



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on Functions of Histone Variant H2A.Z for the Maintenance of Heterochromatin Integrity [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	月井, 一輝
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(理学)
Dissertation Number	甲第14906号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/85246">https://hdl.handle.net/2115/85246</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	TSUKII_Kazuki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



# 学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 月井 一輝

## 学位論文題名

### Study on Functions of Histone Variant H2A.Z for the Maintenance of Heterochromatin Integrity

(ヘテロクロマチンにおけるヒストンバリエント H2A.Z の機能に関する研究)

我々ヒトは、1つの受精卵から、200種類もの細胞を生み出す。すべて同じ DNA をもちながらも、これほどの多様性を生み出せるのは、遺伝子の発現パターンが DNA やヒストンの化学修飾によってエピジェネティックに制御されているからである。真核生物の DNA はヒストン八量体 (H2A, H2B, H3, H4 各 2 分子ずつ) に巻き付いた、ヌクレオソームを構成単位として核内に折りたたまれているが、そのヒストンにメチル化やアセチル化などの化学修飾を加えることで、遺伝子の発現パターンを変容させている。特に、遺伝子の発現を抑制するヘテロクロマチンは、細胞種を規定する上で重要であり、生物にとってもっとも重要な分子基盤のひとつである。

分裂酵母は進化的に保存されたヘテロクロマチン制御機構をもち、高等真核生物に比べ、重複して働くタンパク質が少ないため、遺伝学的解析によりヘテロクロマチン制御機構の基本原則を理解する上で優れている。分裂酵母のヘテロクロマチンは、ヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化修飾 (H3K9me) のみによって規定される。H3K9me は HP1 タンパク質 (Heterochromatin Protein 1) によって認識され、HP1 のホモ二量体化を介して高度に凝集し、核内で分離されたヘテロクロマチンドメインを形成し、転写が抑制される。

細胞分裂を経ても一定の H3K9me を維持するため機構として、RNAi 機構と Clr4 自己増強機構の 2 つが知られている。RNAi 機構では、ヘテロクロマチン内の転写されたノンコーディング RNA が Dcr1 によって siRNA に切断され、RITS 複合体がそれを取り込み、相補的な RNA に結合し、そこに H3K9 メチル化酵素 Clr4 を呼び込み、H3K9me を拡張する。Clr4 はメチル化に必要な SET ドメインに加えて、自身がメチル化した H3K9me に結合するクロモドメインをもつ。そのため、Clr4 自身で H3K9me を拡張していくこともでき、これを Clr4 自己増強機構という。これら二つの機構はリダンダントに機能している。

ヒストンにはバリエントが存在し、ヒストンの化学修飾に加え、このヒストンバリエントもクロマチンの機能に多様性をもたらしている。中でも、ヒストン H2A のバリエントである H2A.Z は、酵母からヒトまでもっともよく保存されたヒストンバリエントのひとつである。H2A.Z は H2A と比べ 4 割ほどのアミノ酸が異なり、特に N 末端は大きく異なる。そのため、ヒストンテールの化学修飾のパターンも異なり、H2A.Z の N 末端のアセチル化修飾は転写制御に重要である。また、H2A.Z はアミノ酸配列の違いにより、ヌクレオソームの表面の電荷的な偏りを強め、クロマチンの凝集を強める。H2A.Z はユークロマチンの遺伝子のプロモーターに局在しており、RNA ポリメラーゼ II の promoter proximal pausing に必要であり、転写レベルの低い遺伝子のプロモーターに多く局在していることから、転写に抑制的に働いていると考えられる。一方で、H2A.Z のヘテロクロマチンでの機能はよくわかっていない。分裂酵母において、サブテロメアのサイレンシングに H2A.Z が必要であるが、そのメカニズムはまったくわかっていなかった。また、哺乳類や植物において、ヘテロクロマチンのマークである H3K9me やメチル化 DNA が減少すると、H2A.Z はヘテロクロマチンへの局在量が増える。こういった機構は、エピジェネティックなマークがダイナミックに変化する分化の過程

で必要と考えられるが、この H2A.Z の局在変動のメカニズムや H2A.Z の機能は依然として明らかになっていない。そこで、本研究では、分裂酵母を用いて、ヘテロクロマチンでの H2A.Z の機能を明らかにすることを目的とした。

まず、H2A.Z のヘテロクロマチンへの局在を ChIP-qPCR によって調べた。H2A.Z はユークロマチンの遺伝子の遺伝子コード領域に比べプロモーターに多く局在することが確認できた。また、セントロメアヘテロクロマチンには、遺伝子コード領域と同程度、つまり、低いレベルで局在することが明らかになった。一方で、*clr4* や *dcr1* を欠損させると、H2A.Z のヘテロクロマチンへの局在が有意に増えたことから、H3K9me の減少が H2A.Z のヘテロクロマチンへの局在の増加を引き起こすことが明らかになった。また、H2A.Z をヌクレオソームに組み込む因子 SWR 複合体の *swr1* と *bdf1* を欠損させると、この H2A.Z の蓄積が起こらなかったことから、H3K9me が減少した際に SWR 複合体が H2A.Z を蓄積させることが明らかになった。さらに、*clr4* 欠損変異体に H2A.Z を欠損させると、ヘテロクロマチンの転写の増加が観察された。また、この H2A.Z による転写抑制には、ユークロマチンでの遺伝子発現制御に必要な H2A.Z の N 末端が必要であった。これらのことから、H2A.Z は H3K9me が減少した際に、SWR 複合体によってヘテロクロマチン領域に蓄積し、サイレンシングを補うことが明らかになった。

RNAi 機構と Clr4 自己増強機構はリダンダントに働くため、*dcr1* 欠損変異体でも Clr4 自己増強機構によってセントロメアヘテロクロマチンに H3K9me は半分程度維持される。*dcr1* 欠損変異体に H2A.Z を欠損させると、セントロメアヘテロクロマチン内の転写が増えたことから、H3K9me が減少している可能性が考えられた。そこで、H3K9me を ChIP-qPCR によって定量したところ、*dcr1* と H2A.Z の二重欠損変異体では、H3K9me が *clr4* 欠損変異体と同じレベルまで減少するが明らかになった。さらに、RNAi が不要である性決定領域とサブテロメアのヘテロクロマチンにおいても、*dcr1* と H2A.Z の二重欠損変異体では H3K9me が有意に減少することが明らかになった。以上のことから、H2A.Z が Clr4 自己増強機構によるヘテロクロマチンの維持に必要であることが明らかになった。

次に、H2A.Z がどのように Clr4 自己増強機構を促進するのかを調べた。Clr4 のテザリングにより形成される異所的なヘテロクロマチンは、脱メチル化酵素 Epe1 非存在下で Clr4 自己増強機構によって維持される。しかし、H2A.Z はこの異所的ヘテロクロマチンの維持には必要ではなかった。つまり、H2A.Z はダイレクトに Clr4 の自己増強機構に関与しているわけではないことが示唆された。Clr4 自己増強機構による H3K9me の維持には、脱メチル化酵素 Epe1 とのバランスが重要である。そこで、次に、H2A.Z が Epe1 の脱メチル化を抑制している可能性を検証した。*dcr1* と H2A.Z の二重欠損変異体に *epe1* をさらに欠損させると、H3K9me が完全に回復した。これらのことから、H2A.Z は Epe1 による脱メチル化を抑制することで、Clr4 自己増強機構によるメチル化を促進することが明らかになった。

また、Epe1 はヘテロクロマチン内の転写を活性化することが知られており、*epe1* を過剰発現すると転写が増える。*epe1* 過剰発現株に H2A.Z を欠損させたところ、転写活性化がさらに増強された。つまり、H2A.Z は Epe1 の転写活性化を抑制することがわかった。H2A.Z 欠損変異体ではサブテロメアが脱サイレンシングされたが、さらに *epe1* を欠損させるとサイレンシングが回復した。これらのことから、H2A.Z は Epe1 の転写活性化を抑制し、これはサブテロメアのサイレンシングに必要であることが明らかになった。

以上のことから、ヘテロクロマチンを維持するための H2A.Z の多様な機能が明らかになった。特に、H2A.Z は、抗サイレンシング因子の機能を阻害することでサイレンシングを促進するという、新規な機構によりヘテロクロマチン形成を促進することを明らかになった。