

第1章 エピジェネティクスの制御システム

7. RNA によるクロマチン構造の制御

中山潤一

クロマチン構造は、ヌクレオソームを基本単位とした DNA とタンパク質の複合体であり、真核細胞におけるエピジェネティックな遺伝情報の発現や、その伝播に必須な構造である。このクロマチンの構造変換には、ヒストンの修飾やリモデリング因子の働きが知られるが、最近になってタンパク質をコードしない RNA が、様々な生命現象におけるクロマチンの構造変換に必要であることが明らかになってきた。本稿では特に、高次クロマチン構造として知られるヘテロクロマチンの形成に、RNAi の機構がどのように関与しているのかを中心に、RNA とクロマチン構造変換の関わりを紹介したい。

はじめに

真核細胞のゲノムDNAは裸のまま存在するのではなく、様々なタンパク質との複合体である、クロマチンと呼ばれる構造を形成して存在している。クロマチン構造を変化させることは、エピジェネティックな遺伝子の発現調節に必須であるばかりでなく、染色体の機能ドメインの構築や、ゲノム情報の安定な維持、次世代への伝播にも重要な役割を果たしている。クロマチンの構造変化には、主にヒストンの修飾変化や、その修飾を認識して結合する因子の働きによってもたらされることが解明されている。しかし、近年の解析から、その変化のきっかけに、タンパク質をコードしない RNA の発現が関与することが分かり始めてきた。代表的な例として、哺乳類動物細胞の X 染色体不活性化を制御する Xist RNA の働きや、同じくショウジョウバエの遺伝子量補正に関わる roX RNA の働きなどが知られている。さらに、セントロメア等の構造形成に必須なヘテロクロマチン^{*1} 構造の形成に、二本鎖

RNA によって引き起こされる、RNAi^{*2} と呼ばれる機構が大事な働きをすることも明らかにされてきた。本稿では、特に RNAi とヘテロクロマチン構造の形成機構について、最も研究の進んだ分裂酵母の話題を中心に紹介し、実際に RNA がクロマチン構造を制御する機構について考察したい。前者の遺伝子量補正に関わる RNA の働きとクロマチンの構造変化については、他の優れた総説を参照して頂きたい^{1), 2)}。

1. ヘテロクロマチン構造形成の分子機構

ヘテロクロマチンは、DNA を染める色素で核を染色した場合に顕著に見いだされる構造で、半世紀以上も前に顕微鏡による観察から定義された構造である。ヘテロクロマチンは大きく2種類に大別され、一つは構造的 (constitutive) ヘテロクロマチンと呼ばれ、セントロメアやテロメアなど染色体の機能に必須な領域を構成し、繰り返し配列や転移因子に富むという一次配列上の特徴を有している。他方、不活性化 X 染色体に代表されるよう

[キーワード&略語]

ヒストン、メチル化、クロモドメイン、RNA 干渉、ヘテロクロマチン

RNAi: RNA interference (RNA 干渉)

siRNA: short interference RNA

shRNA: small heterochromatic RNA

RISC: RNA-induced silencing complex

RITS: RNA-induced transcriptional silencing

RDRP: RNA-dependent RNA polymerase complex

RdDM: RNA-dependent DNA methylation

な、本来ユークロマチンとしての特徴を持つ領域が、発生の段階で構造的クロマチンと同様な凝縮構造を取る場合を、選択的 (facultative) ヘテロクロマチンと呼んで区別している。

クロマチンの基本単位として知られるヌクレオソームは、四種類のヒストン (H2A, H2B, H3, H4) を二個ずつ含む八量体がコアを形成し、その周りに DNA が約 1.75 回巻き付いた構造をしている。このヒストンのアミノ末端側のテイル領域には、古くからアセチル化、リン酸化、メチル化、ユビキチン化等の翻訳後修飾が存在することが知られている。概して、ヒストンのアセチル化の有無は転写の活性化状態と良く相関し、ヘテロクロマチン領域は低アセチル化状態にあることが、抗体を用いた解析から明らかにされている。また、近年の解析から、特定の部位のメチル化修飾が、クロマチン構造変化の重要なマークとして働いていることが分かってきた (図1)。例えば遺伝子の活性化領域にはヒストン H3 の K4, K36, K79 のメチル化修飾が存在し、それぞれ転写開始や伸長、また不活性化クロマチン領域の伝播を抑制する働きをする事が明らかにされている。一方、転写が不活性化ヘテロクロマチン領域では、ヒストン H3 の K9, K27, またヒストン H4 の K20 のメチル化修飾が特徴的に存在している。特に H3-K9 のメチル化はヘテロクロマチン構造の最も重要なマークと考えられ、進化的に保存されたヒストンメチル化酵素 SUV39H (分裂酵母では Clr4) の働きによってもたらされ、これらが HP1 (Heterochromatin Protein 1: 分裂酵母の Swi6) と呼ばれる、ヘテロクロマチン構造の維持に重要なタンパク質によって認識されることで、高次のクロマチン構造が形成されることが明らかにされている (図1)³⁾。ヒストンの特異的な修飾を認識するタンパク質やドメインについては、現在でもさまざまな因子の同

定が行われており、特徴的なヒストンの修飾が特定の生物学的意義を規定するという「ヒストンコード仮説」を検証するものと注目されている。

2. RNA とヘテロクロマチン構造形成

1) 分裂酵母のヘテロクロマチン形成と RNAi

分裂酵母は、真核細胞のクロマチンを研究する上で非常に優れたモデル生物として知られている。特にヘテロクロマチン構造に関しては、高等な真核生物と同様に大きな繰り返し配列から構成され、その形成機構についても、ヒトの SUV39H のホモログである Clr4 が H3-K9 をメチル化し、この修飾をヒト HP1 のホモログである Swi6 が結合することで凝集クロマチンが形成されるという、非常に良く保存された形成機構の存在が明らかにされている³⁾ (図1)。ところで、RNA 干渉 (RNAi) という現象は、細胞内に導入された短い二本鎖 RNA によって、それと相補的配列を持つ mRNA が特異的に分解される現象である⁴⁾。興味深いことに、分裂酵母ではそれまでに線虫やショウジョウバエで同定されていた RNA 干渉に関わる因子、Argonaut (Ago1)、Dicer (Dcr1)、RNA-dependent RNA polymerase (Rdp1) と良く似た遺伝子が1セット存在し、これらの遺伝子を遺伝子破壊すると、ヘテロクロマチンの構造に異常が認められるという報告がされた⁴⁾。それまで RNAi 機構は、主として mRNA を分解する転写後の遺伝子発現抑制に関わると考えられていたために、核内のクロマチン構造の形成に関わるという事実は、RNAi 機構が非常に幅広い生命現象に深く関わっていることを再認識させるものであった。実際に RNAi 因子の変異株では、セントロメア由来の両方向の転写産物の蓄積が認められるほか、この領域の H3-K9 メチル化や Swi6 の局在が減少する。この結果より、ヘテロクロマチンから転写された両方向の転写産物が二本鎖 RNA を形成し、これが RNAi 因子の働きを介して、ヘテロクロマチンにメチル化酵素 Clr4 や Swi6 を呼び込むという機構が提唱された (図2)⁴⁾。

2) ヘテロクロマチン化に関わる RNAi 因子

その後の詳細な解析により、Ago1 は Chp1, Tas3 という因子と共に RITS (RNA-induced transcriptional silencing) 複合体を形成し (高等真核生物の RNAi 機構におけるエフェクター複合体 RISC に相当すると考えられている)、これが短い一本鎖 RNA を取り込みヘテロクロマチンのターゲットングに関わる事⁶⁾、またこの RITS 複合体は、Rdp1, Hrr1 (RNA ヘリカーゼ様因子)、Cid12 (ポリ A ポ

※1 ヘテロクロマチン

細胞周期を通じて凝縮した状態を維持する染色体領域。セントロメアやテロメアのように、繰り返し DNA に富み遺伝子発現がほとんどみられない構造的ヘテロクロマチンと、不活性化 X 染色体のように、本来ヘテロクロマチンの性質をもつ領域が発生過程で凝縮した状態に返還される選択的ヘテロクロマチンの2種類に大別される。

※2 RNAi

細胞に導入された二本鎖 RNA によって、相補的な配列を有する mRNA が特異的に分解される現象。もともと線虫で発見され、後にヒトを含む高等真核生物を通じて保存された機構であることが明らかになった。外来遺伝物質に対する防御機構に起因する現象と考えられており、現在遺伝子の機能解析の手法として広く用いられている。

	構造的ヘテロクロマチン (セントロメア)	選択的ヘテロクロマチン (不活性化 X 染色体)	
ヘテロクロマチンの確立	DNA シス配列	反復配列 トランスポゾン	X 不活性化中心
	DNA 結合因子	CENP-B (?)	?
	非翻訳 RNA	shRNA (small heterochromatic RNA)	Xist RNA
ヘテロクロマチンの維持	ヒストンメチル化酵素	SUV39H1/Clr4	Ezh2
	ヒストンの修飾部位	H3-K9	H3-K27 (K9)
	メチル化ヒストン結合タンパク質	HP-1/Swi6	?

図1 構造的ヘテロクロマチンと選択的ヘテロクロマチンの特徴

セントロメアに見られる構造的ヘテロクロマチンは、反復配列やトランスポゾンに富み、SUV39H(分裂酵母では Clr4)がヒストン H3-K9 をメチル化し、それをヘテロクロマチンタンパク質 HP1(分裂酵母では Swi6)が認識して結合することで凝縮クロマチンが形成される。構造的クロマチンの確立の過程には、反復配列からの双方向の転写によって産出される二本差 RNA(shRNA)が必要とされる。一方、不活性化 X 染色体は代表的な選択的クロマチンとして知られ、不活性化の最初の段階に Xist と呼ばれる RNA が働き、その後 Ezh2 によって H3-K27 がメチル化される。この RNA と H3-K27 のメチルがどのように染色体全体の不活性かを導くのか、詳細な機構については明らかにされていない。

リメラーゼ様因子)の三者を含む RDRC 複合体(RNA-directed RNA polymerase complex)と物理的な相互作用をし、この両複合体の働きが siRNA を介したヘテロクロマチン形成に必要である事が解明された⁷⁾。実際に、RITS も RDRC もセントロメアから転写された non-coding RNA 上に局在することが示されており、RNA をプラットフォームにこれらの複合体が相互作用することで、RNAi 因子がヘテロクロマチン領域へ局在できると考えられている。面白いことに、RITS と RDRC の結合も siRNA の産生も、Dcr1 と Clr4 の欠損株では認められない。従って、Dcr1 の働きが全体の RNAi の機能に必須であり、また Clr4 は全ての現象の最上流に位置する因子と考えられる⁷⁾。RNAi 因子による機能が Clr4 に依存するという結果と、ヘテロクロマチン領域のメチル化が RNAi 因子の欠損で消失するという結果は、一見「ニワトリと卵」の問題のように、どちらが先に起こる現象であるか判断出来ない複雑な機構の存在が推測される。しかし、siRNA を介したメチル化の導入とメチル化を介した siRNA 産生の増強が密接に絡んだ、「自己増強化ループ」という機構

で、一連の反応が起きるというモデルが唱えられている(図3)⁸⁾。

ヘテロクロマチンに由来する転写産物が、どの RNA ポリメラーゼによって転写されているのかについては、最近興味深い報告がなされている。分裂酵母の RNA ポリメラーゼ II のサブユニット変異によって、RNAi 因子の変異株と同じようなヘテロクロマチン構造の異常や、siRNA 産生の異常が確認されたのである^{9), 10)}。この結果は、タンパク質をコードする通常の mRNA の転写を担う RNA ポリメラーゼ II が、ヘテロクロマチン領域からの転写にも機能している事を支持する結果である。興味深い事は、この変異株では通常の mRNA の転写はほとんど影響を受けていないように見える点である。いったいどのような機構で RNA ポリメラーゼ II の機能がユークロマチンとヘテロクロマチンで使い分けられているのか、相互作用する他の因子の機能的な関係も含めて、今後の研究によって明らかにされるものと思われる。

3)ヘテロクロマチン構造の維持と確立

以上述べたように、RNAi 機構がヘテロクロマチンに形

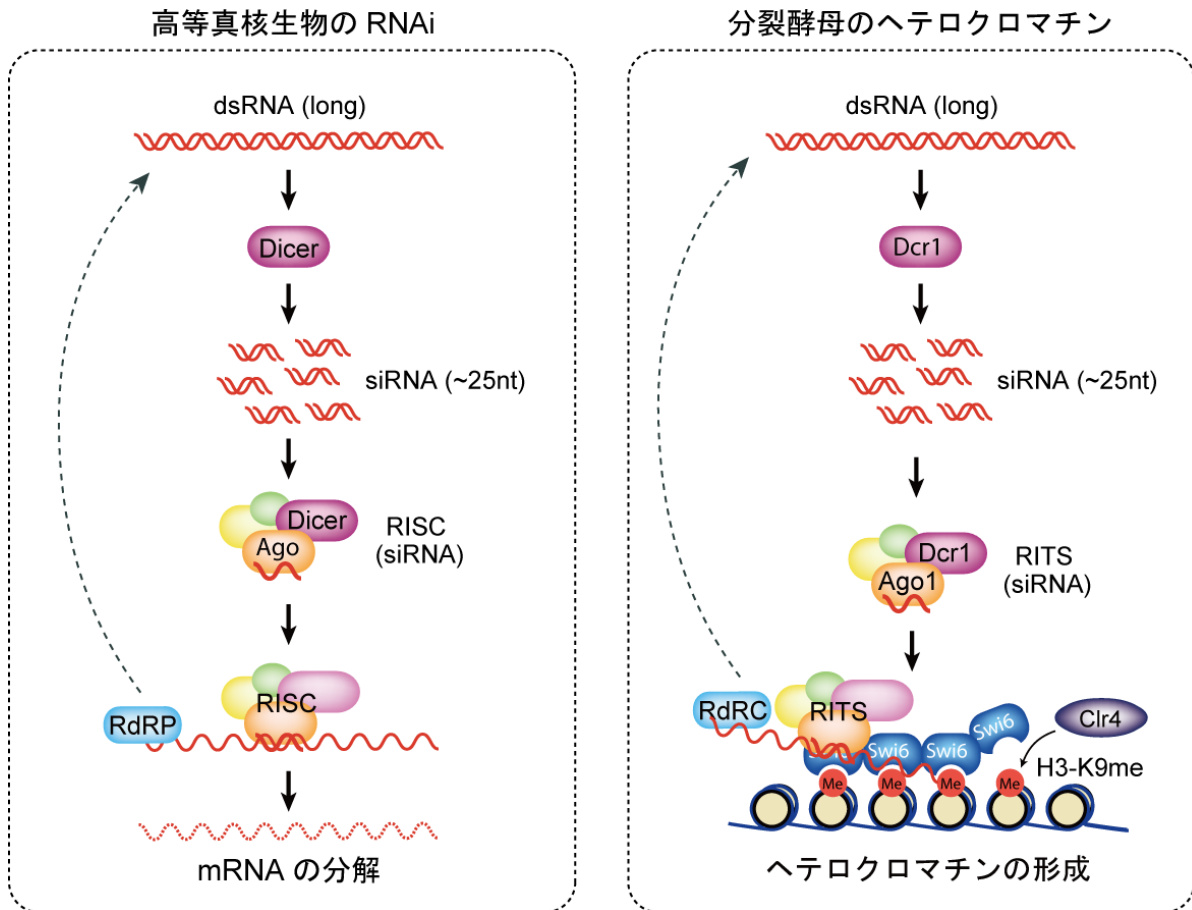


図2 高等真核生物の RNAi 機構と分裂酵母のヘテロクロマチン形成機構の比較

通常の RNAi 機構では、長い二本差 RNA (dsRNA) が Dicer によって短い二本差 RNA (siRNA) に分解され、Argonaut を含む RISC 複合体が一本鎖 siRNA を取り込み、相補的な mRNA の分解、あるいは翻訳の抑制を行う。一部の生物種では、RNAi のシグナルが、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRP) の働きによって増幅されていると考えられている。一方分裂酵母では、セントロメアに由来する双方向の RNA 転写産物が二本鎖を形成し、これが Dcr1 によって分解された後、Ago1 を含む RITS 複合体に取り込まれる。この RITS 複合体が、RNA の相補性を利用してヘテロクロマチン領域にターゲットすることで、さらなる H3-K9 メチル化と Swi6 のリクルートを行うと考えられている。

成に重要な役割を果たすということが明らかにされたが、実際にヘテロクロマチン形成過程のどの段階に関わるのか、また RNAi の変異が何故セントロメアのみで顕著に認められるのかについては明らかではなかった。ヘテロクロマチン構造の形成には、オープンなクロマチンを凝縮クロマチンに変化させる確立 (establishment) の過程と、いったん形成された凝縮クロマチンをそのまま保持する維持 (maintenance) の過程が存在すると考えられている。最近我々は、RITS 複合体に含まれる Chp1 の働きを詳細に解析することで、RNAi 因子がヘテロクロマチンの確立の過程に関わり、その機構はどの染色体領域でも共通である事を明らかにした¹¹⁾。この結果はヘテロ

クロマチンが、転写活性領域とのせめぎ合いの過程によって維持されており、ヘテロクロマチンを伝播 (spread) する過程に RNAi 因子が関わるという機構を支持するものと考えられる (図4)。また、RNAi 因子の欠損による影響が、セントロメアで顕著に見られる理由は、セントロメアのヘテロクロマチンが、他の領域に比べて確立の過程を必要とする、つまりオープン・クローズのダイナミックな変化をする領域であることが推測される。これがセントロメアの機能とどのように結びつくのか、今後の解析によって解明されるものと考えられる。

4) 高等真核生物のヘテロクロマチンと RNAi

上述のように、RNAi 因子とクロマチン構造変化の研究

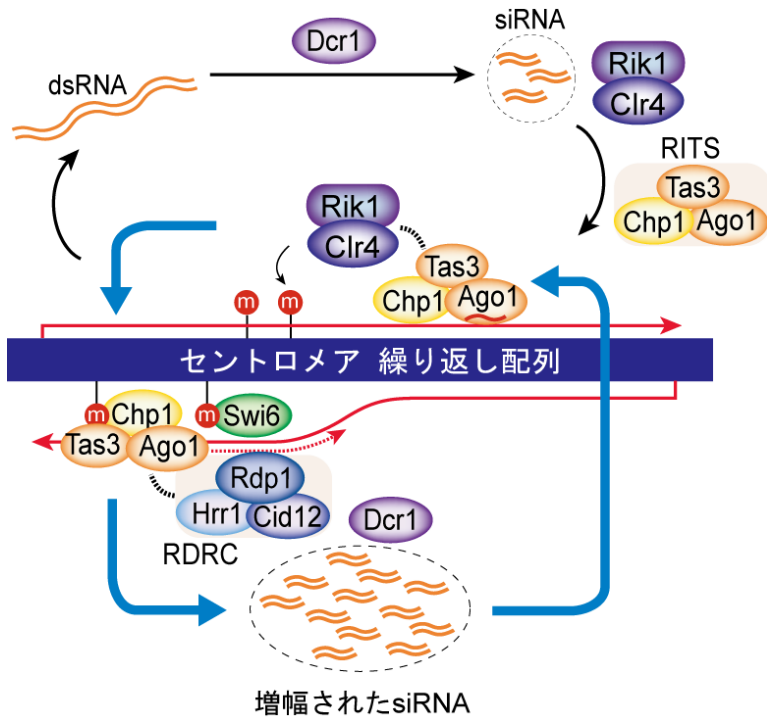


図3 分裂酵母へテロクロマチン化の自己増強ループモデル

へテロクロマチン化の最初の過程には、転写された RNA によって形成される二本鎖 RNA が必須であり、これが RITS 複合体を呼び込み最初の H3-K9 のメチル化を促す(上のループ)。しかしこれだけでは不完全であり、このメチル化をきっかけにしてさらに Rdp1 を含む RDC 複合体の働きによって siRNA 産生を促進し、シグナルが増強されることによって(下のループ)、完全な凝縮クロマチンが形成される(文献8を改変)。

は、これまで分裂酵母を中心に進展してきたが、他の高等な真核生物においても RNAi による核内クロマチン構造の関係が明らかにされてきている。まず植物では、古くから RNA の導入によって DNA のメチル化が引き起こされる RdDM (RNA-dependent DNA methylation) という現象が知られている¹²⁾。DNA のメチル化修飾は、へテロクロマチンに関わるヒストンの修飾と良く相関し、高等真核生物の遺伝子発現調節に関わる、重要なエピジェネティックなマークとして機能することが明らかにされている。実際にシロイヌナズナのへテロクロマチン領域を詳細に解析した結果、DNA のメチル化と H3-K9 のメチル化が、特にトランスポゾンや繰り返し配列の領域で非常に良く一致することが示されている¹³⁾。この RNA によって引き起こされる DNA のメチル化とヒストン H3-K9 のメチル化が、やはり RNAi 因子と小さな siRNA に依存して起きている事が明らかにされた¹⁴⁾。植物に限らず、DNA のメチル化とヒストンのメチル化のどちらがより根元的なマークなのか、完全に解明されていない問題であるが、興味深いことに、植物では DNA のメチル化の方がヒストンのメチル化より先んじて起こる直接的な変化と考えられる。また植物では、全真核生物を通じて保存されている三種類の RNA ポリメラーゼに分類されない、第4番目の RNA ポリメラーゼの遺伝子が存在し、これがへテロクロマチンからの RNA の転写に必須であることが報告されて

いる^{15), 16)}。分裂酵母の RNA ポリメラーゼ II のへテロクロマチン特徴的な機構と、この新規 RNA ポリメラーゼの働きがどのように結びつくのか興味深い。

植物以外的高等真核生物においても、RNAi 因子がへテロクロマチン構造の形成に重要な役割を果たすことが報告されている。まずショウジョウバエでは、RNAi に関わる因子 (*piwi*, *aubergine*, *spindle-E*) の変異によって、へテロクロマチン構造によるサイレンシングが緩和され、H3-K9 メチルの減少と HP1 の局在変化が起こることが示されている¹⁷⁾。また、脊椎動物細胞のモデルとして、遺伝子の機能解析に良く用いられるニワトリの DT40 細胞株に、ヒトの 21 番染色体を持たせた融合細胞において Dicer の遺伝子を欠損させると、やはりセントロメアの機能不全が認められ、ヒト 21 番のセントロメアのサテライトリピートに由来する RNA が蓄積し、HP1 の局在変化を引き起こすことが明らかにされている¹⁸⁾。同様な現象が Dicer を欠損させたヒトの ES 細胞でも観察されており¹⁹⁾、RNAi の機構が高等真核生物のへテロクロマチン形成においても、重要な役割を果たすことを示した結果と考えられる。これらの高等真核細胞において、siRNA がどのように核内のクロマチンに結びつくのか、その詳細なメカニズムはまだ明らかにされていない。分裂酵母で明らかにされた機構とどのように関連するのか、今後の研究の進展が大いに期待される。

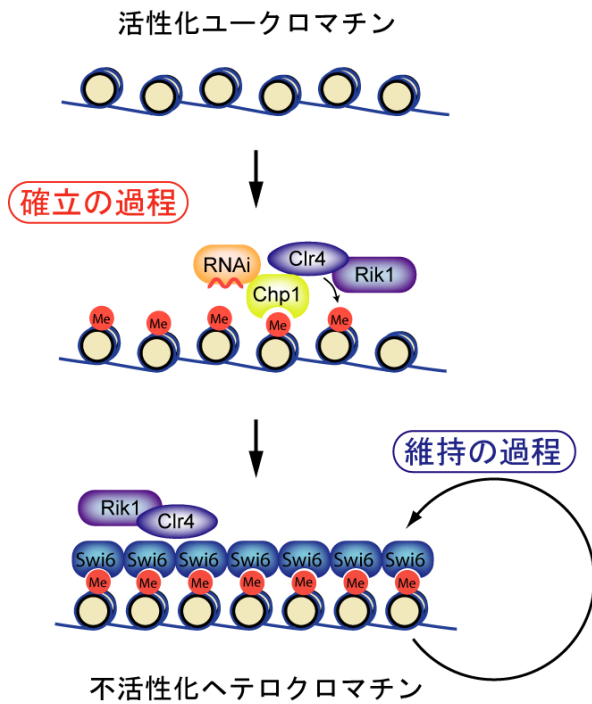


図4 ヘテロクロマチン形成の確立と維持の過程

ヘテロクロマチンの形成には、ユークロマチン領域からヘテロクロマチン領域へ移行させる「確立」の過程と、いったん確立された構造を「維持」する二種類の過程に分けることが出来ると考えられる。RNAiの機能は前者の確立の過程に特異的に関わり、維持の過程への関与は少ないと考えられる。選択的ヘテロクロマチンである、不活性化X染色体の形成過程に置いて、Xist RNAが確立 (initiation) の過程に関わることが明らかにされている。

おわりに

以上、クロマチン構造、特にヘテロクロマチン構造の形成と RNAi の関連について、分裂酵母での研究を中心に最近の知見を概説した。今回は性染色体の遺伝子量補正に関わる RNA の発現とクロマチン構造変換の関係については紹介できなかったが、RNA が関わるクロマチン構造変化の詳細を解明するためには、今回紹介したヘテロクロマチンの形成機構と併せて考える必要があると考えられる。さて、何故相補的な RNA を分解する機構である RNAi の機構が、核内のヘテロクロマチン構造の形成と関わるのか、これを完全に理解するにはまだまだ多くの研究が必要と考えられる。現在までに明らかにされた結果は、個々の生物種で特徴的な現象の解析に基づいており、今後様々な生物種で共通する分子メカニズムを詳細に解析し、比較することが大事ではないかと考えられる。また、RNAi が外来遺伝物質の排除に機能している事実と、ヘテロクロマチンがゲノム中の反復配列や転移因子の抑制に働いていることを考え合わせると、どちらも「ホストゲノムの防御」という共通の方向性を持ち、お互いが機能的に関連しながら共進化してきたのが現在の状況ではないか推測される。同様な説がテトラヒメナのゲノム再編の研究からも提唱されており²⁰⁾、ヘテロクロマチンの形成メカニズムと、その起源や染色体機能に

おける役割ついて、ホストゲノム防御という視点から研究していることが重要ではないかと考えられる。

文献

- 1) Heard, E. : Curr. Opin. Cell. Biol., 16: 247-255, 2004
- 2) Gilfillan, G. D. et al.: FEBS Lett., 567: 8-14, 2004
- 3) Nakayama, J. et al.: Science, 292: 110-113, 2001
- 4) Meister, G., & Tuschl, T.: Nature, 431, 343-349, 2004
- 5) Volpe, T. et al.: Science, 297: 1833-1837, 2002
- 6) Verdell, A., et al.: Science, 303: 672-676, 2004
- 7) Motamedi, M. R. et al.: Cell, 119: 789-802, 2004
- 8) Noma, K. et al.: Nat Genet., 36: 1174-118, 2004
- 9) Kato, H., et al.: Science, 309: 467-469, 2005
- 10) Djupedal, I., et al.: Genes Dev., 19: 2301-2306, 2005
- 11) Sadaie, M., et al.: EMBO J., 23: 3825-3835, 2004
- 12) Matzke, M. A., et al.: Plant Mol. Biol., 43: 401-415, 2000
- 13) Lippman, Z., et al.: Nature, 430: 471-476, 2004
- 14) Can, S. W. et al.: Science, 303: 1366, 2004
- 15) Onodera, Y. et al.: Cell, 120: 613-622, 2004
- 16) Herr, A. J. et al.: Science, 308: 118-120, 2005
- 17) Pal-Bhadra, M. et al.: Science, 303: 669-672, 2004
- 18) Fukagawa, T. et al.: Nat. Cell. Biol., 6: 784-791, 2004
- 19) Kanellopoulou, C. et al.: Genes Dev., 19: 489-501, 2005
- 20) Mochizuki, K. & Gorovsky, M. A.: Curr. Opin. Genet. Dev., 14;

〈著者プロフィール〉

中山潤一：1999年東京工業大学生命理工学研究科博士課程修了、理学博士。米国コールドスプリングハーバー研究所へ留学後、2001年12月、JST さきがけ 21 研究員。2002年9月より、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、クロマチン動態研究チームリーダー。クロマチン構造の変化と遺伝現象との関連に興味を持って研究を行っている。