

研究課題別評価

1 研究課題名: クロマチンの動的構造変換による遺伝子発現の制御

2 研究者氏名: 中山潤一

研究員: 定家真人(研究期間: H14.4.1. ~ H17.3.31)

3 研究の狙い:

細胞が個体を形作るための多様性を生み出すには、決まった時期に適当な遺伝子をオン、あるいはオフにしてその状態を維持させることが重要になる。この際、DNA の一次配列の変化では説明できない、エピジェネティクスと呼ばれる現象が重要な働きをしていると考えられている。この現象を説明する機構として、DNA 自身のメチル化やクロマチン構造の変化、あるいは短い二本鎖 RNA による転写後の発現抑制などが考えられているが、その詳細な分子メカニズムについては不明な点が多く残されている。本研究では、クロマチン構造に基づくエピジェネティックな遺伝現象が、どのように形成され、またどのように細胞分裂を通じて維持されているのか、その分子メカニズムの理解を目指した。具体的には、高次クロマチン構造という点で高等動物細胞の優れたモデル生物となる分裂酵母を用いて、クロマチンの基本構成単位であるヒストンの修飾の変化と、クロマチン結合蛋白質の動態について詳細な解析を進めることで、代表的な高次クロマチン構造であるヘテロクロマチンの形成・維持機構の解明を目的とした。

4 研究成果:

(1) DNA の複製過程とエピジェネティックな情報の維持

分裂酵母のヘテロクロマチン構造の維持に関わる因子として、研究者はこれまでにヒト HP1 の相同蛋白質 Swi6 と、ヒストン H3-K9 特異的メチル化酵素 Clr4 が重要な働きをしている事を明らかにしていた(Nakayama *et al.*, Cell, 2000; Nakayama *et al.*, Science, 2001)。もしこれらの因子の発現量を、自在に誘導・変化させることができれば、DNA の複製過程におけるクロマチン構造の動態を、分子レベルで解析することが可能になると考え、まずこれらの因子の誘導発現系の構築を試みた。既に報告のある数種類の発現誘導系を応用し、実際に発現の誘導が起きる事を確認することができた。しかし、発現量のコントロールと基底発現の抑制が困難であり、実際に DNA 複製過程とクロマチン構造変換との関連を詳細に解析するためには、さらに厳密な発現量のコントロールをする工夫が必要である事が明らかになった。DNA 複製過程におけるクロマチン情報の伝播機構は、未だ解決されていない重要な問題であるため、現在さらに発現系の改良を継続して進めている。

(2) ヘテロクロマチン構造維持に関わる因子の機能解析

分裂酵母の Swi6 は、進化的に良く保存されたクロモドメインを有しており、このドメインを介してメチル化修飾されたヒストン H3 に結合することで、高次クロマチン構造を形成していると考えられている。しかし分裂酵母に存在する Swi6 以外のクロモドメイン蛋白質が、ヘテロクロマチン構造形成にどのように関わっているのかは不明であった。そこで、遺伝学的な解析からヘテロクロマチンとの関連が示唆されていたクロモドメイン蛋白質、Chp1 と Chp2、について Swi6 との関連を含めてヘテロクロマチン構造形成に関わる機能を調べた。その結果、1) Chp1 と Chp2 は Swi6 と同様にセントロメア、テロメア、接合型遺伝子座 (*mat* 座) に共通して局在すること、2) これらの局在はメチル化酵素 Clr4 に依存していること、3) Chp1 の欠損によってセントロメアの Swi6、Chp2 の局在と H3-K9 メチル化が特異的に減少し、テロメアや *mat* 座には影響しないことが明らかになった。特に Chp1 のセントロメア特異的な表現型に着目し、ヘテロクロマチンの形成過程を調べる実験を行ったところ、Chp1 がヘテロクロマチン構造の確立(establishment)の過程に必須な機能を有しており、

RNAi 因子(Ago1, Dcr1, Rdp1)と機能的な相関を持つことが明らかになった。さらに、確立の過程が不全な Chp1, RNAi 欠損株においても検出される、H3-K9 のメチル化がどのような機構で維持されているか、クロマチン免疫沈降法で詳しく調べた結果、Swi6 と Chp2 が H3-K9 メチル化の維持(maintenance)に重要であり、それぞれが協調的に働いている事が明らかになった。以上の結果から、異なるクロモドメイン蛋白質が、高次クロマチン構造の指標である H3-K9 メチル化修飾の確立と維持という別々の過程に、それぞれ重要な働きをしている事が解明された。さらに、異なるヘテロクロマチン領域において、共通の構造因子が存在しているにも関わらず、Chp1 や RNAi の欠損株で異なる表現型が見られる現象は、各染色体領域間で確立と維持のバランス異なるという機構で説明できるという、新しい考えを提唱することができた(Sadaie *et al.*, EMBO J., 2004)。

一方、ヒストンのメチル化酵素については、進化的に良く保存された SET ドメインを有することが、近年の解析から明らかにされているが、分裂酵母における Clr4 以外の SET ドメイン蛋白質の基質や、その修飾の生物学的な意義についてはほとんど明らかにされていない。Clr4-Swi6 で見られるクロマチン構造変換に関わる関係が、他の SET ドメイン蛋白質にも存在するのか解析を行うことにした。分裂酵母に存在する 11 の SET ドメイン蛋白質を網羅的に遺伝子破壊して、クロマチンの構造変換の指標である表現型を調べたところ、幾つかの SET ドメイン蛋白質の破壊株で、クロマチン構造や染色体の分配の異常に関わる、興味深い表現型が見いだされた。現在これらの SET ドメイン蛋白質の機能について、詳細な解析を継続して進めている。

(3) ヒト・クロモドメイン蛋白質 MRG15 の機能解析

分裂酵母で明らかにされた知見を、さらに高等動物細胞における現象の理解へと結びつける試みとして、分裂酵母ヒストン修飾酵素の精製過程で見いだされたクロモドメイン蛋白質 Alp13 (Nakayama *et al.*, EMBO J., 2003) のヒトの相同蛋白質であり、腫瘍細胞株の分裂寿命との関連が示唆されていた、MRG15 蛋白質についての機能解析を行った。まずヒト培養細胞中の MRG15 の局在を解析したところ、核内の転写領域へ局在する事が明らかとなり、転写制御に重要な役割を担う蛋白質であることが推測された。さらに、ヒト培養細胞から MRG15 を含む蛋白質複合体を精製したところ、MRG15 がヒストンのアセチル化酵素 Tip60 の酵素複合体と相互作用している事を見いだした。残念ながらこの知見は、他のグループによって先に報告されたが、依然 MRG15 がヒストン修飾の動態に果たす役割は不明であり、そのクロモドメインの役割も含め、引き続き機能解析を継続中である。

5 自己評価:

本研究の計画段階では大きく三つの研究課題を掲げて研究を推進した。特にヘテロクロマチン構造の形成に関わる因子の機能解析を目指した研究では、従来考えられていたような、ヒストンのメチル化修飾とそれを認識するクロモドメイン蛋白質 HP1/Swi6 の結合によって一義的に決まる単純な構造ではなく、複数のクロモドメイン蛋白質がそれぞれ確立と維持という別々の機能に関わり、ダイナミックな制御によって形成される構造である事を明らかにできたという点は、非常に重要な研究成果と考えられる。また、クロモドメイン蛋白質 Chp1 が、ヘテロクロマチンの確立という過程で、RNAi 因子と深く関係することを明らかにした点は、現在注目されている RNAi 機構の核内での遺伝子発現調節という観点からも興味深い結果であり、今後より詳細な機能解析へつなげていきたいと考えている。

一方、最初に提案した他の研究課題について、全て順調に展開し研究成果に結びついたかという観点で振り返って考えてみると、計画段階の熟考の不足や研究の進展のさせ方という点で反省すべき点もあるように思われる。しかし、SET ドメイン蛋白質の新規の機能を示唆する実験結果や、徐々に解明されてきたヒト MRG15 蛋白質の機能など、着実に研究成果は蓄積してきており、引き続き解析を進め発展させることで、近い将来それぞれの研究成果を報告できると考えている。

最後に、本研究によって設備も人材も全くのゼロから独立した研究室を立ち上げ、それを主宰するという、実に貴重な経験をすることができた。本研究が現在の研究チームの核になった事は間違いなく、ポストドク参加型の本研究の意義は非常に大きかったと考えられる。今後、本研究で得られた知見をさらに発展させ、クロマチン構造変化とエピジェネティックな遺伝現象の理解を目指して研究を進めたい。

6 研究総括の見解:

今後、エピジェネティック機構解明領域では、その重要性の認識とともに競争も国際レベルで激化しつつある。これまでに注目すべき成果を上げつつあり、ハイランク研究者としての今後の着実な成長が期待できよう。発表論文の数は多くないものの質は高い。

7 主な論文等:

論文

1. Nakagawa, H., Lee, J.-K., Hurwitz, J., Allshire, R.C., Nakayama, J., Grewal, S.I.S., Tanaka, K., and Murakami, Y. (2002)
Fission yeast CENP-B homologs nucleate centromeric heterochromatin by prompting heterochromatin-specific histone tail modifications.
Genes Dev. 16: 1766-1778.
2. Tamaru, H., Zhang, X., McMillen, D., Singh, P., Nakayama, J., Grewal, S., Allis, D., Cheng, X., and Selker, E.U. (2003)
Trimethylation of Histone H3 Lysine-9 Associated with Methylated DNA in *Neurospora*.
Nature Genet. 34: 75-79.
3. Nakayama, J., Xiao, G., Noma, K., Malikzay, A., Bjerling, P., Ekwall, K., Kobayashi, R., Grewal, S.I.S. (2003)
Alp13, an MRG family protein, is a component of fission yeast Clr6 histone deacetylase required for genome integrity.
EMBO J. 22: 2776-2787.
4. Sadaie, M., Iida, T., Urano, T., and Nakayama, J. (2004)
A chromodomain protein, Chp1, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast.
EMBO J. 303: 3825-3835.

総説・解説

1. 中山潤一
ヒストンのメチル化修飾によるクロマチン構造の変化
細胞工学 21: 269-273, 2002.
2. 中山潤一
ヒストンのメチル化とクロマチン構造の変化
実験医学増刊「ゲノム機能を担う核・染色体のダイナミクス」(花岡文雄・永田恭介編) 20: 82-88, 2002.
3. 中山潤一
ヒストン修飾酵素
in「クロマチンと遺伝子機能制御」(堀越正美編, シュプリンガー・フェアラーク東京) p81-90, 2003.
4. 定家真人, 中山潤一
ヘテロクロマチン化の分子機構

実験医学増刊「エピジェネティクスと遺伝子発現制御」(押村光雄・伊藤敬編)21: 94-100, 2003.

5. 中山潤一
ヘテロクロマチン-構造形成と維持の分子メカニズム-
医学のあゆみ 201: 811-816, 2003.
6. 中山潤一
ヒストン H3 のメチル化によるクロマチン構造の制御
分子細胞治療 3: 14-20, 2004.

招待講演

国際会議・シンポジウム等 3件
国内会議・シンポジウム等 8件

その他学会発表

海外 2件, 国内 8件