



## Nagoya City University Academic Repository

学位の種類	博士（理学）
報告番号	乙第1881号
学位記番号	論 第12号
氏 名	川口 隆之
授与年月日	平成 29 年 7 月 27 日
学位論文の題名	ヒストンメチル化修飾によるエピジェネティック制御機構の解明 Elucidating the mechanisms underlying epigenetic gene regulation mediated by histone methylation
論文審査担当者	主査： 田上英明 副査： 奥津光晴，中山潤一，大隅圭太

## 学 位 論 文 内 容 要 旨 （1／2）

氏 名	川口隆之	提出年月日	平成 29 年 6 月 2 日
主論文名	ヒストンメチル化修飾によるエピジェネティック制御機構の解明		
<p>近年、DNA の一次配列だけでは説明できない遺伝子の発現制御機構であるエピジェネティクスという現象が注目されている。エピジェネティックな現象では、DNA のメチル化、ヒストンの化学修飾、ノンコーディング RNA などとその制御に関与していることが知られている。真核生物の細胞内において、DNA はヒストン H2A、H2B、H3、H4 それぞれ 2 分子から形成される 8 量体と結合しヌクレオソームという基本単位を構築している。このヌクレオソームはさらに非ヒストンタンパク質と共にクロマチンという分子複合体を形成している。クロマチンは、高度に凝縮され遺伝子発現が抑制されたヘテロクロマチンと、構造が弛緩し、遺伝子発現が活発なユークロマチンに大別できる。ヘテロクロマチンはさらに、恒常的に凝縮されている構成的ヘテロクロマチンと、発生段階で形成される条件的ヘテロクロマチンに分けられる。構成的及び条件的ヘテロクロマチンの形成には、それぞれヒストン H3 の 9 番目リジン残基のメチル化 (H3K9me3) と、27 番目のリジン残基のメチル化 (H3K27me3) が重要な役割を果たしている。これらのメチル化されたヒストンは、クロモドメイン (CD) と呼ばれる進化的に良く保存されたドメインを持つタンパク質によって認識され、その結合によって高次クロマチン構造が形成される。このように、クロマチン構造をダイナミックに変化させ、遺伝子発現を制御しているヒストンのメチル化修飾は、エピジェネティック現象を制御する分子機構の代表例だと言える。</p> <p>最近の研究結果から、一部の CD はメチル化ヒストンに加えて核酸への結合能を持ち、この核酸結合がヘテロクロマチン形成における CD タンパク質の機能に重要であることが示唆されている。しかし、核酸結合能がどのように CD の機能と共役しているのか、その分子機構の実体には不明な点が多く残されている。そこで本研究は、哺乳類 CD タンパク質である Suv39h1 と CBX2 に着目し、それぞれの核酸結合能の有無、またヘテロクロマチン形成における核酸結合能の役割を解明することを目的とした。</p> <p>セントロメア近傍領域の構成的ヘテロクロマチンの形成には、H3K9 のメチル化酵素である Suv39h1 が必須である。Suv39h1 の CD が H3K9me3 に結合することは報告されているが、Suv39h1 がどのように標的クロマチン領域を認識するのかなど、Suv39h1 によるヘテロクロマチン形成機構は不明な点が多く残されている。そこで本研究ではまず、Suv39h1 の CD (Suv39h1-CD) の核酸結合能に着目して解析を行った。その結果、Suv39h1-CD が強い核酸結合能を持つこと、さらに二本鎖 DNA に比べて RNA に対して高いアフィニティーで結合することを見出した。また、Suv39h1-CD の変異体による解析から、C 末端側の <math>\alpha</math> ヘリックスの中の塩基性アミノ酸が Suv39h1-CD の核酸結合に関与していることを明らかにした。細胞を用いた解析から、Suv39h1 が実際に CD を介してセントロメア近傍から発現している major satellite RNA と結合することを見出した。さらに細胞内での Suv39h1 の機能解析を行ったところ、RNA 及び H3K9me3 との結合がセントロメア近傍へ</p>			

(システム自然科学研究科)

## 学 位 論 文 内 容 要 旨（2／2）

氏 名	川口隆之	提出年月日	平成 29 年 6 月 2 日
主論文名	ヒストンメチル化修飾によるエピジェネティック制御機構の解明		
<p>の自身のターゲティングおよび特定のクロマチン領域への安定的な結合に重要な役割を果たすことが明らかになった。本研究により Suv39h1 によるヘテロクロマチン形成に、Suv39h1-CD による RNA との結合が重要な役割を果たしていることが強く示唆された。</p> <p>発生段階で形成される条件的ヘテロクロマチンの特徴である H3K27me3 修飾は、CBX ファミリーと呼ばれる CD タンパク質に認識され、この結合が中心的な役割を果たして条件的ヘテロクロマチンが形成される。CBX ファミリーに属する CBX2 は、哺乳類の初期発生や性分化などに関与する遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしている。また、CBX2 はマウスの組織や細胞株でリン酸化されていること、AT フック（ATH）という特徴的な DNA 結合ドメインが CBX2 のクロマチン結合に関与することが報告されているが、それらの機能的な関連については未だ不明な点が多い。本研究では、CBX2 の標的クロマチン部位への結合に核酸結合能と翻訳後修飾がどのように関わるのか、その分子機能の解明を目指した。</p> <p>ヒトの CBX のクロマチン結合の分子メカニズムを解析するために、まず HEK293T 細胞で CBX2 のリン酸化状態を解析した。その結果、CBX2 は細胞内でリン酸化されており、その主なリン酸化部位は ATH 近傍のセリンリッチ（SR）領域であること、そしてリン酸化酵素のカゼインキナーゼ II (CK2) が SR 領域を <i>in vitro</i> でリン酸化できることを見出した。次に CBX2 のリン酸化が H3K27me3 結合に与える影響について解析を遂行したところ、SR 領域のリン酸化が H3K27me3 ペプチド及びヌクレオソームへの結合特異性を高めることが明らかになった。次に CBX2 の核酸結合能を解析したところ、ATH が強い DNA 結合能を有すること、さらに SR 領域のリン酸化によってこの核酸結合能が阻害されることを見出した。これらの結果より、CK2 による SR 領域のリン酸化が CBX2 の H3K27me3 の結合を強め、さらに DNA の結合を阻害することによって H3K27me3 ヌクレオソームへの結合特異性を高めていることが示唆された。次に、CBX2 のリン酸化の細胞内での生理的役割の知見を得るため、CBX2 をノックダウンした HEK293T 細胞に、野生型及びリン酸化部位欠損型 CBX2 を発現させ、CBX2 の標的遺伝子の発現状態を評価する、機能回復（レスキュー）実験を行った。その結果、野生型 CBX2 は標的遺伝子を抑制できるのに対し、リン酸化部位を欠損させた CBX2 は、標的遺伝子の発現を抑制できないことが明らかになった。これらの結果から、CBX2 の SR 領域のリン酸化が標的遺伝子の発現制御に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。</p> <p>CD タンパク質によるメチル化ヒストンの認識はこれまでに多く研究されてきたが、CD タンパク質によるクロマチン結合の分子機構には依然不明な点が多く残されている。今後、本研究のように CD タンパク質の核酸結合や翻訳後修飾を検討することが、ヘテロクロマチン形成の分子機構をさらに理解する上で重要であると考えられる。</p>			

博士論文審査結果の要旨 ㊦

論文提出日	平成 29 年 6 月 16 日
学位試験日	平成 29 年 7 月 7 日

論文提出者	川口隆之			
博 士 論 文 審 査 結 果				
学 位 審 査 委 員	主 査	田上英明	副 査	奥津光晴、中山潤一（基礎生物学研究所）、大隅圭太（名古屋大学）
主論文題目	ヒストンメチル化修飾によるエピジェネティック制御機構の解明			
論文審査の結果の要旨				
<p>本論文は、DNA の一次配列だけでは説明できない遺伝子の発現制御機構であるエピジェネティクスについて、構成的ヘテロクロマチンおよび条件的ヘテロクロマチン形成に関わるクロモドメインタンパク質の核酸結合能、およびリン酸化修飾の役割を明らかにしたものである。</p> <p>ヒストンのメチル化修飾はエピジェネティック制御の代表例であり、構成的及び条件的ヘテロクロマチンの形成には、それぞれヒストン H3 の 9 番目リジン残基のトリメチル化(H3K9me3)と、27 番目リジン残基のトリメチル化(H3K27me3)が重要な役割を果たしている。これらのメチル化されたヒストンは、クロモドメイン(CD)と呼ばれる進化的に良く保存されたドメインを持つタンパク質によって認識され、その結合によって高次クロマチン構造が形成される。</p> <p>セントロメア近傍領域の構成的ヘテロクロマチンの形成には、H3K9 メチル化酵素である Suv39h1 が必須である。Suv39h1 の CD が H3K9me3 に結合することはよく知られている。本研究では、どのようにして標的クロマチンを認識するのか、という点に着目し、Suv39h1 の CD(Suv39h1-CD)の核酸結合について解析を行った。その結果、<i>in vitro</i> において、Suv39h1-CD が強い核酸結合能を持つこと、さらに二本鎖 DNA に比べて RNA に対して高い親和性を持つことを見いだした。細胞内においても、Suv39h1 が実際に CD を介してセントロメア近傍から発現している major satellite RNA と結合することを明らかにした。さらに、RNA 及び H3K9me3 との結合が Suv39h1 のセントロメア近傍領域へのターゲティングおよびヘテロクロマチンとの安定的な結合に大きく関与することを示した。以上の結果より、Suv39h1 による構成的ヘテロクロマチン形成に、Suv39h1-CD による RNA との結合が重要な役割を果たすことを明らかにした。</p> <p>発生段階で形成される条件的ヘテロクロマチンの特徴である H3K27me3 修飾は、CBX ファミリーと呼ばれる CD タンパク質に認識される。本研究では、ヒト CBX2 が HEK293 細胞でリン酸化されており、セリンリッチ(SR)領域が主なリン酸化部位であることを明らかにした。<i>In vitro</i> において、SR 領域のリン酸化が DNA 結合を阻害することで H3K27me3 ヌクレオソームへの結合特異性を高めることを示した。さらに、細胞内において CBX2 の SR 領域のリン酸化が標的遺伝子である <i>p21</i> の発現制御に重要であることを示した。</p> <p>これらの研究結果は、構成的および条件的ヘテロクロマチン形成機構におけるクロモドメインタンパク質の分子機能を核酸結合および翻訳後修飾という面から初めて明らかにしたものであり、博士の学位を授与するにふさわしい内容であると判断する。</p>				