

2014年度 博士研究員研究成果報告書

氏名 (所属研究室) 柴田 幸政 (理工学研究科西脇研究室)

研究課題 クロマチン状態の可視化法の確立及び、発生に関わる転写制御機構の研究

研究期間 2014年4月1日～2015年4月30日

研究成果概要 (日本文(全角)の場合は2,500字程度、英文(半角)の場合は90字×65行程度)

細胞運命の維持は多細胞生物の発生及び恒常性に不可欠な現象であり、幹細胞からできる様々な種類の細胞の差異を保つ事で、個体での細胞種の多様性を保っている。細胞運命を維持するためには、各細胞種特異的に発現する遺伝子群の発現を維持すると共に、必要のない遺伝子の抑制を維持する事も必要になってくる。よく知られた例としては、ショウジョウバエの胚で、Hox 遺伝子の抑制を維持するために、Polycomb 蛋白質群が H3K27 のメチル化を介して働いている事が挙げられる。私はこれまでに、*C. elegans* を用いてアセチル化ヒストン結合蛋白質 BET-1 及び MYST ファミリーヒストンアセチル化酵素 MYS-1, MYS-2 が細胞運命の維持に必要である事を示す事で、メチル化だけでなくヒストンのアセチル化も細胞運命の維持に必要であることを明らかにしている。これらは、複数の種類の細胞で働いている事から、細胞運命の維持に関わる基本的な因子であると考えられる。更に、BET-1 はヒストンバリエント HTZ-1/H2A.z を介して細胞運命の維持を行っている事、HTZ-1 と H3K27 のメチル化はゲノム上の異なる領域を占める事も明らかにしている。HTZ-1 は生殖巣で標的遺伝子 *ceh-22* を抑制する事で細胞運命を維持しており、HTZ-1 による転写抑制が細胞運命の維持に必要である。しかし、HTZ-1 がどのように転写抑制を行っているかはわかっていない。

これまでに、HTZ-1 の局在をゲノムワイドに解析した場合、プロモーターでの局在が RNA polymerase II にいてる事が報告されている。更に、HTZ-1 と転写活性化にはあまり相関がない事から、HTZ-1 は RNA polymerase II が転写開始部位にリクルートされながら転写が活性化されていない pausing と呼ばれる状態に関係しているのではないかという事も報告されている。そこで、*bet-1* が RNA polymerase II の pausing に関わっている可能性を検討した。RNA polymerase II の転写伸長は C terminal domain (CTD) の 2 番目と 5 番目のセリンのリン酸化によって制御されている事がわかっている。Pausing の状態では、TFIIH にリン酸化される 5 番目のセリンはリン酸化されているが、p-TEFb にリン酸化される 2 番目のセリンはリン酸化されていない。ちなみに、この 2 番目のセリンがリン酸化されると転写伸長が起こる。これまでに、RNAi を行うと *bet-1* 変異体の表現型を増強する遺伝子として、クロマチンリモデリング複合体 CeBAF の構成因子 HAM-3 を既に単離している。*ham-3* 変異は単独では、特に *bet-1* 変異体と同じ表現型を示す事はないが、面白い事に、基本転写因子 TFIIH の構成因子 ZK1128.4 の欠損変異との二重変異体では *bet-1* 変異体と同様の表現型を示す事がわかった。そこで、その表現型が ZK1128.4 に依存している事を確認するために、レスキュー実験を行った。その結果、野生型の ZK1128.4 を導入した場合には表現型がみられなくなった事から、細胞運命の維持に ZK1128.4 及び TFIIH が関与している事が示唆された。TFIIH は 5 番目のセリンのリン酸化に関与する複合体である事がわかっているが、その構成因子である ZK1128.4 については、他の生き物の相同分子も含めてその機能はほとんどわかっていない。HTZ-1 が pausing との関連が指摘されている事から、ZK1128.4 が何らかの形で 2 番目のセリンのリン酸化を抑制している可能性を、考え

ている。

また、核は、転写制御や DNA 複製を含めて様々な生命現象が引き起こされる場としての役割を持っている。そのため、核が正常に形成される事はこれらの生命現象が正常に執り行われるために必要であると考えられる。個体で始めに作られる核は、受精卵の前核であるが、正常な前核の形成に必要な分子はあまりわかっていない。そこで、2種類の方法で前核の形成に必要な分子を単離した。一つは RNAi スクリーニングで、クロマチン関連の遺伝子の RNAi を行い、前核の形態やサイズに関わる遺伝子を多数単離している。もう一つは、変異体の画像の検索であり、理研の大浪研の協力で、RNAi を行った胚の画像ライブラリーから同じく、前核の形態やサイズに関わる遺伝子のスクリーニングを行った。二次スクリーニングでは実際に RNAi を行い、正常な前核の形成に必要な遺伝子を複数得ている。この次の段階としては、RNAi 胚の詳細な観察を行う事で、これらの遺伝子の前核形成における役割を明らかにする事が考えられる。しかし、そのためには野生型の前核の挙動を詳しく知る必要がある。そこで、まず野生型の前核の正確な定量を行う事にした。

前核の可視化は核膜孔の構成因子である NPP-1 に GFP ラベルした融合蛋白質を用いて行った。この、NPP-1::GFP 株を前核形成時から 1 分おきに撮影し、その画像を Matlab を用いて解析する事で、前核の体積を計測した。雌性前核と雄性前核は、共に形成直後は約 $40 \mu\text{m}^3$ の大きさで、その後、毎分約 $45 \mu\text{m}^3$ ずつ大きくなっていく事で、最終的に約 $400 \mu\text{m}^3$ の大きさにまで達する。この様に、前核は毎分一定の体積が増えていく事で、最終的に同じ大きさにまでなる事がわかった。この事は、前核が大きくなる過程で核膜の輸送又は合成過程が常に一定の値で働いており、その働きは前核の大きさや、核膜の面積に依存しない事がわかった。

総説(発表予定)

Maintenance of cell fates through acetylated histone and the histone variant H2A.z in *C. elegans*, Yukimasa Shibata, Kiyoji Nishiwaki, worm, in press