

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2023

課題番号：19K23731

研究課題名（和文）減数分裂におけるエピジェネティック制御機構の解明

研究課題名（英文）Analysis of epigenetic regulation during meiosis

研究代表者

大屋 恵梨子 (Oya, Eriko)

東京大学・定量生命科学研究所・助教

研究者番号：60847721

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）：本研究では、遺伝子発現を抑制する染色体構造である高次クロマチンに着目し、分裂酵母および出芽酵母を用いて、減数分裂および有糸分裂期における高次クロマチン構造形成機構を明らかにすることを目的とした。そして、減数分裂期における経時的クロマチン構造変換のプロファイリングの為の実験条件を検討し、また、高次クロマチンの「再構築」系の構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真核生物の核内に存在する高次クロマチン構造は、染色体の機能維持のみならず、クロマチンの後天的な化学修飾による「エピジェネティック」な発現制御に重要な役割を果たしている。この発現制御に異常が生じると、個体の発生異常や、がん・生活習慣病などの疾患を引き起こす。高次クロマチン構造について解析した本研究は、高次クロマチン形成の分子機構だけでなく、高次クロマチンの異常により引き起こされる疾患の原因解明への基盤となる重要な成果である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused on heterochromatin, a chromosomal structure that suppresses gene expression to elucidate the mechanism of heterochromatin structure formation during meiosis and mitosis using fission yeast and budding yeast. We also investigated experimental conditions for profiling chromatin structure changes over time during meiosis and constructed a system for "reconstruction" of higher-order chromatin.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヘテロクロマチン 転写制御 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

基本的に同じ DNA 情報を持つ約 270 種類のヒトの細胞では、各細胞での固有の性質を持つ様、クロマチンの後天的な化学修飾による「エピジェネティック」な発現制御により、DNA 配列の変化を伴わずに遺伝子の発現を調節している。この発現調節に異常が生じると、個体の発生異常や、がん・生活習慣病などの疾患を引き起こす。

減数分裂は、精子や卵子などの配偶子を形成し、遺伝情報を次世代に継承する為の普遍的で重要なプロセスである。その過程では、【減数分裂過程の開始】 【減数分裂前 DNA 複製】 【遺伝子組み換え】 【第一減数分裂】 【第二減数分裂】という一連のイベントが協調的に進行し、通常の体細胞分裂と比べると極めて複雑である。この過程に異常が生じると、染色体異常が生じ、不妊や個体の致死、ダウン症などの染色体異常疾患を引き起こす。減数分裂過程で生じる異常の原因には、DNA 配列依存的な異常と それに依存しないエピジェネティックな異常に大別される。これまでの減数分裂に関する研究は遺伝学的見地から 注目したものが多く、減数分裂期の DNA 複製や組換えに必須なタンパク質をコードする遺伝子群の異常が減数分裂の進行に与える影響が明らかにされてきた¹⁾。一方、 エピジェネティックな遺伝子発現の主な異常は、染色体の基本構成単位であるクロマチンの構造変換の異常に起因する。しかし、 に関する研究は極めて少なく、近年、高次クロマチン構造が減数分裂期における DNA 組換えの抑制に寄与し²⁾、また減数分裂期特異的なクロマチン修飾が明らかになる等³⁾、減数分裂における遺伝子発現制御機構の重要性と特殊性がようやく認識され始めたが、減数分裂における遺伝子発現制御機構の全体像は未解明である。ゆえに、減数分裂過程に異常が生じるメカニズムのさらなる理解の為に、エピジェネティックな見地から減数分裂の各ステップにおいていつ・どの様にクロマチン構造変換が起こり、どのような因子がその構造変換に関わるのか、その詳細を明らかにする事が必要不可欠である。

また、エピジェネティックな染色体構造変換に関与するクロマチン構造である高次クロマチンは、その構造がどのように形成されているか不明な点が多く残されている。高次クロマチンに関する研究は、分裂酵母をはじめ、多くの生物で行われてきたが、高次クロマチン形成に関与する因子を欠損すると、そのクロマチン構造が崩壊してしまうことから、高次クロマチン構造を持つ生物内での解析は困難を極めている。また、生体内での生命現象を試験管内で再現する *in vitro* の再構築を実現する為には、多くの因子の関与が明らかになっている高次クロマチン形成に必要な不可欠な因子を明らかにする必要があり、生体外で触媒活性を失うタンパク質も少なくない為、困難を要することが予想される。そこで、高次クロマチンの形成メカニズムを明らかにする為には、新たな解析方法の構築が必要不可欠である。

2. 研究の目的

本研究では、遺伝子発現を抑制する染色体構造である高次クロマチンに着目し、分裂酵母および出芽酵母を用いて、減数分裂および有糸分裂期における高次クロマチン構造形成機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 減数分裂期における経時的クロマチン構造変換のプロファイリング

まず、減数分裂期の一連の過程におけるクロマチンの構造変換のプロファイルを明らかにする為、ヒトなどの高等真核生物と類似した染色体構造をもつ単純なモデル真核生物である分裂酵母を用いて、クロマチン免疫沈降シーケンシング(ChIP-seq)法を用い、クロマチンの構造変換を制御する代表的マークであるヒストン H3K9 メチル化修飾の経時的なゲノムマッピングを行う為の条件検討を進めた。この経時的なマッピングの為の実験条件として、細胞集団を同調的に減数分裂させる必要がある為、減数分裂の抑制に関わる遺伝子の温度感受性変異体を用いた同調を試みた。

(2) 高次クロマチンの「再構築」系の確立

本研究では、減数分裂期におけるエピジェネティックな染色体構造変換に関与する高次クロマチン制御メカニズムの解明を目指しているが、高次クロマチン形成がどのように起こるのか不明な点が多く残されている。そこで、分裂酵母におけるエピジェネティックな染色体構造変換に関与する高次クロマチン形成・維持のメカニズムを詳細に検証するため、高次クロマチン形成関連因子やメカニズムが異なる出芽酵母内での高次クロマチンの「再構築」を試みた。

分裂酵母の高次クロマチン形成は、いくつかの経路によって形成・維持されていることが知られている。その中でも、RNAi(RNA interference, RNA 干渉)依存的にヒストン H3K9 メチル化修飾を基に高次クロマチンが形成されることが知られている。分裂酵母とは異なり、出芽酵母には RNAi 関連因子と、ヒストン H3K9 メチル化修飾及びその修飾を認識して結合するヘテロクロマチンタンパク質などのヘテロクロマチンに関連する因子のホモログが存在しないことが知られており、分裂酵母の RNAi 依存的ヘテロクロマチンを「再構築」するのに適していると考えられて

る。よって、いくつかの高次クロマチン形成に関する分裂酵母の遺伝子を出芽酵母内で発現させ、高次クロマチンを再構築できるか検証した。

4. 研究成果

(1) 減数分裂期における経時的クロマチン構造変換のプロファイリング

減数分裂期の一連の過程におけるクロマチンの構造変換のプロファイルを明らかにする上で、細胞集団を同調的に減数分裂させる必要がある為、減数分裂の抑制に関わる遺伝子の温度感受性変異体を用いた同調を試みた。この変異体では、高温に移すと抑制が外れて減数分裂を開始する事が出来るが、検証の結果、この温度変化によってクロマチン構造自体が影響を受ける可能性が示唆された。よって、温度変化を伴わない細胞同調法(減数分裂誘導関連因子の ATP アナログ感受性を用い、ATP アナログ阻害剤で該当因子を阻害する等)で減数分裂に誘導し、クロマチン構造変換の調査を試みる必要性があると考えられる。

(2) 高次クロマチンの「再構築」系の確立

エピジェネティックな染色体構造変換に関与する高次クロマチン形成・維持のメカニズムを詳細に検証するため、高次クロマチン形成関連因子やメカニズムが異なる出芽酵母内での分裂酵母の高次クロマチンの「再構築」を試みた。

分裂酵母における RNAi 依存的ヘテロクロマチンの構築の重要なステップは、1) RNAi 経路の siRNA (small interfering RNA) の生合成と、2) ヒストン H3K9 のメチル化修飾及びその修飾依存的に結合するヘテロクロマチンタンパク質の結合である。よって、出芽酵母内で分裂酵母の RNAi 依存的ヘテロクロマチン関連遺伝子を発現させた際に、それらの2つのイベントが出芽酵母内で起こっているか確認した。

1) siRNA の合成については、RNase 活性を持ち、siRNA 合成の重要な因子である Dicer を発現すると、出芽酵母内で siRNA を検出し、siRNA 合成が出芽酵母内で可能であることを明らかにした。また、2) ヒストン H3K9 のメチル化修飾及びその修飾依存的に結合するヘテロクロマチンタンパク質の結合についても、ヒストン H3K9 特異的なメチル化酵素を発現させると、ヒストン H3K9 メチル化修飾を検出し、出芽酵母のヒストンがヒストン H3K9 メチル化酵素のターゲットになり得ることを明らかにした。

上記の2つのイベントが起こっていることを確認した為、次に RNAi 依存的ヘテロクロマチン構造により、遺伝子がサイレンシングされるか確認した。遺伝子抑制(サイレンシング)をモニターする遺伝子挿入し、モニタリングシステムを構築した。siRNA が合成され、ヒストン H3K9 のメチル化修飾を確認した細胞内で、モニター遺伝子の発現が抑制されるか検証した所、現在、出芽酵母内に導入した Dicer を含む複数の RNAi 依存的ヘテロクロマチン関連因子では、モニター遺伝子の発現が抑制されなかった為、ヘテロクロマチン依存的な遺伝子の抑制にはさらなる遺伝子が必要不可欠であることが示唆された。

< 引用文献 >

- 1) Ohkura H. Cold Spring Harb Perspect Biol. 20;7(5) (2015)
- 2) Ellerbeier C *et al.*, P.N.A.S. 107(19):8701-5 (2010)
- 3) Papazyan R *et al.*, Elife 3:e02996(2014)

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Dong Wenbo, Oya Eriko, Zahedi Yasaman, Prasad Punit, Svensson J. Peter, Lennartsson Andreas, Ekwall Karl, Durand-Dubief Mickael	4. 巻 10
2. 論文標題 Abo1 is required for the H3K9me2 to H3K9me3 transition in heterochromatin	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6055
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-63209-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔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 Eriko Oya, Mickael Durand-Dubief, Adiel Cohen, Vladimir Maksimov, Catherine Schurra, Jun-ichi Nakayama, Ronit Weisman, Benoit Arcangioli, Karl Ekwall
2. 発表標題 細胞静止期における高次クロマチンのダイナミックな構造変換機構
3. 学会等名 第93回日本生化学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Eriko Oya, Tetsushi Iida, Masafumi Nishizawa, Sayaka Ohta, Jun-ichi Nakayama and Takehiko Kobayashi
2. 発表標題 Reconstitution of RNAi-dependent heterochromatin “in saccharo” experimental system
3. 学会等名 2022年度「ゲノム合成」CRESTさきがけ領域会議
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Eriko Oya, Tetsushi Iida, Masafumi Nishizawa, Sayaka Ohta, Jun-ichi Nakayama and Takehiko Kobayashi
2. 発表標題 Reconstitution of RNAi-dependent heterochromatin “in saccharo” experimental system
3. 学会等名 2023年度「ゲノム合成」CRESTさきがけ領域会議
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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