

2012 年度 博士論文要旨

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

関西学院大学大学院理工学研究科

生命科学専攻 中山研究室（理研 CDB）石田 真由美

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。ヘテロクロマチン領域では、メチル基転移酵素 Clr4/Suv39h によってヒストン H3 の 9 番目のリシンがメチル化 (H3K9me) されており、ヘテロクロマチン形成に重要なクロモドメインタンパク質の特異的な結合サイトとなっている。分裂酵母はヘテロクロマチン構造の研究における優れたモデル生物であり、近年の解析からその構造の形成に RNAi 機構が関与することが明らかにされている。クロモドメインタンパク質 Chp1 は、Ago1、Tas3 とともに RNA-induced transcriptional silencing (RITS) 複合体を形成し、この RITS 複合体が Ago1 の持つ短い siRNA との配列相補性を利用し標的領域に結合することが、RNAi を介したヘテロクロマチン構造形成の中心的機構と考えられている。Chp1 のクロモドメイン (Chp1-CD) は、ヘテロクロマチンの特徴的なマークである H3K9me を認識し、RITS の標的領域への結合に重要な役割を果たすと考えられている。分裂酵母では Chp1 を含め 4 つのクロモドメインタンパク質 (Swi6、Chp1、Chp2、Clr4) がヘテロクロマチンサイレンシングに関与するが、これらがどのように共通の H3K9me を認識し、個々の機能を果たしているかは明らかにされていない。本研究では、これらのクロモドメインタンパク質が果たす独自の機能の解明を目的として、個々のクロモドメインの機能に着目し研究を行った。

まず Chp1-CD の性質について解析した結果、全長の Chp1 タンパク質が、ヘテロクロマチン領域に由来する RNA を含む種々の RNA に結合することを、ゲルシフトアッセイ (EMSA) を用いて見出した。この RNA 結合に必要な Chp1 の領域を同定するため、各部分を GST 融合タンパク質として発現し解析したところ、N-末端側の CD と中央領域の RNA 認識モチーフ (RRM) が RNA 結合能を持つことが分かった。Chp1-CD の RNA 結合能についてより詳細に調べたところ、38 番目のアスパラギン (N38Y) と 49 番目のトリプトファン (W49)・50 番目のチロシン (Y50) が重要な残基であることが判明した。興味深いことに、これらの残基は、

Chp1-CD の三次元構造では、H3K9me 結合に重要な領域とは β -シートを挟んで反対側に位置していた。RNA 結合能を失った変異型 CD は、野生型 CD と同等の H3K9me 結合能を示すこと、また RNA と結合した野生型 CD が、H3K9me ペプチド添加によってさらにスーパーシフトされることから、Chp1-CD は RNA と H3K9me の両方に別々に結合することが示唆された。興味深いことに、H3K9me ペプチドを添加することによって、Chp1-CD の RNA 結合が促進された。以上より、H3K9me と結合した Chp1-CD には、Chp1-CD 単独時とは別の RNA 結合部位が新たに形成されている可能性が示唆された。NMR 滴定及び EMSA の結果、Chp1-CD の C-末端に存在する α -ヘリックス中の 5 つの塩基性アミノ酸残基 (K71-K75) が、この新たに出現する RNA 結合に関与していることが明らかになった。

次に、Chp1-CD が持つ RNA 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、変異型 *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、H3K9me 結合能欠損株ではサイレンシング機能が一部残存していたが、RNA 結合能も同時に欠損させることで、さらに強いサイレンシング異常を示した。また、H3K9me 結合により誘導される RNA 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ことから、Chp1-CD の H3K9me 結合能と RNA 結合能の両方が *in vivo* のサイレンシング機能に重要であることが示唆された。さらに、RRM 欠損株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 CD 欠損株よりも大き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示唆された。

上記の結果より、Chp1 が複数のドメインを介して RNA と結合するタンパク質であること、またその CD が H3K9me 結合と RNA 結合を同時に行うドメインであることが示された。さらに、Chp1-CD の構造が H3K9me との結合によって変化し、新たな結合部位が出現することで RNA 結合が促進される可能性も示唆された。実際に、Chp1-CD 単独時の RNA 結合は、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。また *in vivo* の解析より、Chp1 の機能には Chp1-CD の H3K9me 結合能と RNA 結合能の両方が必要であることが示された。興味深いことに、単独時に RNA 結合能を持たない Clr4-CD においても、H3K9me 結合時には RNA 結合能を持ち、これが *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 RNA 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を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。