



# 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_review.pdf, 審査の要旨



# 学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（理学） 氏名 月井 一輝

審査担当者	主査	教授	坂口 和靖
	副査	特任教授	高木 睦
	副査	教授	高岡 晃教
	副査	教授	村上 洋太

## 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)

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。

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たモデル生物である。分裂酵母のヘテロクロマチンは、Clr4 蛋白質によるヒストン H3 の 9 番目のリジンのメチル化修飾 (H3K9me) 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、核内で分離されたヘテロクロマチンドメインを形成し、転写を抑制する。

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 つの独立した機構が知られている。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 により誘起される RNAi によって最終的に Clr4 がヘテロクロマチン領域に呼び込まれる。一方、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。

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、酵母からヒトまでよく保存されたヒストンバリエントである。H2A.Z の N 末端は H2A とは異なりユークロマチンでの転写制御に重要である。また、H2A.Z は、クロマチンの凝集を強めることが知られている。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 の一時停止に必要であり、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。分裂酵母ではサブテロメアのサイレンシングに H2A.Z が必要であるが、そのメカニズムもわかっていない。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 DNA メチル化が減少すると、H2A.Z はヘテロクロマチンへの局在量が増える。この H2A.Z の局在変動のメカニズムや H2A.Z による転写制御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 によって調べたところ、ヘテロクロマチンには、H2A.Z が低いレベルで局在するが、Clr4 や RNAi 因子を欠損させ H3K9me が減少すると、H2A.Z をヌクレオソームに組み込む因子 SWR 複合体依存的に H2A.Z が増加した。この増加した H2A.Z は N 末配列依存的にヘテロクロマチン領域の転写を抑制していた。つまり、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 自己増強機構は独立して働くため、RNAi 欠損変異体でも Clr4 自己増強機構によってヘテロクロマチンに H3K9me は半分程度維持される。RNAi 欠損変異体に H2A.Z を欠損させると、残存する H3K9me が消失するとともにヘテロクロマチン内の転写が増えたことから、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 自己増強維持に関与するのかを調べた。H3K9me のレベルは Clr4 によるメチル化と脱メチル化酵素 Epe1 による脱メチル化のバランスで決まる。詳細な解析の結果 H2A.Z は直接 Clr4 の自己増強機構に関与していないことが示唆された。一方、H3K9me がほぼ消失する RNAi 因子と H2A.Z の 2 重変異株からさらに epe1 を欠損させると、H3K9me が完全に回復した。これは、H2A.Z が 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を示している。

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いる。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、H2A.Z が 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ることが報告されているが、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。

本研究では、H2A.Z のヘテロクロマチンの多彩な機能を明らかにしている。特にヘテロクロマチンに異常が生じた際に H2A.Z が増加することヘテロクロマチンによる転写抑制を補完する機能をもつことが明らかになった。また、H2A.Z は抗サイレンシング因子 Epe1 の機能を阻害するという発見は、ヘテロクロマチンの維持機構の理解に新しい視点を与えるもので、今後の発展が期待できる。よって、審査員一同は、本研究が北海道大学（理学）の博士を授与する資格があるものと認める。