

PRESS RELEASE

2023 年 5 月 26 日
理化学研究所
東京工業大学

柔軟なエピゲノムがクロマチン構造を維持する

ークロマチン構造の頑健性を保つバックアップシステムー

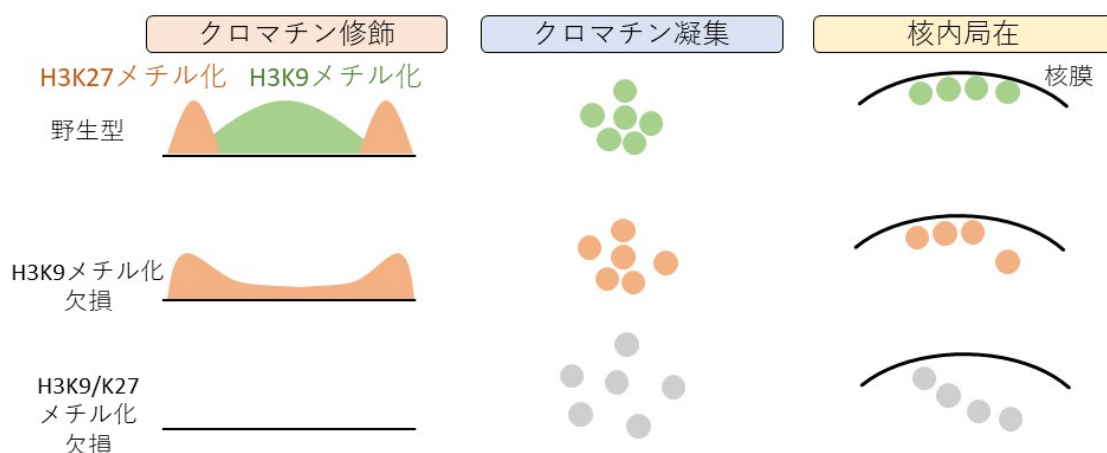
理化学研究所（理研）開拓研究本部眞貝細胞記憶研究室の福田溪客員研究員、志村知古テクニカルスタッフ I、眞貝洋一主任研究員、東京工業大学科学技術創成研究院細胞制御工学研究センターの志見剛特任准教授、木村宏教授らの共同研究グループは、高次クロマチン^[1]構造の形成における抑制性クロマチン修飾^[2]の意義を多面的に明らかにしました。

本研究成果は、老化に伴う細胞機能の低下・不全にヘテロクロマチン^[1]状態の変化が重要な役割を果たすとされる機構を理解する上で重要な知見です。

多細胞真核生物のゲノム情報は、転写活性化状態にあるユークロマチン^[1]と転写抑制状態にあるヘテロクロマチンに分かれて核内に格納されています。体細胞におけるヘテロクロマチンの大部分は、ヒストン^[1]H3 の 9 番目のリジン（H3K9）のメチル化（特にトリメチル化）により覆われています。

今回、共同研究グループは H3K9 メチル化を完全に欠損したマウス繊維芽細胞の確立に成功しました。H3K9 メチル化を欠損するとエピゲノム^[3]状態がダイナミックに変化し、別の抑制性クロマチン修飾であるヒストン H3 の 27 番目のリジン（H3K27）トリメチル化がヘテロクロマチンを覆い、ヘテロクロマチンの核内局在、凝集、転写抑制など、ヘテロクロマチン形成における H3K9 メチル化の機能を代替することで、ヘテロクロマチンを維持することが分かりました。

本研究は、科学雑誌『*Nucleic Acids Research*』オンライン版（5 月 13 日付）に掲載されました。



抑制性クロマチン修飾の欠損によるヘテロクロマチン構造の変化

背景

転写不活性で凝集したクロマチン構造であるヘテロクロマチンは約 100 年前に発見されました。近年のエピゲノム解析や高次クロマチン構造の解析技術の発展により、ヘテロクロマチンは核膜^[4]の近くに局在し、転写活性状態にあるユークロマチンから隔離されていることが明らかになってきました。ヘテロクロマチンは転写制御、ゲノム安定性、ゲノム複製などさまざまな核内現象に関わる重要な構造ですが、その形成機構の全貌はまだ明らかではありません。

ヘテロクロマチンの大部分は抑制性クロマチン修飾であるヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9) メチル化 (特にトリメチル化) により覆われており、H3K9 メチル化に結合するタンパク質 HP1 がクロマチンを凝縮させるため、H3K9 メチル化がヘテロクロマチン形成に重要な働きを担っていると推測されていました。しかし、哺乳類において H3K9 メチル化酵素は 5 種類存在しており、それぞれが冗長的に機能するため、ヘテロクロマチン形成における H3K9 メチル化の役割を調べるのは困難でした。

本研究では、5 種類の H3K9 メチル化酵素を全て欠損した細胞株を確立し、ヘテロクロマチン形成における H3K9 メチル化の重要性を検証することを目指しました。

研究手法と成果

哺乳類は、SETDB1、SUV39H1、SUV39H2、EHMT1、EHMT2 の 5 種類の H3K9 メチル化酵素を持っています。福田客員研究員らは過去に、*Setdb1*、*Suv39h1*、*Suv39h2* の三つの遺伝子を欠損したマウス由来不死化線維芽細胞 (3 knockouts immortalized mouse embryonic fibroblasts : 3KO iMEFs) を樹立していました^{注 1)}。

今回、共同研究グループは CRISPR-Cas9 システム^[5]を用いることで、3KO iMEFs からさらに *Ehmt1* と *Ehmt2* を欠損した 5KO iMEFs を作製することに成功しました。5KO iMEFs では完全に H3K9 メチル化が消失していましたが、細胞増殖能が維持されていたため、H3K9 メチル化のない状態がクロマチン構造に与える影響を多面的に解析することが可能でした。

ヘテロクロマチンは、電子顕微鏡により電子密度の高い領域として確認することができます。5KO iMEFs のヘテロクロマチン状態を電子顕微鏡で解析すると、H3K9 メチル化がないにもかかわらず、ヘテロクロマチンは維持されていました (図 1 右上)。5KO iMEFs におけるエピゲノムを解析すると、別の抑制性クロマチン修飾であるヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) トリメチル化が、ヘテロクロマチン全域を覆うように広がることが分かりました。H3K27 トリメチル化は EZH1、EZH2 という 2 種類の酵素で触媒されています。ヘテロクロマチン構造における H3K27 トリメチル化の機能を調べるために、EZH1 と EZH2 の酵素活性阻害剤である DS3201 を野生型と 5KO iMEFs に投与し、ヘテロクロマチン状態を解析しました。その結果、5KO iMEFs に DS3201 を投与したサンプルでのみ、ヘテロクロマチンの消失が観察されました (図 1 右下)。

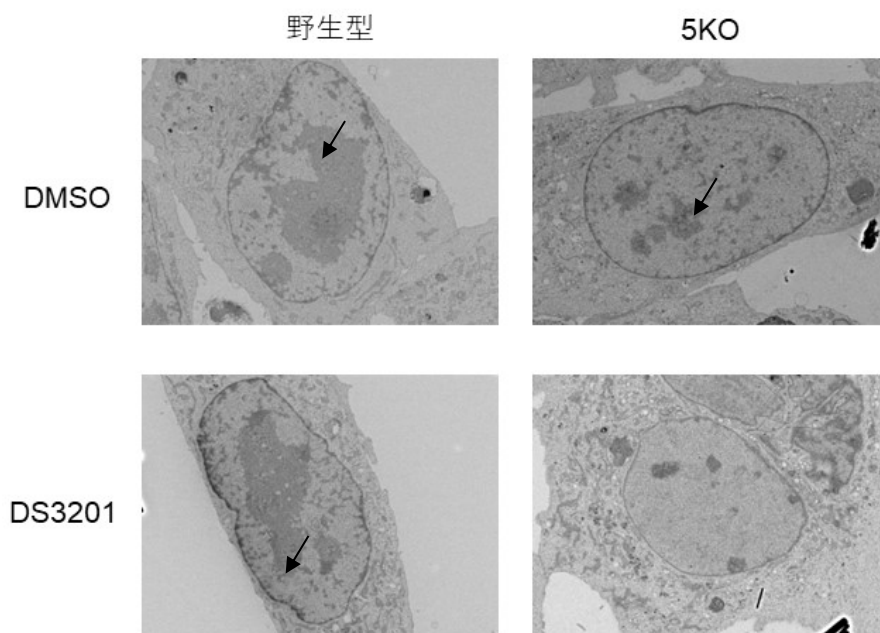


図1 H3K9 メチル化と H3K27 トリメチル化の欠損によるヘテロクロマチンの消失

野生型細胞に EZH1/EZH2 阻害剤 DS3201 を投与しても、矢印で示されるヘテロクロマチンは維持されているが（左下）、5KO 細胞に DS3201 を投与すると、一部の細胞でヘテロクロマチンの消失が観察される（右下）。DMSO（ジメチルスルホキシド）は溶媒コントロールとして用いている。

次に、Hi-C 法^[6]とラミン ChIP-seq 法^[7]により、ゲノム配列レベルでヘテロクロマチンの構造と核内局在を解析しました。すると、電子顕微鏡の結果と一致して、ヘテロクロマチン同士の近接度合いや核膜近くへの局在は、H3K9 メチル化と H3K27 トリメチル化の双方を欠損して初めて大きな変動が観察されました（図2下段）。以上の結果から、H3K9 メチル化がなくなると H3K27 トリメチル化がその分布をダイナミックに変化させ、ヘテロクロマチンの核内局在、凝集、転写抑制など H3K9 メチル化の機能を代替し、ヘテロクロマチンを頑健に維持していることが明らかになりました。

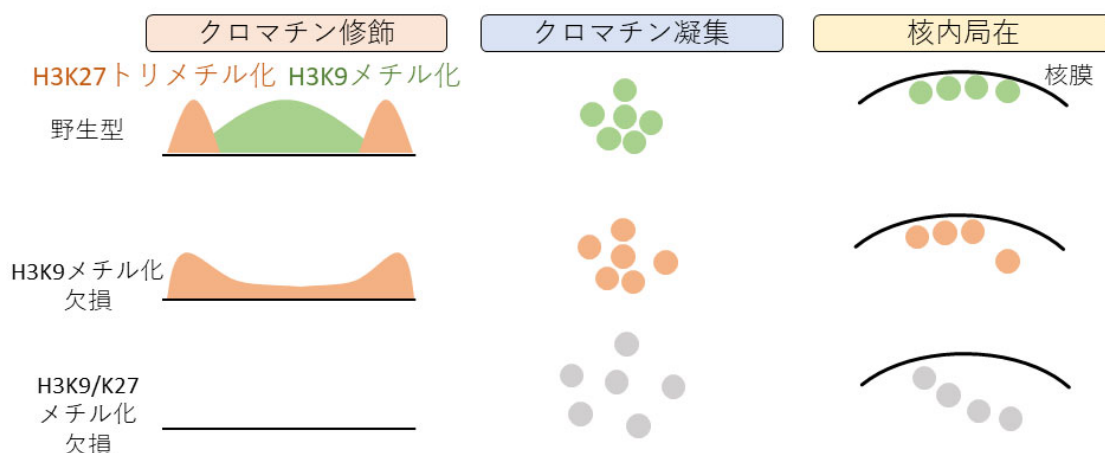


図2 H3K9メチル化、H3K27トリメチル化の欠損による核内クロマチン構造の変化

上段) 野生型では、核内のヘテロクロマチンはH3K9メチル化とH3K27トリメチル化に覆われており、クロマチン同士は近接し、核膜周辺に存在する。
 中段) 核内ヘテロクロマチンのH3K9メチル化を欠損させると、残ったH3K27トリメチル化の分布は変化するが、クロマチン同士の近接や核内局在は野生型と比べてあまり変化しない。
 下段) H3K9メチル化とH3K27トリメチル化の双方を欠損すると、ヘテロクロマチン同士の近接が減少するとともに、核膜周辺からヘテロクロマチンが離れる。しかし、この状態でもヘテロクロマチン構造を維持するゲノム領域もあり、H3K9メチル化およびH3K27トリメチル化非依存的なヘテロクロマチン維持機構の存在が示唆される。

注1) Fukuda et al, *Commun Biol.* 2021 May 13;4(1):571. doi: 10.1038/s42003-021-02089-y.

今後の期待

本研究では、H3K9メチル化を完全に欠損した細胞を確立し、H3K9メチル化とH3K27トリメチル化を欠損した細胞の状態を解析することに初めて成功しました。H3K9メチル化の欠損によるエピゲノムの変化は、生殖細胞、初期発生、老化など生体内でも生じることが知られています。

また、H3K9メチル化とH3K27トリメチル化の双方が欠損しても、一部の細胞ではヘテロクロマチンが維持されていたことから、未知のヘテロクロマチン維持機構が存在すると考えられます。

今回作製した5KO iMEFsは、動的なエピゲノムの形成基盤やヘテロクロマチンを維持するバックアップ機構の全貌の解明に有用なツールとして期待できます。

論文情報

<タイトル>

Epigenetic plasticity safeguards heterochromatin configuration in mammals

<著者名>

Kei Fukuda, Takeshi Shimi, Chikako Shimura, Takao Ono, Takehiro Suzuki, Kenta Onoue, Satoko Okayama, Hisashi Miura, Ichiro Hiratani, Kazuho Ikeda, Yasushi

Okada, Naoshi Dohmae, Shigenobu Yonemura, Azusa Inoue, Hiroshi Kimura, Yoichi Shinkai

<雑誌>

Nucleic Acid Research

<DOI>

[10.1093/nar/gkad387](https://doi.org/10.1093/nar/gkad387)

補足説明

[1] クロマチン、ヘテロクロマチン、ユークロマチン、ヒストン

ヒストンは H1、H2A、H2B、H3、H4 の 5 種類からなるタンパク質で、DNA を巻き付かせて核内に高密度にパッキングさせる役割を担っている。ヒストン H2A、H2B、H3、H4 の 4 種類 8 個のヒストンの周囲を 147 塩基対の DNA が巻き付いたヌクレオソームを基本単位として、複雑な高次構造を形成したものをクロマチンと呼ぶ。クロマチンは、凝縮したヘテロクロマチン領域と弛緩したユークロマチン領域に分かれており、ヘテロクロマチン領域では遺伝子の転写活性が低いことが知られている。ヒストンはさまざまな化学修飾を受けることで、遺伝子発現制御やクロマチンの高次構造の形成に関わる。

[2] 抑制性クロマチン修飾

転写の抑制と関連するクロマチン修飾の総称。代表的なものとして、H3K9 メチル化や H3K27 トリメチル化が挙げられる。

[3] エピゲノム

ゲノム DNA や DNA が巻き付いているヒストンタンパク質に見られる化学修飾の総体。エピゲノムの異常は、がんをはじめとするさまざまな疾患を引き起こすことが知られている。

[4] 核膜

真核細胞の核を取り囲む二重膜構造。核膜の主な役割は、核内の DNA を細胞質から隔離することで、DNA の保護や核内の生化学的プロセスの制御を行う。核膜の裏打ち構造を核ラミンと呼び、その主成分であるラミンはクロマチンと相互作用することで、転写や高次クロマチン構造を制御する。

[5] CRISPR-Cas9 システム

バクテリアの免疫機構から発見された高効率な遺伝子編集技術。標的とするゲノム領域に塩基置換、挿入、欠損などさまざまなゲノム変異を導入できる。

[6] Hi-C 法

染色体立体配座捕捉法とも呼ばれる。染色体の立体構造を解析するための手法の一つで、染色体上に存在する膨大な DNA 塩基配列データを、その物理的な位置関係に基づいて解析することで、染色体の立体構造を再構成できる。Hi-C は high-throughput chromosome conformation capture の略。

[7] ラミン ChIP-seq 法

核ラミナ（核膜の裏打ち構造）の主成分であるラミンに対する抗体を用いて、クロマチン免疫沈降を行い、得られた DNA を次世代シーケンサーで解析することで、核膜と相互作用するゲノム領域を同定する技術。

共同研究グループ

理化学研究所

開拓研究本部

眞貝細胞記憶研究室

主任研究員	眞貝 洋一	（シンカイ・ヨウイチ）
客員研究員	福田 湊	（フクダ・ケイ）
テクニカルスタッフ I	志村 知古	（シムラ・チカコ）

平野染色体ダイナミクス研究室

専任研究員	小野 教夫	（オノ・タカオ）
-------	-------	----------

環境資源科学研究センター 生命分子解析ユニット

ユニットリーダー	堂前 直	（ドウマエ・ナオシ）
専任技師	鈴木 健裕	（スズキ・タケヒロ）

生命機能科学研究センター

超微形態研究チーム

チームリーダー	米村 重信	（ヨネムラ・シゲノブ）
テクニカルスタッフ I	尾上 健太	（オノウエ・ケンタ）
テクニカルスタッフ I	岡山 聡子	（オカヤマ・サトコ）

発生エピジェネティクスチーム

チームリーダー	平谷 伊智朗	（ヒラタニ・イチロウ）
上級研究員	三浦 尚	（ミウラ・ヒサシ）

生命医科学研究センター 疾患エピゲノム遺伝研究チーム

チームリーダー	井上 梓	（イノウエ・アズサ）
---------	------	------------

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター

教授	木村 宏	（キムラ・ヒロシ）
特任准教授	志見 剛	（シミ・タケシ）

東京大学大学院 医学研究科

教授	岡田 康志	（オカダ・ヤスシ）
講師	池田 一穂	（イケダ・カズホ）

研究支援

本研究は、理研新領域開拓課題「ゲノム構築原理の理解に向けて」、日本学術振興会（JSPS）科学研究費助成事業新学術領域研究「細胞分化にともなうクロマチンポテンシャルの変化とその分子基盤（研究代表者：眞貝洋一、18H05530）」「細胞核・クロマチン構造のダイナミクスと遺伝子制御（研究代表者：木村宏、18H05527）」、同基盤研究（A）「ヒストン H3K9 メチル化修飾による転写抑制の包括的理解（研究代表者：眞貝洋一、18H03991）」「ヘテロクロマチン形成・維持の分子機構の解明（研究代表者：眞貝洋一、22H00413）」「ヘテロクロマチンに特徴的なヒストン修飾の排他性の意義とメカニズム（研究代表者：木村宏、21H04764）」、同基盤研究（C）「核ラミナが核膜孔複合体の構築を制御する分子メカニズムの解明（研究代表者：志見剛、20K06617）」による助成を受けて行われました。

発表者・機関窓口

＜発表者＞ ※研究内容については発表者にお問い合わせください。

理化学研究所 開拓研究本部 眞貝細胞記憶研究室

主任研究員 眞貝洋一 (シンカイ・ヨウイチ)

客員研究員 福田 溪 (フクダ・ケイ)

テクニカルスタッフⅠ 志村知古 (シムラ・チカコ)

東京工業大学 科学技術創成研究院 細胞制御工学研究センター

教授 木村 宏 (キムラ・ヒロシ)

特任准教授 志見 剛 (シミ・タケシ)

＜機関窓口＞

理化学研究所 広報室 報道担当

Tel: 050-3495-0247

Email: ex-press [at] ml.riken.jp

東京工業大学 総務部 広報課

Tel: 03-5734-2975

Email: media [at] jim.titech.ac.jp

※上記の[at]は@に置き換えてください。