

機関番号：15201

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21870024

研究課題名（和文） 分裂酵母ヘテロクロマチンの安定性ならびに制御因子の解析

研究課題名（英文） Studies on stability of fission yeast heterochromatin and its regulators

研究代表者

加藤 太陽 (KATO HIROAKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：40548418

研究成果の概要（和文）：ヘテロクロマチンの安定性を保証する仕組みを理解するため、まず始めに、36°CでヒストンH3のLys9のメチル化を失わせる変異を作製した。この変異の解析は、ヘテロクロマチンを壊すためには細胞周期の進行が必要であることを示した。次に遺伝学的スクリーニングを行い、ヘテロクロマチン安定性に貢献する因子として転写制御因子を同定した。これらの結果は、DNA複製と転写がヘテロクロマチン不安定化のリスク要因であることを示唆する。

研究成果の概要（英文）：In order to understand how the stability of heterochromatin is ensured, we first produced a mutant which abolishes Lys9 methylation of histone H3 at 36°C. Analysis of this mutant indicated that the abolishment of heterochromatin requires cell cycle progression. Next, we performed a genetic screen and identified transcriptional regulators as factors that are responsible for the stability of heterochromatin. These results suggest that DNA replication and transcription are risk factors for heterochromatin instability.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,110,000	333,000	1,443,000
2010年度	1,010,000	303,000	1,313,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,120,000	636,000	2,756,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：細胞生物学

キーワード：ゲノム、遺伝学、エピジェネティクス、ヘテロクロマチン、分裂酵母

1. 研究開始当初の背景

分裂酵母をモデルとしたこれまでの研究により、ヘテロクロマチンの構築メカニズムはかなり明らかになってきた。しかし、一度構築したヘテロクロマチンを長期にわたって安定に保つ仕組みについては、未だ不明な点が多い。たとえば、DNA複製時におけるヘテロクロマチンの娘染色体への継承にはRNA

干渉 (RNAi) 経路が関与するが、DNA非複製時にヘテロクロマチンの安定性を保証する仕組みは未だ明らかになっていなかった。

特定遺伝子座を転写活性化要因から隔離するヘテロクロマチンは、その異常が細胞機能に重大な影響を及ぼすため、安定に保持されなければならない。しかし細胞内には、DNA複製の結果として起こるエピジェネティック標識密度の低下だけでなく、転写やDNA修

復に付随して起こるヒストンの交換反応等が、ヘテロクロマチンの安定性を脅かす潜在的风险として存在する。よって、細胞はこれらのリスク要因に対し、ヘテロクロマチンの安定性を保証する仕組みを備えていると予想される。

ヘテロクロマチンの構築機構は、分裂酵母をモデル生物として活発に研究されてきた。重要な発見を振り返ると、まずヒストン H3 の K9 メチル化 (H3K9Me) 修飾を担うヒストンメチル基転移酵素として Clr4 が同定された。次に RNAi 経路の重要性が見いだされ、当該経路への RNA ポリメラーゼ II (RNAPII) の関与が発見された。更には細胞周期の S 期特異的な non-coding RNA (ncRNA) の転写の重要性が報告された。現在受け入れられているモデルでは、まず RNAPII によって S 期特異的に ncRNA が転写され、RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ複合体 (RDRC) とリボヌクレアーゼ Dicer の作用によって ncRNA に相同な siRNA が生産される。更にその siRNA を内包する RITS 複合体が ncRNA 転写領域に局在して Clr4 複合体 (CLRC) をリクルートし、その結果として H3K9Me 修飾が更新されると考えられている。S 期特異的な ncRNA の転写は哺乳動物の細胞でも観察されており、この DNA 複製と共役したエピジェネティック標識の更新システムは種を越えて保存されている可能性が高い。

DNA 複製はヘテロクロマチンの継承を脅かす要因の1つであるが、その危機は上記のシステムによって回避される。では一度確立されたヘテロクロマチンは、S 期以外の時期において積極的な更新を必要としないのだろうか。たとえば、脱メチル化やヒストン交換といった潜在的な脅威に対抗して、ヘテロクロマチン拡張作用を介して積極的に更新し続ける必要はないのだろうか。この疑問を明らかにするためには、H3K9Me を担うメチル基転移酵素を時期特異的に失活させ、その後のヘテロクロマチンの安定性を調査する必要がある。これまでの分裂酵母を用いた研究は遺伝子破壊等の実験操作に少なくとも数十回の細胞分裂を必要としていたため、メチル基転移酵素失活後の短い期間におけるヘテロクロマチン安定性の調査が不可能であった。そのため、脱メチル化やヒストン交換反応といった潜在的风险要因がヘテロクロマチンの継承にどれほどの影響を与えるのか不明のままであった。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 非複製時のクロマチン動態を調査できる実験系を新規に構築し、ヘテロクロマチンの安定性ならびに制御因子を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヘテロクロマチンの安定性を脅かす DNA 複製以外の要因を明らかにするため、まず初めに Clr4 の温度感受性変異体を新規に作成し、H3K9Me 修飾活性を時期特異的に温度変化のみで消失させることのできる実験系の構築を試みた (図 1)。

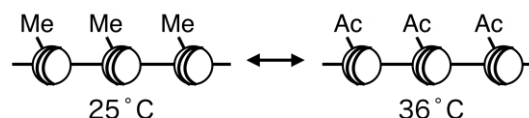


図 1 温度変化によるクロマチンの変換

Clr4 の温度感受性変異体の作製に先立ち、ゲノム上の *clr4* 遺伝子座に存在する *clr4* プロモーターの上流に G418 耐性遺伝子を挿入した。予めエピトープタグを付加された *clr4* を用いた。宿主となった株には予めセントロメアに *ade6* マーカー遺伝子が挿入されており、サイレンシングの程度をモニタリングすることができる。*clr4* プロモーターの上流への G418 耐性遺伝子の挿入は *clr4* 遺伝子の機能に影響を与えないことを確認した。次に、G418 耐性遺伝子と *clr4* の CDS を含む領域を PCR で増幅した。この PCR は忠実性の低いポリメラーゼを使用したエラープローン PCR であり、PCR 産物にはランダムに変異が導入された。ポリメラーゼによる DNA 複製の不確実性を利用した本変異導入法では、プリン塩基が別のプリン塩基に、あるいはピリミジン塩基が別のピリミジン塩基に置き換わるトランジション変異が主に導入され、結果としてコードされるタンパク質のアミノ酸置換が起きる。この PCR 産物を変異 DNA のプールとして野生株に導入し、野生型の *clr4* 遺伝子と置換した (図 2)。

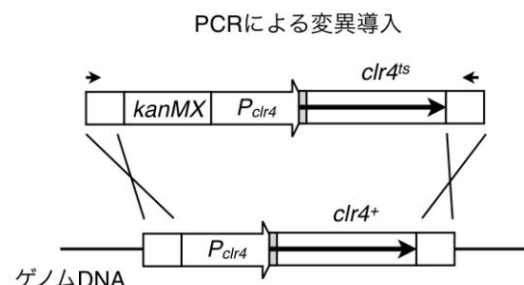


図 2 エラープローン PCR による変異作製

得られた多数の G418 耐性形質転換体の中から、25°Cではサイレンシングが保たれ、

36°Cでは脱抑制される株を複数単離した。戻し交配によって、温度感受性が *clr4* 遺伝子座とリンクしていることを確認した。ゲノムの該当領域をPCRによって増幅し、シーケンス解析を行って温度感受性変異体がもつ点変異を同定した。

次に、*Clr4* 失活後のヒストン修飾の変化をクロマチン免疫沈降によって調査した。細胞を YES 液体培地にて 25°C と 36°C で培養し、対数増殖期にあるときにホルムアルデヒドで固定した。一次抗体として H3K9Me を認識するマウスモノクローナル抗体を用い、抗マウスグネティックビーズを利用して免疫沈降を行った。回収された DNA を鋳型として PCR を行い、標的座位における H3K9Me の程度を調査した。比較対象として野生株と *clr4* 破壊株を用い、クロマチン免疫沈降が技術的に成功していることを確認した。また、内在性の比較対象としてユークロマチン領域の遺伝子を標的とした PCR を行い、ヘテロクロマチン領域における H3K9Me の濃縮の程度を検討した。2 セットのプライマーを用いたマルチプレックス PCR と、リアルタイム PCR により、標的遺伝子座の H3K9Me の程度を評価した。野生株では 25°C と 36°C でセントロメア領域に H3K9Me の濃縮を認め、*clr4* 破壊株では培養温度にかかわらず H3K9Me が認められなかった。*clr4* 温度感受性変異株では、25°C で H3K9Me の濃縮が認められたが、36°C ではそれが消失していた。

この *clr4* 温度感受性変異は、*Clr4* 失活直後の比較的短い期間でのクロマチン動態調査を可能とした。*Clr4* の失活後のクロマチン修飾の変化を調べるため、25°C から 36°C への温度シフト後のサイレンシングの状態を調べた。この結果、*clr4* 温度感受性変異株、25°C から 36°C への温度変化後、数回の細胞分裂を経た後にサイレンシング異常を示した。

当初より DNA 複製によってエピジェネティック標識が減少すると予想していたため、*Clr4* 失活と同時に細胞周期を停止させ、DNA 複製の影響を避けた状態でのヘテロクロマチン安定性の調査を実施した。ここでは、細胞周期を G1 期で止める *cdc10* 変異、あるいは G2 期で止める *cdc25* 変異をバックグラウンドにもつ *clr4* 温度感受性変異株を作製した。これらの二重変異株を用いて上記と同様の温度シフト実験を行ったところ、*cdc* 変異をもたない場合にはサイレンシングの脱抑制が起きたのに対し、*cdc* 変異をもつ細胞を 36°C で同じ期間インキュベートした細胞ではサイレンシングの脱抑制が起きなかった。また、栄養枯渇によって細胞増殖を止めた細胞においても、サイレンシングの脱抑制が起きないことを確認した。このことから、*Clr4* 失活後のヘテロクロマチンの不安定化には細胞周期の進行が必須であると考えられる。

次に、DNA 複製以外にヘテロクロマチンの安定性を脅かすリスク要因を見出すため、ヘテロクロマチンの安定性に影響を与える新規変異をスクリーニングした。

予めセントロメアに *ade6* マーカー遺伝子が挿入された野生株に UV を照射し、ゲノム全体を対象としてランダムに変異を導入した。このとき生存率が 50% になるように UV の照射エネルギーを調節した。アデニンの量が制限された YES プレートに細胞を蒔き、サイレンシングが脱抑制された株を多数単離した。戻し交配によって、1 遺伝子の変異に基づく表現型が継代を通して徐々に現れるものを選抜した。これらの変異株では、サイレンシングがある程度安定に保たれるけれども次第に不安定になる。このことから、原因遺伝子はヘテロクロマチンの安定性に寄与すると考えられた。一次スクリーニングで得られた多くの変異は戻し交配後に既知のヘテロクロマチン因子と同様の表現型を示したため破棄した。

ヘテロクロマチンを不安定化させる変異の戻し交配を繰り返し、遺伝学的マッピングとシーケンスによって原因遺伝子を同定した。同定された 3 つの変異は RNA ポリメラーゼ II の制御因子をコードしていた。

4. 研究成果

まず、エラープローン PCR によって *Clr4* の点突然変異を誘導し、温度制御によってヘテロクロマチンの状態を制御できる変異体の作製に成功した。変異体の細胞では、低温においては遺伝子発現のサイレンシングがある程度正常に保たれるが、高温においてはサイレンシングが脱抑制される。クロマチン免疫沈降によってクロマチン修飾を調査したところ、たしかに培養温度によってクロマチンの修飾状態が変化していた。

変異体の解析の結果、温度シフト直後にサイレンシングが完全に脱抑制されるというよりも、高温で細胞分裂を繰り返すほどにサイレンシングの脱抑制の程度が上昇していく様子が観察された。栄養枯渇による細胞増殖停止、あるいは細胞周期の進行を阻害する変異による増殖停止はサイレンシングの脱抑制を阻害した。このことから、H3K9Me 修飾活性の不在時には、連続的な細胞周期の進行によってヘテロクロマチンのヒストン修飾が次第に失われていくと考えられる。

ヘテロクロマチンと相互作用する HP1 ファミリータンパク質はクロマチン上での交換頻度が非常に高いことが知られている。このためヘテロクロマチンは極めて可塑性の高い柔軟な構造であろうと予想していたが、今回の結果より、単にヘテロクロマチン構築因

子を失活させるだけでは、発現抑制の速やかな解除は起きないと考えられた。

次に、ヘテロクロマチンの安定性を保証する因子の順遺伝学的スクリーニングを行った。このスクリーニングでは、始めのうちはヘテロクロマチンが維持されているけれども継代に伴って次第にヘテロクロマチンが壊れていくという表現型を示す変異を多数得た。次に、戻し交配と遺伝学的マッピングによって原因遺伝子を同定した。これらのうち3つの変異はRNAポリメラーゼIIの制御因子をコードする遺伝子にヒットしていた。

今回のスクリーニング結果の注目すべき点は、ヒストン修飾やRNAi経路に関わる既知因子ではなく、RNAポリメラーゼIIの制御因子がヘテロクロマチンの安定性に関わる因子として見出されたことである。この結果は、ヘテロクロマチンを安定に保つためにはRNAポリメラーゼIIの厳密な制御が必要であることを強く示唆している。今回得られた変異をもつ細胞は、RNAポリメラーゼIIによる不必要な転写を抑えきれないか、あるいは転写と共役して起こるRNAi依存的なヘテロクロマチンの再構築過程に欠陥をもつと考えられる。転写はRNAi依存的ヘテロクロマチンの構築に不可欠であるが、その一方でヘテロクロマチンの不安定化要因にもなりうるのだろう(図4)。今後は、今回得られた因子のさらなる解析を行うことで、ヘテロクロマチンの安定性を保証する仕組みの理解が深まると期待される。

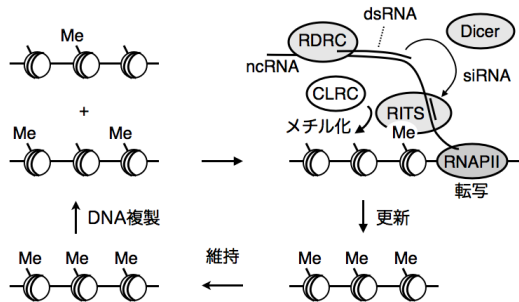


図4 転写制御の異常がヘテロクロマチンの不安定化に寄与するのだろうか

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加藤太陽, 浦野健, 緑色蛍光タンパク質を用いた細胞内タンパク質のダイナミクス解析, 島根医学, 30, 89-97, 2010, 査読無し

[学会発表] (計2件)

①加藤太陽, 分裂酵母のヘテロクロマチン制御を理解するための順遺伝学的挑戦, 第1回高次クロマチン研究会, 2010年8月10日, 福井大学文京キャンパス

②中山直美, 坂下暁介, 成相裕子, 加藤太陽, 浦野健, 転写制御因子 NAC1 の機能ドメイン解析と細胞内動態, 第27回染色体ワークショップ, 2010年1月21日, 御殿場高原ホテル B.U. (静岡県御殿場市)

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: 物質相互作用をリアルタイムに可視化する技術

発明者: 岡崎宏亮, 成相裕子, 加藤太陽, 浦野健

権利者: 島根大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-76772

出願年月日: 2011年3月30日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.shimane-u.ac.jp/biochem2/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 太陽 (KATO HIROAKI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 40548418

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: