

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 17 年度博士課程 進学
氏名 鈴木 絵里子
指導教員 加藤 茂明

論文題目 分子遺伝学的手法を用いた新規クロマチン高次構造調節機構の解明

第一章 序論

転写反応は遺伝子プロモーター上に結合する DNA 結合性転写因子群や基本転写因子群、さらにこれらと協調的に働く転写共役因子群を介することが知られている。さらにこれら転写反応はクロマチン高次構造 (higher-order chromatin structure) が規定することが知られており、その高次構造は時空制御を受けている。クロマチン構造はクロマチンが弛緩し転写が活性化しているユークロマチン (euchromatin) とクロマチンが凝集し転写が不活性化しているヘテロクロマチン (heterochromatin) の大きく 2 つの状態に分類され、ユークロマチンとヘテロクロマチンの境界はクロマチンバウンダリーと定義されている。クロマチンバウンダリー構造は特定の DNA 配列であるインシュレーター (insulator) やその DNA を取り巻くヒストンの修飾状態により形成されている。インシュレーターは種間を越えてヘテロクロマチン領域近隣に多く見出されている。一般にヘテロクロマチンは周辺領域に伝播するが、インシュレーターはヘテロクロマチン依存的境界調節機能を発揮することでクロマチンバウンダリー構造を維持する。

近年、分裂酵母ではセントロメア由来 siRNA を介したヘテロクロマチン形成誘導機構が提唱され、ショウジョウバエでは RNA サイレncing 装置の遺伝子変異によってヘテロクロマチン構造による遺伝子発現抑制が解除されることが報告されており、non-coding RNA を基質とした RNA サイレncing 装置がヘテロクロマチン形成を導くことが示唆されている。一方で、インシュレーターには特異的 DNA 結合性因子が結合し、凝集体を形成し、機能することでクロマチン高次構造調節を行うことが示唆されているが、ショウジョウバエ gypsy インシュレーターでは、この凝集体形成に RNA サイレncing 装置が必要であることが示されている。また、gypsy インシュレーター領域内には non-coding RNA が転写されている可能性が推測されている。従って、クロマチンバウンダリー制御には RNA サイレ

ンシング経路を介したヘテロクロマチン化誘導が関与すると考えられるが、インシュレーターはヘテロクロマチン依存的境界調節機能を有することから、両者は相反する。そのため、RNA サイレンシング機能を介した新たなインシュレーター機能が考えられる。

そこで、本研究では、クロマチン高次構造調節機構解明のため、インシュレーターによるクロマチンバウンダリー形成機能に着目した。まず、クロマチン高次構造を評価するのに適し、容易に分子遺伝学的解析可能なショウジョウバエを用い、インシュレーターによる新たなクロマチン高次構造評価系(インシュレーターショウジョウバエ)の構築を試みた。さらに、作出したインシュレーターモデルショウジョウバエを用い分子遺伝学的手法で新規クロマチン高次構造調節因子の取得を試みた。つぎに、取得した候補因子の機能解析として内因性インシュレーターへの調節機構及び遺伝学的相互作用ならびに高次生命機能を解析した。

第2章 新規インシュレーターモデルショウジョウバエの作出

一般的にインシュレーターに挟まれた外来遺伝子がゲノム内に挿入された際、周辺クロマチン環境によらず外来遺伝子は一定の発現量を示すことが知られている。この性質を利用し、新たなインシュレーターモデルショウジョウバエの作出を行った。インシュレーターはショウジョウバエ唾液腺染色体において染色体番地 87A に位置するインシュレーター配列 *scs* 及び *scs'* を使用した。インシュレーターの外側には GFP 及び YFP 遺伝子を、インシュレーター内側には mRFP 遺伝子を配置し、これら発現した蛍光タンパク量をクロマチン状態の指標とした。この人工遺伝子配列をショウジョウバエゲノムに挿入し、人工遺伝子がユークロマチン、ヘテロクロマチン、クロマチンバウンダリーにそれぞれ挿入された系統を数種取得した。次に、これら系統において 3 種の蛍光強度を比較したところ、インシュレーター外側の GFP 及び YFP はユークロマチンでは蛍光強度が強く、ヘテロクロマチン及びクロマチンバウンダリーでは蛍光強度が減弱していた。一方、インシュレーター内側の mRFP はどの系統においても蛍光強度に変化は認められなかった。したがって、インシュレーターによるクロマチン高次構造評価系を構築できたと判断し、これらショウジョウバエ系統を用いてクロマチン高次構造調節因子の探索に着手した。

第3章 クロマチン高次構造調節因子の同定と機能解析

次に、*scs,scs'* インシュレーター機能に対する RNA サイレンシング装置の制御機構を明らかにする目的で、構築したインシュレーターモデルショウジョウバエと複数の RNA サイレンシング装置遺伝子変異体とを掛け合わせた。その結果、siRNA 経路に関与する Dcr-2 及び Ago2 の遺伝子欠損によりインシュレーター内側の mRFP 蛍光強度が増加した。Dcr-2 は RNase III ドメインを持ち、dsRNA を切断する活性を有する。Ago2 は Dcr-2 で切断された 21nt の siRNA と結合し、標的 RNA の分解を行う RISC complex に取り込まれる因子である。これらの報告より、*scs* 及び *scs'* インシュレーターは Dcr-2 及び Ago2 を介した siRNA 経路によってインシュレーター間のクロマチン状態を抑制化していることが推測さ

れた。

第4章 siRNA経路を介したクロマチン高次構造調節機構の解析

次に内因性 *scs,scs'* インシュレータークロマチン高次構造調節機能が *Dcr-2,Ago2* により制御されるかを唾液腺染色体で検討した。染色体番地 87A では heat shock 依存的な puff が形成されるため、*scs,scs'* インシュレーターが HS puff 形成に構造制御する可能性が考えられた。一般的に HS puff はユークロマチン状態として定義されている。Wild type では 37 °C、30 分の heat shock で形成された puff は、室温で 30 分経過すると委縮していく。この際、*Dcr-2* に対する抗体を用いて、唾液腺染色体を免疫染色したところ、HS puff 領域に局在が認められた。一方、*Dcr-2* 遺伝子欠損変異体は、HS puff の委縮が遅いことが判明した。また、*Ago2* 過剰発現変異体では、HS puff 形成が阻害されることが判明した。次に *Dcr-2* 及び *Ago2* 遺伝子欠損変異体より RNA を抽出し、HS puff 内に位置する *hsp70* 遺伝子の mRNA 発現量を Northern blotting によって検討した。その結果、Wild type において heat shock 後、室温 2 時間経過すると *hsp70* mRNA は減少するが、*Dcr-2* 及び *Ago2* 遺伝子欠損変異体はともに heat shock 後、室温 2 時間経過しても *hsp70* mRNA の減少は認められなかった。以上の結果より、内因性 *scs,scs'* インシュレーターは *Dcr-2, Ago2* による siRNA 経路を介して HS puff 内のユークロマチン化を阻害し、*hsp70* 発現を抑制することが示唆された。

第5章 クロマチンバウンダリー領域における non-coding RNA の同定とその機能解析

インシュレーターによるクロマチン高次構造調節機構に siRNA が機能する可能性が強く示唆されたことより、*scs,scs'* インシュレーターの機能に関与する siRNA の探索を試みた。そこで、インシュレーターより non-coding RNA が転写され siRNA となり機能する可能性を考え、*scs* 及び *scs'* 由来転写産物の同定を試みた。ショウジョウバエ培養細胞および 3 齢幼虫より RT-PCR を検討した結果、*scs* 及び *scs'* 由来転写産物が検出された。*scs* 由来転写産物は恒常的に転写されているのに対し、*scs'* 転写産物は heat shock 依存的に増加することが確認された。次に、RACE 法を用いて、それら転写産物の配列を決定した。*scs* 由来転写産物は 350bp、*scs'* 由来転写産物は 420bp であり、ともに non-coding RNA であった。また、siRNA は dsRNA から産生されることを考慮し、dsRNA のみから作成した cDNA を用いて RT-PCR を行ったところ、*scs* 及び *scs'* 由来 dsRNA が検出された。よって、*scs* 及び *scs'* より siRNA 前駆体である dsRNA が産生されることが示唆された。さらに、*scs'* dsRNA を過剰発現するトランスジェニック系統を作成し、その個体において HS puff の形成について検討したところ、*scs'* dsRNA 過剰発現によって HS puff の形成が抑制されることが判明した。この際、*scs'* dsRNA は *Dcr-2,Ago2* により siRNA になると予測される、*scs'* インシュレーターは heat shock 依存的に siRNA 経路を介し heat shock によるユークロマチン化を抑制することが考えられた。

第6章 総合討論

本研究では、新規インシュレーターモデルショウジョウバエを用いた分子遺伝学的探索ならびに内因性インシュレーターの遺伝学的機能解析を試みた。その結果、Dcr-2,Ago2 を介してインシュレーター両者間の領域において抑制的にクロマチン高次構造を調節することが判明した。通常、インシュレーター間の領域は転写反応が起きており、ユークロマチンと考えられる。従って、インシュレーターがユークロマチン化に対して抑制的に機能することが示唆された。また、内因性 scs' インシュレーターが 87A HS puff 領域においてユークロマチン化を解消することが示唆された。NHS 状態においても、87A HS puff 領域に存在する hsp70 遺伝子プロモーターには RNAP II がポーズしていることから、NHS 状態において 87A HS puff 領域はユークロマチン化していると考えられる。従って、内因性 scs' インシュレーターは HS による積極的なユークロマチン化を解消し、通常のユークロマチン状態にする機能があると推測される。これらを踏まえると、ユークロマチンは転写活性化の程度別にさらに分類することが可能であり、インシュレーターはそのように分類されるユークロマチン状態を時期特異的に調節すると考えられた。従って、インシュレーターはユークロマチン依存的境界調節機能を有していると考えられる。

さらに、scs' インシュレーターのユークロマチン依存的境界調節機能は scs' 由来 dsRNA がトランスに働き発揮されることが示唆された。これまで non-coding RNA や small RNA の一種である piRNA 結合因子 piwi によるヘテロクロマチン形成・維持機構の解析により、non-coding RNA のゲノム内特定 DNA 領域認識がヒストン修飾酵素やヘテロクロマチン形成因子のリクルートを規定することが示唆されている。従って、scs' インシュレーター由来 dsRNA がヒストン修飾酵素や既知クロマチン構造調節因子をインシュレーター領域へ呼び込むことで、scs' インシュレーターのユークロマチン依存的境界調節機能が発揮されると推測される。

以上、本研究ではインシュレーターモデルショウジョウバエを用いた分子遺伝学的探索によりクロマチン高次構造調節機構を担う新たな因子を同定し、最終的にインシュレーターによるユークロマチン依存的境界調節機能という新たな概念を提唱した。

(参考文献)

Zhao, Y., Lang, L., Ito, S., Bonnet, J., Metzger, E., Sawatsubashi, S., Suzuki, E., Guezennec, X., Stunnenberg, H., Ktasnov, A., Georgieva, S., Schule, R., Takeyama, K., Kato, S., Tora, L., Devys, D. (2008) A TFTC/STAGA module mediates histone H2A and H2B deubiquitination, nuclear receptor activation and counteracts heterochromatin silencing. *Mol Cell*, in press.

Suzuki, E., Ito, S., Sawatsubashi, S., Shiode Y., Zhao Y., Yamagata K., Furutani T., Tanabe M., Kimura S., Kouzmenko A., Aigaki T., Tabata T., Takeyama K., and Kato S. (2008) Aberrant E2F activation by polyglutamine expansion of androgen receptor in SBMA neurotoxicity. in revision.