

クロマチン動態研究チーム

Laboratory for Chromatin Dynamics

チームリーダー 中山潤一
NAKAYAMA, Jun-ichi

多細胞生物の個体を構成する多種多様な細胞は、全てその遺伝情報として同じセットのゲノム DNA を持っている。個々の細胞で異なる遺伝子の発現を維持し、細胞分裂を通じてその発現パターンを正確に伝播していくことは、その個体の発生にとって必須と考えられている。近年、このような遺伝子発現の調節メカニズムとして、直接 DNA の一次配列の変化を伴わない、エピジェネティックな現象が注目されている。この現象を説明する代表的な機構としては、DNA のメチル化、クロマチン構造の変化、あるいは RNA 分子による転写後調節などが挙げられる。最近の研究からそれぞれが相互に関連していることが示唆されつつあるが、その詳細については不明な点が多く残されている。当研究チームではクロマチン構造の変化、特にヒストンの修飾とそれを認識するクロマチンタンパク質に注目し、DNA 複製や細胞分裂に際してエピジェネティックな情報がどのように継承されるのか、その分子機構の解明を目指して、分裂酵母とヒト培養細胞を用いて研究を進めている。

1. ヘテロクロマチン構造の形成・維持機構の研究

(1) 分裂酵母クロモドメインタンパク質の機能解析 (中山, 定家 *¹)

クロモドメインは、クロマチンの構造変換に関わる因子に見いだされる、進化的に良く保存されたドメインである。我々はこれまでに、ヘテロクロマチンタンパク質 HP1/Swi6 が、そのクロモドメインを介して 9 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 (H3-K9) を認識して結合し、クロマチンの構造変換をもたらすことを明らかにしている。また、分裂酵母の他のクロモドメインタンパク質 Chp1, Chp2 について解析を進め、(1) Chp1, Chp2 が、Swi6 同様にメチル化依存的にヘテロクロマチン領域に局在する重要な因子であること、(2) Chp1 は、RNAi 因子と遺伝的相関を有し、RNAi 因子と同様にヘテロクロマチンの確立の過程に重要な役割を果たしていること、を明らかにしている。一方、確立の過程が働いていないと考えられる Chp1 あるいは RNAi 因子の欠損株でも、テロメアや *mat* 座では H3-K9 のメチル化は維持されており、セントロメアにおいても部分的にメチル化修飾は残存している。この事実は、確立のステップに依らない、メチル化を維持する機構の存在を示唆している。そこで、メチル化の維持に関わる Swi6/Chp2 の役割を探るため、それぞれの欠損と $\Delta chp1$ との二重破壊株、三重破壊株 ($\Delta chp1\Delta swi6$, $\Delta chp1\Delta chp2$, $\Delta chp1\Delta swi6\Delta chp2$) を作成し、ヒストン H3-K9 のメチル化状態をクロマチン免疫沈降法で解析した。その結果、 $\Delta chp1$ で残存していたセントロメアでの H3-K9 のメチル化が、 $\Delta swi6$ と掛け合わせることで消失することが明らかになった。また、 $\Delta chp2$ と掛け合わせた場合でも、顕著なメチル化の減少が確認された。さらに興味深いことに、 $\Delta chp1$ 単独破壊株、 $\Delta chp1\Delta swi6$ 、 $\Delta chp1\Delta chp2$ 二重破壊株では影響が見られなかったテロメアと *mat* 座においても、三重破壊株 $\Delta chp1\Delta swi6\Delta chp2$ にすると、顕著に H3-K9 のメチル化が減少することが分かった。以上の結果から、Swi6 と Chp2 が、H3-K9 メチル化の維持に重要な働きをしていること、さらにその働きは

協調的に寄与していることが明らかにされた。

(2) HP1 相同タンパク質 Swi6/Chp2 の機能解析 (中山, 川口)

分裂酵母の Swi6 と Chp2 は、ヒトやショウジョウバエのヘテロクロマチンタンパク質 HP1 の相同タンパク質であり、共に進化的に良く保存されたドメインを有している。これらのタンパク質がどのような機構でヘテロクロマチン構造の維持に関与しているのか、さらに詳細な解析を進めた。まず、Swi6 欠損株に Chp2 を発現させて、両者が単独に重複した機能を有しているのか調べたところ、Chp2 の過剰発現は Swi6 の欠損表現型を全く回復できないことが分かった。また、野生株において Chp2 を過剰発現させた場合、ヘテロクロマチンの指標であるサイレンシングが解除されることが明らかになった。以上の結果より、Swi6 と Chp2 は、メチル化の維持に関して協調して働く一方、転写を抑制するというヘテロクロマチンに特徴的な機能に関しては、逆の機能を持つことが推測された。この機能的な違いが Swi6/Chp2 のどの領域に依存しているか明らかにするため、それぞれ 4 つのドメイン (N, CD, INV, CSD) に分割して、各ドメインを置換させたキメラ Swi6/Chp2 を発現させてその影響を評価した。その結果、CD と INV 領域は交換可能であるのに対して、N と CSD の 2 つの領域は、それぞれの機能の違いに重要な役割を果たしていることが明らかになった。現在さらに詳細な解析によって、ヘテロクロマチン構造形成に関わる機能の解明を目指している。

(3) 分裂酵母 SET ドメインタンパク質の機能解析 (中山, 定家 *¹)

SET ドメインは、多くのヒストンメチル化酵素に存在し、クロマチンの構造変換に重要な役割を果たしている。分裂酵母では、ゲノム解析により約 12 の SET ドメインタンパク質をコードする遺伝子が同定されている。これまでの研究によって、SET ドメインタンパク質の 1 つである Clr4 が、ヒストン H3-K9 メチル化酵素であり、ヘテロクロマチン形成に重要であることを明らかにした。しかし、他の

SET ドメインタンパク質の機能やその基質については、ほとんど明らかにされていない。クロマチンの構造変換に果たす SET ドメインタンパク質の機能を明らかにすることを目的として、我々は 11 存在する Clr4 以外の SET ドメインタンパク質をコードする遺伝子をそれぞれ破壊した株を作成し、クロマチン構造に及ぼす影響を検討した。その結果、幾つかの SET ドメインタンパク質の欠損株で、クロマチン構造変換の指標である、サイレンシングに異常が認められることが明らかになった。また、興味深いことに *set11+* と名付けた遺伝子の破壊株では、染色体の分配異常を評価する薬剤に対して強い耐性を示すことが確認された。この結果は、Set11 がメチル化修飾を通じて、染色体の安定な分配に関与することを強く示唆するものと考えられる。さらに我々は、Set11 タンパク質と染色体分配に関わる他の因子との関連を調べ、微小管の重合を制御する因子との間に遺伝的な相関があることを見いだした。現在、Set11 タンパク質がどのように染色体分配に関わるのか解明するため、メチル化酵素としての基質を同定する解析を進めている。

(4) ヘテロクロマチン構造形成と RNAi 機構の研究 (中山, 飯田, 川口, 金 *2)

短い二本差 RNA による特異的な RNA 分解機構 (RNAi) は、線虫からヒト細胞まで保存された現象であり、特定の遺伝子機能を解析する手法として広く知られている。一方分裂酵母では、この RNAi に関わる因子が、ヘテロクロマチン構造の維持に関与していることが報告されている。しかし、どのように RNAi 因子がクロマチンの構造変化をもたらしているのか、その詳細な機構については不明な点が多く残されている。RNAi 機構がクロマチン構造変換に果たす役割の解明を目指して、他の生物種で RNAi との関連が示唆されている因子について、分裂酵母のクロマチン構造変換に及ぼす影響について解析を行った。その結果、進化的に良く保存された RNA 分解酵素が、ヘテロクロマチン構造の形成を負に制御していることを見いだした。この新規 RNA 分解酵素の欠損株では、細胞内の siRNA の量が著しく増加していることから、この酵素は siRNA の量を調節することで、クロマチンの構造に影響を及ぼしていることが考えられた。現在さらに詳細な分子機構の解明に向けて解析を進めている。

2. クロマチン構造変換因子の研究 (中山, 早川 (智), 早川 (典), 大谷)

ヒト細胞の *MRG15* 遺伝子は、一群のヒト腫瘍由来の培養細胞に分裂寿命をもたらす遺伝子として単離された *MORF4* に関連する遺伝子であり、酵母からヒトに至るまで進化的に広く保存されたクロモドメインタンパク質をコードしている。分裂酵母や出芽酵母における相同タンパク質の解析から、ヒストンのアセチル化を制御する酵素複合体の構成要素として存在し、遺伝子発現や染色体の凝集に重要な働きをしていることが報告されている。これまでの我々の解析によって、ヒト *MRG15* が、転写の伸長領域を示すリン酸化型 RNA ポリメラーゼ II や 36 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 と共局在すること、また、*MRG15* を細胞抽出液から精製することで、*MRG15* が Tip60 の含まれる HAT 複合体と相互作用していることを明らかにしている。これらの結果は、*MRG15* が HAT 複合体をリクルー

トして転写の調節に関わることを示唆しているが、*MRG15* の実際の機能や、そのクロモドメインの持つ役割は依然として不明である。ヒト細胞では、*MRG15* とよく似た構造的特徴を持ち、クロモドメインを欠いた *MRGX* と、相互作用する因子として単離された *MRGBP* が、それぞれ機能的に密接な関係にあると推測されている。そこで、これら関連する因子も含めその機能を探るため、エピトープタグ付きの *MRG15*, *MRGX*, *MRGBP* を発現する細胞株を作成し、それぞれの関係と、相互作用する因子の同定を試みた。その結果、*MRG15* と *MRGX* はそれぞれ *MRGBP* と安定に結合するのに対し、*MRG15* と *MRGX* の間の相互作用は認められないことが分かった。また、*MRGBP* が、*MRG15* と *MRGX* の細胞内の量を制御する因子であることを強く示唆する結果が得られた。さらに、それぞれの因子を細胞抽出液からアフィニティー精製することで、Tip60 複合体を含めクロマチン構造変換に関わる多数の因子を同定することにも成功した。現在同定した因子から推測される *MRG15* の機能について詳細な解析を進めるとともに、転写制御との関わりについても引き続き検討を行っている。

*1 客員研究員, *2 研修生

Multicellular organisms are made up of diverse populations of many different types of cells, each of which contains an identical set of genetic information coded in its DNA. Cell differentiation and the process of development itself depend on the ability of individual cells to maintain the expression of different genes, and for their progeny to do so through multiple cycles of cell division. In recent years, we have begun to understand that the maintenance of specific patterns of gene expression does not rely on direct modifications to the DNA sequence encoding the organism's genome, but rather takes place in a heritable, "epigenetic" manner. DNA methylation, chromatin modifications and post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA molecules are some of the best known epigenetic phenomena. Recent studies have begun to show that these different mechanisms are closely inter-related, but a detailed understanding of these systems has yet to be developed.

Our team investigates how modifications to the structure and configuration of chromatin (complexes of nuclear DNA and proteins that provide the structural basis of chromosomes) contribute to epigenetic gene regulation and how such modifications are transmitted over generations of cellular division by studying events at the molecular scale in the model organism, fission yeast (*Schizosaccharomyces pombe*), and in cultured mammalian cells.

Histones are a set of DNA packing proteins present in nucleosomes, the fundamental building blocks of chromatin. In our current studies, we are particularly interested in determining the specific histone modifications and the molecular recognition processes that enable modified histones to work together to construct and maintain higher-order chromatin structures. We also seek to clarify the picture of how dynamic rearrangements of chromatin structure are triggered by examining the structure and function of protein complexes that bind to and modify histones. In the future, we plan to perform more detailed analyses of the molecular mechanisms that underlie epigenetic function, as well as studies in higher organisms and

epigenetic gene expression in developmental processes.

Research Subjects

1. To understand how heterochromatic structure is established and maintained through cell division and generations
2. To characterize factors which modulate chromatin structure to control epigenetic gene silencing

Staff

Team Leader

Dr. Jun-ichi NAKAYAMA

Research Scientists

Dr. Tomohiro HAYAKAWA

Dr. Tetsushi IIDA

Technical Staff

Ms. Noriyo HAYAKAWA

Ms. Rika KAWAGUCHI

Ms. Yasuko OHTANI

Visiting Members

Dr. Mahito SADAIE (PRESTO/JST)

Trainees

Mr. Daigo KIN (Grad. Sch. Sci. Technol., Kwansai Gakuin Univ.)

誌 上 発 表 **Publications**

[雑誌]

(原著論文) *印は査読制度がある論文

Sadaie M., Iida T., Urano T., and Nakayama J.: "A chromodomain protein, Chp1, is required for the establishment of heterochromatin in fission yeast", *EMBO J.* **23**, 3825–3835 (2004). *

(総 説)

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* **208**, 811–816 (2004).

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**, 172–178 (2004).

口 頭 発 表 **Oral Presentations**

(国内会議)

定家真人, 中山潤一: "Distinct roles of chromodomain proteins in the formation of higher order chromatin structure", CDB Symposium 2004, 神戸, 3月 (2004).

早川智博, 大谷寧子, 中山潤一: "Subcellular localization of human MRG15 protein", CDB Symposium 2004, 神戸, 3月 (2004).