

# 研究報告書

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

研究者氏名: 石井 浩二郎

(研究期間: 平成 14 年 11 月 1 日 ~ 平成 18 年 3 月 31 日)

# 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

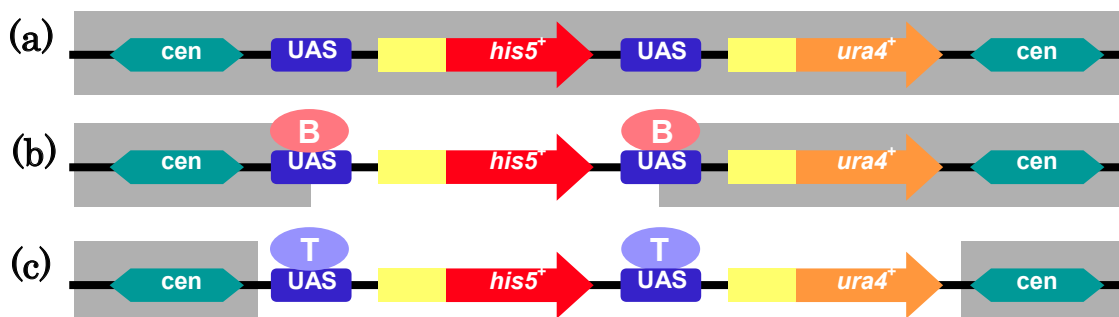
## 研究のねらい

染色体ゲノムからの遺伝子の発現制御は、主に遺伝子 DNA の染色体における折り畳みの程度を調節するクロマチン構造の変換によって体现される。従って、様々な発現形態の遺伝子が連なって保持される各染色体は、その全長に沿って異なる性質のクロマチン構造領域が混在するものとなる。しかしながら各領域での遺伝子発現レベルを決定づけるそれらのクロマチン構造は、それぞれ近傍 DNA に自律的に伝播していく特性を有するため、重要な遺伝子が近接している領域などではそれぞれの制御が相互干渉する可能性が想定される。そのような遺伝子の発現に基づいてダイナミックな細胞プログラムを緻密かつ正確に発動させるためには、特定の染色体部位でクロマチン構造変換効果を遮断し、境界のあいまいさを排除するような絶対的隔壁の存在が不可欠となる。そのようなクロマチン構造の隔壁として働くと考えられるのが「バウンダリーエレメント」である。バウンダリーエレメントの研究は世界各地で精力的に行われているが、その分子的本質の解明は遅々として進んでいない。本研究では、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が、特にヘテロクロマチン構造を遮断する仕組みの解明をめざして、分裂酵母を実験材料に解析を行った。

## 研究成果

### 1) 背景

本研究では、高等生物ヘテロクロマチンのモデル生物として最適な分裂酵母を用いて、以下の原理に基づくバウンダリーエレメントのアッセイコンストラクトをその染色体上に *in vivo* で樹立することを前提とした。



コンストラクト両端にはセントロメア部分配列 (cen) がヘテロクロマチン源として配置され、その間に同一プロモーター制御下の2つのマーカー遺伝子 (*his5<sup>+</sup>*、*ura4<sup>-</sup>*) と Gal4 結合 DNA 配列 (UAS) が交互に配置される。このコンストラクト単独では、両端の cen から連鎖的に形成されるヘテロクロマチン (灰色) により *his5<sup>+</sup>* と *ura4<sup>-</sup>* の共抑制が起きる (図 a)。しかし両 UAS 部位に Gal4p 融合でバウンダリー活性をもつ蛋白質 (B) がもたらされると、両側に由来する連鎖的ヘテロクロマチン形成はその地点で遮断され、*ura4<sup>-</sup>* の転写抑制は維持されるが二つの UAS に挟まれた *his5<sup>+</sup>* の転写抑制は解消される (図 b)。そのような栄養要求性を示す細胞のみの選択的な増殖を許容する培養条件の設定が可能である。近年、転写活性化効果によるヘテロクロマチンの遮断能が指摘されているが、そのような活性を持ち合わせた転写関連因子 (T) が UAS にもたらされた場合 (図 c)、同一プロモーターで制御された *his5<sup>+</sup>*、*ura4<sup>-</sup>* 両遺伝子は共に活性化が起き、その栄養要求性によって中立的なヘテロクロマチン遮断因子との明確な区別化が行える。これらの特徴は、本アッセイがバウンダリー活性をもつ蛋白質のみを厳密かつ明確に検出できる高い可能性を指し示している。

## 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

上述のアッセイ系を分裂酵母で確立するために、まずは十分なヘテロクロマチン生成能を有するサイレンサー配列の分裂酵母セントロメア DNA からの抽出を試みた。これまでそのような配列に関する知見は分裂酵母ではほとんど得られていなかった。そもそもヘテロクロマチンの拡大は、そこで特徴的に見られるヒストン修飾が、その修飾酵素を含む修飾認識蛋白質複合体の特異的な結合を通じて、さらに近傍のヌクレオソームに DNA 配列非特異的に伝播することが基本要素と考えられ、分裂酵母はそれがよく保存されたモデル系であった。しかし分裂酵母が端緒となって、さらに siRNA のヘテロクロマチン形成への関与が近年指摘されている。すなわち、ヘテロクロマチンを形成する反復 DNA 配列から RNA が転写されており、その産物が RNAi 機構によって siRNA に処理されて遺伝子抑制エフェクター装置に取り込まれることがヘテロクロマチン形成には必要とされた。本研究で同定したサイレンサー配列は、解析の結果セントロメアで siRNA を産出している領域に等しいことが判明した。ヘテロクロマチンが siRNA 配列依存的に染色体上を能動的に伝播する可能性を検証するため、次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、分裂酵母セントロメアの siRNA は SIRE (siRNA regulatory element) を含む特異的な転写産物を基質として生成されており、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 の配列自身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重要な役割を果たすが、そのクロマチン領域の境界画定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。興味深いことに、SIRE はセントロメア以外のヘテロクロマチ

ン領域のゲノム配列にも存在し、遺伝子のコード領域に含まれる例も見出された。SIRE は RNAi 機構の引き金となる二本鎖 RNA 形成において機能すると考えられる。

### 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

前項で明らかにした SIRE に関連したサイレンサー配列をヘテロクロマチン源として、バウンダリーエレメント検出アッセイ系を完成させた。機能蛋白質の DNA 標的化システムとしては、当初大腸菌の LexA 蛋白質との融合を用いたが、LexA 蛋白質自体にバックグランド活性がみられ、遺伝的探索への十分な活用が行えなかった。LexA 融合蛋白質ベクターの発現レベルを調整して実験上の対応を試み、得られた中庸な条件下において分裂酵母蛋白質ライブラリを用いた機能バウンダリーエレメント蛋白質探索を敢行した。その結果、イントロンを介するかたちで LexA と融合した *spi1+* 遺伝子が単離された。イントロンを含まない全長 *spi1+* 遺伝子産物の LexA との融合はさらに強いバウンダリー活性を示した。これまで出芽酵母を用いた同様のアッセイ系において、核膜孔複合体の構成因子やその会合因子にヘテロクロマチンのバウンダリーエレメント機能があることが見出されていたが、*spi1+* 遺伝子は核膜孔を通じた核細胞質間の分子輸送で中心的役割を果たす蛋白質 Ran をコードしており、ヘテロクロマチンの分子基盤が異なる分裂酵母においても出芽酵母と同様の機構がバウンダリーエレメントとして機能することが示唆された。さらに、DNA 標的化システムとして Gal4 蛋白質との融合に切り替えた系を作成したところ、LexA で見られていたバックグランド活性は消失し、バウンダリーエレメント活性の特異性に向上が見られた。鋭敏となった系を用いて、*spi1+* 以外の様々な核膜孔会合因子や核膜孔複合体構成因子についてバウンダリーエレメント活性を再検証したところ、LexA の系では判然としていなかった各因子のヘテロクロマチン遮断能力が有意なレベルで検出された。これは、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を強く示唆している。本年になって核膜孔複合体と染色体の相互作用が遺伝子転写の活性化につながっている可能性が報告されているが、そのような効果とバウンダリーエレメント活性との関連について解析を始めている。また、核膜孔以外の核構造要素のバウンダリーエレメントへの関与についても解析が進んでいる。

## 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十分に得られていないが、そのような機構に関連することが予測される因子を単離するツールとして、本研究で開発したアッセイ系は十分に機能を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、有用な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。

## 研究成果リスト

### 論文(原著論文)発表

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

### 特許出願

研究期間累積件数: 2件

発明者: 石井浩二郎

発明の名称: 「小分子 RNA の検出方法および小分子 RNA 検出用試薬」

出願人: 久留米大学、科学技術振興機構

出願日: 平成17年1月20日

出願番号: 特願 2005-013338

発明者: 石井浩二郎、高橋考太

発明の名称: 「RNA 干渉誘導エレメント及びその用途」

出願人: 久留米大学、科学技術振興機構

出願日: 平成17年5月18日

出願番号: 特願 2005-145876

### 総説

1. 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

2. 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
3. 石井浩二郎: 小分子 RNA と染色体制御。 **BIO Clinica** 20: 1077-1082, 2005
4. 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關与する RNA の性質と機能。 **第 23 回 染色体ワークショップ** 広島 (2006)