3K9me3 の顕著な蓄積が検出された。また、バイサルファイト解析を行った結果、GFP 領域では DNA メチル化が生じていた。この DNA メチル化は alphoid DNA 領域から遠ざかるほど低下することがわかった。以上の結果より、異所的に挿入したペリセントロメア領域で新規のヘテロクロマチンが形成されたことが明らかになった。さらに、このヘテロクロマチン化は GFP に対しての向きに関係なく抑制が起こった。

一方で、マウス由来の major satellite DNA を AAVS locus 特異的に挿入した時では片方の方向でのみ GFP の蛍光の消失が起こることを見出した。そこで、実際にそれぞれの方向の DNA を挿入した細胞でのヘテロクロマチン形成を調べるために ChIP 解析とバイサルファイト解析を行った結果、GFP の蛍光の消失が起こっている細胞株の GFP 領域では、ヒストン H3K9me3 の顕著な蓄積が検出された。さらに、GFP 領域では DNA メチル化が生じており、この DNA メチル化も major satellite DNA 領域から遠ざかるほど低下することがわかった。さらに major satellite DNA からの転写量を解析したところ、major satellite DNA からの鎖特異的な転写量に違いがあることが明らかになった。

今後は、ヘテロクロマチン形成過程の詳細な変化を検出できるように更に改変を行っていく。

本研究によって、今まで動物細胞では構築されていなかった新規のヘテロクロマチン形成を観察するシステムが初めて構築できた。現在行っている改変モニターシステムが構築できた暁には、Suv39h1 をリクルートする因子や新規ヘテロクロマチン因子のスクリーニングにも応用できる画期的なシステムとなる。また、この改変モニターシステムを利用することによって、ncRNA がヘテロクロマチン形成にはたす役割を解明できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Oya Eriko, Nakagawa Reiko, Yoshimura Yuriko, Tanaka Mayo, Nishibuchi Gohei, Machida Shinichi, Shirai Atsuko, Ekwall Karl, Kurumizaka Hitoshi, Tagami Hideaki, Nakayama Jun ichi	4. 巻 20
2. 論文標題 H3K14 ubiquitylation promotes H3K9 methylation for heterochromatin assembly	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e48111
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.15252/embr.201948111	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 白井 温子
2. 発表標題 反復配列に引き起こされる哺乳類異所的高次クロマチン形成
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井温子、大関淳一郎、舛本寛、中山学、眞貝洋一
2. 発表標題 哺乳類異所的高次クロマチン形成系の構築と解析
3. 学会等名 第 36 回 染色体ワークショップ
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白井温子、大関淳一郎、舛本寛、中山学、眞貝洋一
2. 発表標題 Ectopic assembly of mammalian heterochromatin triggered by tandem repetitive DNA
3. 学会等名 RIKEN Epigenetics in Wako
4. 発表年 2019年

〔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
研究 分担者	中山 学 (Nakayama Manabu) (30370927)	公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・主任研究員 (82508)	

	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
連携 研究者	大関 淳一郎 (Ohzeki Jun-ichirou) (30514088)	公益財団法人かずさDNA研究所・先端研究開発部・研究員 (82508)	

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