

染色体ゲノムの機能領域を区分するバウンダリーエレメントの解明と

その応用

石井浩二郎

1. 研究のねらい

染色体ゲノムからの遺伝子の発現制御は、主に遺伝子 DNA の折り畳み度を調節するクロマチン構造の変化で体现される。従って遺伝子が連なった各染色体には、全長に沿って異なるクロマチン構造領域が混在することになる。しかしながら各領域のクロマチン構造は近傍 DNA に自律的に伝播していく特性を有するため、特に遺伝子が近接している染色体部位においては、クロマチン構造変換効果を遮断してあいまいさを排除する「隔壁」が、ダイナミックな細胞プログラムの緻密かつ正確な発動にとって不可欠となる。そのようなクロマチン構造の隔壁として働く「バウンダリーエレメント」の研究は現在世界各地で進められているが、その分子的本質は未だ不明なままである。本研究では、染色体ゲノムの機能領域を区分すると考えられるバウンダリーエレメントが特にヘテロクロマチン構造を遮断する仕組みについて、分裂酵母を実験材料に詳細な解析を行った。

2. 研究成果

本研究においては、1) 染色体上でヘテロクロマチンを遮断している生来のバウンダリーエレメントの解析、2) ヘテロクロマチン領域の拡大を引き起こす分子作用の理解、3) ヘテロクロマチンの拡大を構造的に阻止する能力を持つ蛋白質因子の機能的探索、の 3 点を中心にバウンダリーエレメントの解析を進めた。

1) 染色体上でヘテロクロマチンを遮断している生来のバウンダリーエレメントの解析

ヘテロクロマチンは遺伝子転写を抑制する閉じたクロマチン構造であり、特異的なヒストン修飾やその修飾特異的な結合蛋白質 HP1 が分子基盤を担う。分裂酵母でもそれらの要素は高度に保存され、染色体動態を制御するセントロメア DNA 部分では、Mis6 キネトコア複合体を構成する中央ドメインの両端の反復 DNA 部位上に形成される。セントロメア DNA でのヘテロクロマチン領域と非ヘテロクロマチン領域を決定する分子要因を解析した結果、開かれた中央ドメインと閉じたヘテロクロマチンドメインの領域画定は相互のクロマチン構造に依存して拮抗的に達成されていることが判明した。中央ドメインの周辺ヘテロクロマチンとの境界は DNA 一次配列に規定された絶対的なものではなく、この領域には構造的な隔壁は存在しないと考えられる。

2) ヘテロクロマチン領域の拡大を引き起こす分子作用の理解

ヘテロクロマチンの遮断機構を解明するためには、ヘテロクロマチンの拡大を引き起こす機構の十分な理解も必要である。これまでヘテロクロマチンの拡大は、特異的なヒストン修飾が結合蛋白質を通じてヌクレオソームアレー上を隣に伝播していくことで引き起こされていると考えられていた。しかし近年になって、ヘテロクロマチンを形成する反復 DNA 配列から RNA が転写され、その産物が RNAi 機構によって siRNA に処理されてエフェクター複合体に取り込まれることが、ヘテロクロマ

チンの形成自体に関わっていることが報告された。ヘテロクロマチンが siRNA に導かれて染色体上を伝播する可能性を検証するために、分裂酵母で生成される siRNA の詳細な解析を行った。その結果、siRNA 生成は SIRE (siRNA regulatory element) を含む特異的な転写産物によって引き起こされ、それが誘導するヘテロクロマチンの近傍 DNA 領域への拡大は siRNA の配列とは独立であることが判明した。RNAi 機構を介するヘテロクロマチン形成はヘテロクロマチンの核として特徴的な役割を果たすが、領域の画定自体はヒストン修飾のレベルで行われているものと思われる。

3) ヘテロクロマチンの拡大を構造的に阻止する能力を持つ蛋白質因子の機能的探索

ヘテロクロマチンを遺伝子転写の上で拮抗的ではなく中立的に遮断する因子を探索するために、分裂酵母染色体上に二つの栄養要求性マーカーなどを組み合わせたバウンダリーエレメントのアッセイコンストラクトを作成した。両端に SIRE に関連したヘテロクロマチン源を配置し、DNA 標的配列で一方のマーカーのみを挟むことにより、そのマーカーのみのヘテロクロマチンからの脱抑制をバウンダリーエレメント樹立の指標とした。ヘテロクロマチンを拮抗的に遮断する因子は両マーカーを共に活性化するため、区別が可能となる。このアッセイシステムに DNA 標的化蛋白質と融合させた発現ライブラリを適用して、中立的バウンダリーエレメントを誘導する蛋白質の直接的単離を目指した。当初の LexA 蛋白質を活用した DNA 標的化システムは、LexA 自体の示すバックグラウンド活性によって十分に機能しなかったが、Gal4 蛋白質との融合に切り替えることで特異性の向上が得られた。その結果、分裂酵母においても核膜孔複合体への染色体の物理的相互作用がヘテロクロマチンの遮断を引き起こすことが判明した。その他の構造的要素についても解析が進んでいる。

3. 今後の展開

分裂酵母においては、中立的にヘテロクロマチンを遮断する内在性のバウンダリーエレメントについての証拠は未だ得ていないが、そのような機構に関連する因子を単離するアッセイツールとしては十分に機能が発揮できることが示された。今後は遺伝的探索で得られた知見を細胞核構造レベルの解析に進展させて、バウンダリーエレメント機構のより明解な理解を目指す。また、高等細胞にこのようなバウンダリーエレメントシステムを対応させて新規ベクターシステムの開発に資することを試みる。加えて、シス配列として siRNA 産生を誘導する能力が判明した SIRE の機構解析をさらに推し進め、RNAi 機構の分子的な理解に貢献するとともに、遺伝子ノックダウンシステムでの有効的活用が見込まれるような基礎データの提供を目指す。

4. 研究成果リスト

論文

1. Ishii, K. and Laemmli, U. K.: Structural and dynamic functions establish chromatin domains. *Molecular Cell* 11: 237-248, 2003
2. Saitoh, S., Ishii, K., Kobayashi, Y. and Takahashi, K.: Spindle checkpoint signaling requires the Mis6 kinetochore subcomplex, which interacts with Mad2 and mitotic spindles. *Molecular Biology of the Cell* 16: 3666-3677, 2005
3. Ishii, K., Hiraga, Y. and Takahashi, K.: An RNA element controlling siRNA production and

heterochromatin assembly in fission yeast. (投稿中)

総説

4. 石井浩二郎: 核膜孔への連繋による染色体の機能的区分。実験医学 21: 1874-1880, 2003
5. 石井浩二郎: バウンダリーエレメント。生体の科学 55: 398-399, 2004
6. 石井浩二郎: 小分子 RNA と染色体制御。BIO Clinica 20: 1077-1082, 2005
7. Ishii, K.: Breaking and tessellating the contiguous nuclear genome. In Nuclear Dynamics, Nagata T. and Takeyasu K. Ed., Springer-Verlag Inc. (印刷中)

学会発表

1. 石井浩二郎, Arib, G., Lin, C., Van Houwe, G., Laemmli, U. K.: 核膜孔への連繋による染色体の機能的な区分化。第 25 回 日本分子生物学会年会 横浜 (2002)
2. Ishii, K. and Laemmli, U. K.: Structural and dynamic functions establish heterochromatin boundaries in budding yeast. International Workshop on Nuclear Dynamics, Yokohama, Japan (2002)
3. 石井浩二郎: 出芽酵母でクロマチンの機能境界となる二種類の機構。大阪大学蛋白質研究所セミナー「ゲノムの境界とインスレーター」大阪 (2003)
4. 石井浩二郎, Laemmli, U. K.: ヘテロクロマチンを遮断するバウンダリーエレメントの形成機構。第 20 回 染色体ワークショップ 京都 (2003)
5. 石井浩二郎, Laemmli, U. K.: 染色体の区分化を担うバウンダリーエレメントの分子機構。第 56 回 日本細胞生物学会大会 滋賀 (2003)
6. Ishii, K. and Laemmli, U. K.: Molecular mechanisms of boundary elements that delimit heterochromatin domains. 第 76 回 日本生化学会大会 横浜 (2003)
7. 石井浩二郎, Laemmli, U. K., 平賀由利子, 高橋考太: バウンダリーエレメントによるヘテロクロマチン領域画定機構。第 26 回 日本分子生物学会年会 神戸 (2003)
8. 石井浩二郎: 染色体転写調節効果の遮断機構。第 3 回 転写研究会 つくば (2004)
9. 石井浩二郎: 酵母を用いた染色体機能ドメイン構築の機構解剖。第 16 回 酵母合同シンポジウム 大阪 (2004)
10. 石井浩二郎: 染色体における機能ドメイン境界の形成機構。第 68 回 熊本大学発生医学研究センターCOE リエゾンラボ研究会 熊本 (2004)

11. Ishii, K., Hiraga, Y. and Takahashi, K.: An RNAi- and heterochromatin-mediated de novo gene silencing in fission yeast. International Symposium on Study of Life Inheritance, Nara, Japan (2005)
12. Ishii, K., Hiraga, Y., Urano, T. and Takahashi, K.: An RNAi-mediated gene silencing triggered by transcription in fission yeast. EMBO/FEBS Conference on Nuclear Structure and Dynamics, La Grande Motte, France (2005)
13. Ishii, K., Hiraga, Y. and Takahashi, K.: Induction of siRNA production and heterochromatin assembly in fission yeast. International Symposium on Ran and Cell Cycle, Hyogo, Japan (2005)
14. 石井浩二郎、平賀由利子、高橋考太：分裂酵母セントロメア配列による siRNA 産生とヘテロクロマチン形成の誘導。第 28 回 日本分子生物学会年会 福岡 (2005)
15. 石井浩二郎：転写産物代謝によるヘテロクロマチンの誘導。第 5 回 転写研究会 新潟 (2006)
16. 石井浩二郎、高橋考太：分裂酵母ヘテロクロマチン形成に関与する RNA の性質と機能。第 23 回 染色体ワークショップ 広島 (2006)

特許出願

- ・ 特願 2005-013338 「小分子 RNA の検出方法および小分子 RNA 検出用試薬
- ・ 特願 2005-145876 「RNA 干渉誘導エレメント及びその用途」

謝辞

本研究の遂行に際しまして、日本での研究の機会と場を与えて下さった久留米大学分子生命科学研究所の高橋考太教授に心より感謝いたします。