

## 論文の内容の要旨

応用生命工学専攻  
平成 20 年度博士課程

氏名 林 珍 仙  
指導教官 加藤 茂明

論文題目 分子遺伝学的アプローチによる新たなクロマチン構造調節機構に関する研究

### 第一章 序論

高等真核生物の DNA はヒストンタンパク質から成るヌクレオソームを最小単位とするクロマチン高次構造を形成し、非ヒストンタンパク質等と共に高度に細胞核内に収納されている。クロマチン高次構造は、ヌクレオソームの間隔が弛緩し、転写が活性化したユークロマチン領域と、ヌクレオソームが凝集したヘテロクロマチン領域に大別される。クロマチン高次構造の変換は、DNA 複製、修復時や時期・組織特異的な遺伝情報の発現の要となる転写時に必須な機構である。近年、クロマチン構造変換はヒストンの翻訳後修飾やヒストンバリエーションの置換、クロマチンリモデリングにより規定されていることが判明している。従って、クロマチン構造変換機構を理解する上で、これらを調節する因子群の機能解析が必須となる。中でもクロマチンリモデリングを制御する因子群は、種を越えて構造や機能が強く保存されており、ATPase 活性を有する触媒サブユニットを中心として複合体を形成し機能することが知られている。ATPase 活性を有するクロマチンリモデリング因子はコアヒストンのテイル領域の化学修飾を認識してリクルートされ、ATPase 活性依存的にヌクレオソームの配置を変化させることによってクロマチン構造を制御している。リモデリングが生じたヌクレオソームの領域では、基本転写装置や転写共役因子群の DNA 認識能が変化し、その結果、転写活性の促進や抑制が制御されることが知られている。クロマチンリモデリング複合体は ATPase 触媒サブユニットの種類により SWI/SNF-type、ISWI-type、Mi2-type、INO80-type の 4 種のファミリーに分類され、これまでにそれらの遺伝子破壊モデル個体の表現型からクロマチン構造の領域特異的な機能が予測されている。しかしながら、*in vitro* におけるリモデリング活性の解析では、各々の複合体の機能の特異

性は見出されていない。すなわち、選択的なヒストン化学修飾や転写制御因子に対するクロマチンリモデリング因子との相互作用については理解されつつある。しかしながら、既知クロマチンリモデリング因子の機能解析からでは、標的とするクロマチン領域を認識する分子機構について不明な点が多い。そこで本研究では、クロマチンリモデリング複合体群を標的クロマチン領域に選択的にリクルートするための未知アダプター因子群の存在を想定し、新規因子の探索及び機能解析を行うことにより、新たなクロマチン構造変換機構の解明を目指した。

これまで、クロマチン構造変換機構の解析にはショウジョウバエを用いた先駆的な研究がなされてきた。ショウジョウバエのだ腺多糸染色体では、高度に活性化し弛緩したクロマチン領域をパフと呼ばれる構造として可視化することが可能である。そこで、ショウジョウバエの変態を制御する転写因子のエクダイソンレセプター (**EcR**) に着目した。**EcR** はリガンドであるエクダイソン依存的に転写活性を示すことが知られている。エクダイソン刺激により **EcR** 標的遺伝子を含むクロマチン領域において形成されるパフ構造では、クロマチン構造変換が劇的に生じており、多様なヒストンの修飾やヒストンバリエーションへの置換が免疫染色により観察されている。

本研究ではクロマチンリモデリング因子の新規アダプター因子の取得を試みるため、ショウジョウバエのエクダイソン依存的なパフ構造をクロマチン構造変換領域の指標とし、同構造に局在する因子群のスクリーニングを行った。

## 第二章 新規パフ局在化因子のスクリーニングと同定

本研究では、まず、当研究室の沢津橋博士らにより確立されたプロテントラップシステムライブラリーを用いたスクリーニング系を一次スクリーニングとして行った。具体的には、エクダイソン依存的な **EcR** パフ (エクダイソンパフ) への局在を活性型クロマチン構造の指標とし、GFP 遺伝子がランダムに挿入されたプロテントラップシステムを用い、GFP 融合タンパク質が **EcR** と共局在するシステムを探索した。その結果、全プロテントラップシステムライブラリー677 システムのうち、24 システムで共局在が観察された。これらの因子の中から、さらにクロマチンリモデリングや、染色体構造調節に関わる因子を絞り込むため、二次スクリーニングを行った。各 24 の候補因子をそれぞれ dsRNA によりノックダウンさせ、エクダイソンパフ形成や多糸染色体構造への影響を観察した。その結果、クロマチンリモデリング複合体 **Brahma** (SWI/SNF-type ファミリー) の構成因子である *osa* のノックダウンでは、**EcR** 依存的なパフ形成が観察されず、多糸染色体全体が不安定化する表現型が観察された。また、解糖系酵素である **Enolase**(**Eno**) のノックダウンでも同様の表現型が観察された。**Eno** は解糖系反応の中で脱水素反応を行う酵素としてよく知られているものの、クロマチン上での機能に関する報告はほとんどない。そこで、**Eno** 及び *osa* を候補因子として絞り込み、

以下の解析を進めた。

### 第三章 Enolase のクロマチン構造に対する機能解析

まず、Eno は解糖系酵素であることから、Eno ノックダウンによる細胞内の解糖系異常により染色体構造の異常が惹起される可能性が考えられた。そこで、Eno 以外の解糖系に必須とされる 2 種類の酵素遺伝子のノックダウンによる多糸染色体構造への影響を検討した。その結果、一連の解糖系反応の中で Eno の一段階前で作用する Phosphogluconate mutase (PGM) と一段階後で作用する Pyruvate kinase(PYK)のノックダウンでは、染色体構造は正常であった。また、培養細胞を用いた実験により、Eno のノックダウンでは EcR 標的遺伝子の発現が低下したが、PGM と PYK のノックダウンでは影響を及ぼさなかった。さらに、Eno の脱水素活性が減弱する点変異体においても EcR の転写促進能を示した。これらのことから、Eno の機能は、従来の解糖系とは異なる新たな機能を有し、クロマチン構造調節に作用することが予測された。

次に、Eno と osa の相互関係を検討するため、培養細胞でダブルノックダウンを行ったところ、相乗的に EcR の転写活性化が減弱したことから、Eno と osa は EcR の転写活性化に協調的に作用することが示唆された。そこで、Eno と osa のクロマチン上での作用機序を明確にするため、クロマチン免疫沈降 (ChIP) アッセイを行った。その結果、EcR と共に osa と Eno は EcRE 配列上にリクルートされたが、Eno のノックダウンにより、EcR と osa のリクルートが阻害されることが明らかとなった。以上の結果より、Eno は解糖系の機能とは別に、EcR と osa のような転写制御因子やクロマチンリモデリング因子を標的遺伝子上にリクルートする機能を有することが示唆された。

### 第四章 Enolase と ATP 依存性クロマチン関連因子との相互作用

Eno は osa と相互作用することからクロマチンリモデリング複合体を形成する可能性が考えられた。そこで、Eno が ATPase 依存性クロマチンリモデリングに関与するかを検討するために、Eno の免疫沈降産物を用い ATPase 活性の有無を検討した。Eno を強制発現させた培養細胞の核抽出液を用いて免疫沈降を行い ATPase アッセイを測定した結果、顕著な ATPase 活性が検出された。さらに、osa ノックダウン時にその ATPase 活性が減弱したことから、Eno は osa 依存的に ATPase 活性をもつ因子と相互作用する可能性が示唆された。

次に、Eno が特定のクロマチン領域にリクルートされる分子機構を以下二つの可能性を仮定し、解析を試みた。第一に、Eno とコアヒストンと相互作用である。免疫沈降の結果、Eno はヒストン H3 のみと顕著に結合することを見出した。第二に、Eno を遺伝子上に結合誘導する未知因子の存在である。GST 融合 Eno を用いた GST 精製により、Eno の相互

作用因子の同定を試みた。その結果、7種の候補因子を同定し、DNA結合性を有する機能未知因子が多く含まれていることを見出した。

## 第五章 総合討論

本研究では、新たなクロマチン構造変換機構解明の一環として、クロマチンリモデリング複合体を選択的クロマチン領域にリクルートする未知アダプター因子を想定し、エクダインパフ局在化因子のスクリーニングを試み、Eno および osa を候補因子として取得することに成功した。脱水素酵素活性を有し解糖系で機能する Eno は、その活性に依存せずユークロマチン上に局在し、EcR の転写活性化に伴うクロマチン構造調節に必須であることが判明した。

Eno は osa と相互作用し osa 依存的な AIPase 活性を有することから、osa を含む ATP 依存性クロマチンリモデリング複合体と相互作用することが示唆された。osa は Brm(Brahma)複合体の構成因子であり、Brn 複合体はヌクレオソームを移動させる上で特異的な DNA 配列を認識する必要がある。osa は ARID ドメインを有し *in vitro* において非特異的 DNA 配列を認識することが知られている。そのため、Brm 複合体が特異的 DNA 配列に結合するためには転写制御因子もしくは未知アダプター因子の存在が考えられてきたがその分子機構は不明であった。構造・機能が高く保存されている Eno ヒトホモログ hEno では、ヒト子宮頸癌由来 HeLa 細胞において c-Myc のプロモータに直接結合することで、C-Myc の転写を調節することが知られている。このことから、Eno には特異的領域の DNA 結合能を持つ可能性が考えられる。また、Eno の相互作用因子群のタンパク精製により、DNA 結合性因子を複数見出しており、Eno が直接または DNA 結合因子を介してクロマチンリモデリング複合体を呼び込むアダプター因子として機能する分子機構の存在が考えられた。

今後、Eno 複合体構成因子群の詳細な機能解析を行うことにより、クロマチンリモデリング因子群の特異的クロマチン構造領域の選択性の分子機構、および解糖系のエネルギー代謝との相互関係が明確になるものと期待される。

### 1) (参考文献)

Shun Sawatsubashi, Takuya Murata, Jinseon Lim, Ryoji Fujiki, Saya Ito, Eriko Suzuki, Masahiko Tanabe, Yue Zhao, 1Shuhei Kimura, Sally Fujiyama, Takashi Ueda, Daiki Umetsu, Takashi Ito, Ken-ichi Takeyama, and Shigeaki Kato, *Genes Dev.* 24, 159-170 (2010)