

氏名	石田 真由美
学位の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	甲理第143号(文部科学省への報告番号甲第437号)
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位授与年月日	2012年7月18日
学位論文題目	RNAi機構を介したヘテロクロマチン構造形成における分裂酵母Chp1の機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 西脇 清二 (副査) 教授 大谷 清 教授 田中 克典 中山 潤一(名古屋市立大学大学院准教授)

論文内容の要旨

ヘテロクロマチンとは、真核細胞の染色体に存在する高度に凝縮したクロマチン構造である。この構造は、セントロメアやテロメアなど染色体機能に重要なドメインの形成だけでなく、エピジェネティックな遺伝子発現制御にも重要な役割を担っており、この構造の分子レベルの解明は、発生・分化など複雑な生命現象の理解につながると考えられる。ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化 (H3K9me) はヘテロクロマチンを特徴づける最も重要なマークであり、クロモドメインと呼ばれる進化的に保存されたドメインを有するタンパク質がこのメチル化を認識して結合することで、高次のクロマチン構造が形成されている。一方、分裂酵母をモデルとした研究から、二本鎖 RNA を介した RNA サイレncing 機構 (RNAi 機構) がこのヘテロクロマチン形成に重要な役割を果たしていることが明らかにされている。分裂酵母のクロモドメインタンパク質の一つである Chp1 は、Ago1、Tas3 とともに RNA-induced transcriptional silencing (RITS) と呼ばれる複合体を形成し、この RNAi 機構で中心的な役割を果たしている。特に、Chp1 のクロモドメイン (Chp1-CD) を介した H3K9me への結合が、RITS 複合体をヘテロクロマチン領域へリクルートするのに重要と想定されている。しかし、他のクロモドメインタンパク質との間でどのように H3K9me を共有し、独自の機能を果たしているのかは明らかにされていなかった。本研究では、Chp1 の機能解析を通じて RNAi 機構を介したヘテロクロマチン形成の分子機構解明を目指し研究を行った。

まず Chp1 が RNA に結合しうる RRM ドメインを有することから、Chp1 の持つ RNA 結合能について検討した。その結果、まず全長の Chp1 タンパク質がヘテロクロマチン領域に相当する一本鎖 RNA に結合することを見出した。さらに、Chp1 の部分断片を含む GST 融合タンパク質を用いて RNA 結合に関与する領域を同定したところ、中央の RNA 認識モチーフ (RRM) だけでなく、Chp1-CD も RNA 結合能を有することが分かった。これまでクロモドメインが RNA に結合するという報告はあるが、メチル化ヒストンへの結合とどのように関わるのかほとんど明らかにされていない。そこで Chp1-CD の RNA 結合能についてより詳細に調べた。変異を導入した Chp1-CD の解析から、38 番目のアスパラギン (N38) と 49 番目のトリプトファン (W49)、50 番目のチロシン (Y50) が RNA 結合に関与することが明らかになった。これらの残基の変異では、Chp1-CD の H3K9me 結合はほとんど変化しないことから、Chp1-CD は RNA と H3K9me の両方を別々に認識し結合することが示唆された。実際に RNA と H3K9me に同時に結合出来るか調べたところ、

H3K9me への結合によって Chp1-CD の RNA 結合のアフィニティーが約10倍近くも強くなること、さらに意外なことに DNA 結合能も獲得することが明らかになった。Chp1-CD がどのように H3K9me と RNA/DNA に結合しているのか、NMR によって解析したところ、Chp1-CD の C-末端に存在する α ヘリックス上の塩基性アミノ酸残基のストレッチ (K71-K75) が、H3K9me の結合によって誘導された RNA/DNA 結合に関与していることが明らかになった。

次に、Chp1に見出された核酸結合能の *in vivo* での重要性を確かめるため、野生型 *chp1*⁺ 遺伝子を、変異 *chp1* 遺伝子に置き換えた株を作製し、セントロメアに挿入された *ura4*⁺ マーカー遺伝子のサイレンシング状態を調べた。その結果、まず H3K9me に結合出来ない変異 Chp1を発現する酵母株では、野生株に比べて明らかにサイレンシングの異常が観察されるが、完全欠損株に比べて一部サイレンシング機能を残している事が分かった。そこで H3K9me と核酸の両方に結合出来ない変異 Chp1を発現させたところ、さらに強いサイレンシング異常を示すことが分かった。また、H3K9me への結合により誘導される核酸結合能を欠損させた株でもサイレンシング異常が確認された。以上の結果から、Chp1-CD の H3K9me と RNA/DNA の両方の結合が Chp1のサイレンシング機能に重要であることが明らかになった。また、RRM 単独の欠損では顕著なサイレンシング異常は見られなかったが、CD と RRM の両方を欠損させた株では加算的なサイレンシング異常が確認された。このことから、CD と RRM は Chp1の機能において協調的に働いていることが強く示唆された。

上記の結果より、Chp1が少なくとも2つのドメインを介して RNA と結合すること、また Chp1-CD の核酸結合は H3K9me 結合と密接に結びついていることが明らかになった。このような核酸結合能は、他のクロモドメインタンパク質 (Chp2、Swi6、Clr4) には見られない Chp1-CD の特徴であり、RITS リクルートの際に働く Chp1独自の機能と関連していると考えられる。実際に *in vivo* の解析より、Chp1の機能には Chp1-CD の H3K9me 結合と核酸結合の両方が必要であることが示された。興味深いことに、ヒストンメチル化酵素 Clr4 の CD も、H3K9me の結合によって RNA/DNA へ結合する能力を持ち、*in vivo* での Clr4の機能に関与していることが確認された。本研究により、クロモドメインの核酸結合能の有無が、それぞれのクロモドメインタンパク質の機能の特徴付ける重要な要因となっていることが強く示唆された。

論文審査結果の要旨

本論文は、分裂酵母のヘテロクロマチン形成において中心的な役割を果たす Chp1に着目し、そのクロモドメインの有する核酸結合能の詳細な解析を実施し、実際に RNA/DNA 結合能が Chp1の細胞内の機能に必要であることを種々の実験によって確認しその結果を記載したものである。

筆者はまずリコンビナント Chp1タンパク質と *in vitro* 転写で調製した RNA を用いた RNA-ゲルシフト法によって、Chp1が一本鎖 RNA に結合すること、またその RNA 結合に配列から想定されていた RNA 認識モチーフ (RRM) だけでなく、メチル化ヒストン (H3K9me) の結合に関与すると考えられていたクロモドメイン (CD) も関与している事を突き止めた。さらに変異 Chp1-CD を用いた詳細な解析から、RNA 結合に関わる残基を同定するとともに、その残基が H3K9me への結合に必要な残基と異なることを明らかにした。

次に筆者は、Chp1-CD が RNA と H3K9me の両方に同時に結合出来るか RNA ゲルシフトアッセイに H3K9me ペプチドを添加して検証した。そして、実際に両者に結合出来ることを見出しただけでなく、H3K9me への結合によって Chp1-CD の RNA 結合能が強くなること、さらに二本鎖 DNA への結合も誘導されることを発見した。さらに NMR による構造解析によって、Chp1-CD の C 末端側の塩基性残基のストレッチがこの H3K9me への結合によって誘導される核酸結合能に関与している事を明らかにした。

実際に Chp1-CD の核酸結合能が Chp1 の細胞内の機能に重要かどうか、分裂酵母内で種々の変異 Chp1 を発現させ、サイレンシングへの影響を調べることで検証した。そして、Chp1-CD の核酸結合能が Chp1 のサイレンシング機能に必須であること、また、Chp1 のクロマチン結合に H3K9me と RNA/DNA への結合の両方が必要である事を実証した。さらに Chp1-CD と RRM が Chp1 のサイレンシング機能に協調的に寄与している事を明らかにした。

最後に、ヘテロクロマチン化に関わる他のクロモドメインタンパク質について、その核酸結合能と機能の関連を試みた。そして、ヒストンメチル化酵素 Clr4 のクロモドメインが、Chp1-CD と同様に H3K9me の結合によって RNA/DNA 結合能を示すこと、さらにこの性質が Clr4 の細胞内での機能に必要なことを証明した。またドメインスワッピング実験によって、RNA/DNA 結合能の有無がクロモドメインの機能分担に関わっていることを証明した。

これまで異なるクロモドメインタンパク質がどのように H3K9me を認識し個別の機能を果たしているのか明らかにされていなかった。本研究結果は、クロモドメインの個別機能に核酸結合能が関与している事を明らかにした点で高く評価できる。本論文の研究結果は国際学術誌に発表され、他に 2 報の副論文を発表している。筆者は審査会および公聴会において研究内容を的確に表現する能力を持つとともに、質疑を通して研究分野について幅広く深い知識を持つことが確認された。

以上により審査委員会は本論文の著者が博士（理学）の学位を受けるに十分な資格を持つと判定する。