

氏 名	かとう やすこ 加 藤 容 子
学位(専攻分野)	博 士 ( 学 術 )
学 位 記 番 号	博 甲 第 510 号
学 位 授 与 の 日 付	平成 20 年 9 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 3 項該当
研 究 科 ・ 専 攻	工芸科学研究科 機能科学専攻
学 位 論 文 題 目	Studies on the chromatin proteins involved in heterochromatin formation with focus on histone methyltransferase G9a ( ヒストンメチル化酵素 G9a を中心としたヘテロクロマチン形成に関与する因子の研究 )
審 査 委 員	(主査)教授 山口政光 教授 竹谷 茂 教授 遠藤泰久

### 論文内容の要旨

申請論文は第 1 章「序論」、第 2 章「ショウジョウバエ G9a はユーコロマチンで働くヒストンメチル化酵素であり、PcG と trxG 遺伝子はショウジョウバエ G9a と遺伝学的に相互作用する」、第 3 章「ZNF200 は G9a 相同ドメインを介して、ヒト G9a と物理的に相互作用する」、第 4 章「ショウジョウバエにおけるヒト HP1 アイソフォームの機能ドメイン解析」から構成されている。

第 1 章では、ヒストンの様々な翻訳後修飾について紹介し、それらが修飾を受けるアミノ酸残基、及び修飾の種類などの組み合わせによってクロマチン構造変換をもたらし、エピジェネティックな制御、クロマチンの凝集、遺伝子の転写制御、ヘテロクロマチン形成、発生・分化の制御などに重要な役割を果たしているが述べられている。またヒストンのリシン残基のメチル化は、モノ、ジ、トリメチルの 3 種類の状態があり、またメチル化を受けるリシン残基によっても転写的活性化、あるいは転写許容状態を維持する機能をもつもの (H3-K4, H3-K36, H3-K79) また転写不活性化、ヘテロクロマチン化機能をもつもの (H3-K9, H3-K27, H4-K40) があること、また数多くのヒストンメチル化酵素が同定されつつあることが研究の背景として述べられている。

G9a はヒストン H3 の 9 番目の Lys 残基 (H3-K9) 特異的なメチル化酵素である。第 2 章では、ショウジョウバエモデルを用いて行った G9a の生体内機能の解析について述べられている。ショウジョウバエ G9a (dG9a) を RNAi 法によって唾腺組織特異的にノックダウンするとユーコロマチン領域に局在していたヘテロクロマチン化に関わる因子である HP1 が減少する。また同時に転写活性の指標となるリン酸化型 RNA ポリメラーゼ II の局在が唾腺染色体のインターバンド領域に広がることが観察された。これらのことから dG9a はユーコロマチン領域における HP1 の局在や、転写の抑制に重要な働きをしていることが考察されている。dG9a を複眼原基特異的に過剰発現すると成虫の複眼において rough eye 表現型と呼ばれる個眼の融合や剛毛の欠失が観察された。これは dG9a の過剰発現による蛹期の複眼形態形成異常によりもたらされることがわかった。一方酵素活性に必要な活性中心を欠失した不活性型 dG9a を複眼原基特異的に過剰発現しても rough eye 表現型は観察されないことから、dG9a のメチル化活性が蛹期の複眼の形態形成に関わ

る遺伝子の転写制御に影響を与え、その結果 rough eye 表現型が誘導されることが示唆された。また dG9a が誘導する rough eye 表現型を指標に遺伝学的相互作用する因子の探索を行い、遺伝子量が低下すると rough eye 表現型が増強されるものとして Polycomb (PcG) 遺伝子群が、抑圧するものとして H3-K4 の脱メチル化酵素をコードする *little imaginal discs* 遺伝子が同定された。これらの因子はクロマチン構造変換に関わる因子であり、生体内において、PcG は dG9a の機能を負に、lid は正に制御していることが示唆されている。

第3章では、ヒト G9a と相互作用する ZNF200 タンパク質の同定について述べられている。ヒトとショウジョウバエの G9a のアミノ酸配列の比較から、ヒト G9a の N 末端 532 から 605 番目のアミノ酸配列が進化的に保存されていることが見いだされ、この領域を G9a homology domain (GHD)と名付けた。この GHD をおとりとした酵母 two-hybrid 法により、ヒト G9a と相互作用する因子の探索を行った。その結果 ZNF200 という 5 個の C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> タイプの Zn フィンガーをタンデムに持つタンパク質をコードする cDNA が単離された。in vitro 結合実験及びヒト HEK293 細胞抽出液を用いた免疫沈降により、内在性の ZNF200 と G9a が相互作用していることが明らかにされた。また免疫染色の結果から ZNF200 は HEK293 細胞の核内で、hG9a と共に局在していることも明らかとなった。ZNF200 と hG9a は精巣で発現量が高いことがわかっていることから、両タンパク質の精巣特異的なクロマチン構造の制御及び転写制御への関与が示唆されている。

第4章では、ショウジョウバエ実験系を利用したヒト HP1 ファミリータンパク質のドメイン機能解析について述べられている。HP1 は、哺乳動物では  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の 3 種類のサブタイプが存在することがわかっている。遺伝子導入ショウジョウバエを作製し、HP1 $\beta$ を複眼原基で発現させると、成虫個眼の減少が観察された。一方、HP1 $\gamma$ を翅原基で発現させると、翅脈の一部が欠失する表現型が観察された。これらの表現型の差は HP1 のサブタイプに依存し、HP1 の発現によって遺伝子の発現が抑制されることによって引き起こされたと考えられる。それぞれの表現型を誘導するのに必要なドメインを決定するために、HP1 $\beta$ 、HP1 $\gamma$ のキメラタンパク質を発現する遺伝子導入ショウジョウバエを作製し、その表現型を観察した。その結果、HP1 の表現型を示すにはクロモドメン及びクロモシャドウドメインの両ドメインが必要であるが、HP1 $\gamma$ の表現型は HP1 $\gamma$ の C 端側にあるクロモシャドウドメインのみで十分であることがわかった。以上の結果から、ショウジョウバエの生体内において、ヒト HP1 サブタイプはそれぞれ異なったドメインを介して遺伝子の発現抑制を行っていることが示唆された。

### 論文審査の結果の要旨

ヒストンの翻訳後修飾は、それらが修飾を受けるアミノ酸残基及び修飾の種類などの組み合わせによって様々なクロマチン構造変換をもたらし、エピジェネティックな制御、クロマチンの凝集、遺伝子の転写制御、ヘテロクロマチン形成、発生・分化の制御などに重要な役割を果たしている。G9a はヒストン H3 の 9 番目の Lys 残基 (H3-K9) 特異的なメチル化酵素である。ショウジョウバエ G9a (dG9a) は班入り位置効果を抑圧し、in vitro においてヒストンメチル化活性を有していること、またショウジョウバエの発生に重要であることが報告されているが、その生体内機能については不明な点が多い。

申請者は、dG9a を RNAi 法によって唾腺組織特異的にノックダウンするとユーコロマチン領

域に局在していたヘテロクロマチン化に関わる因子である HP1 が減少し、同時に転写活性の指標となるリン酸化型 RNA ポリメラーゼ II の局在が唾腺染色体のインターバンド領域に広がることを観察した。これらのことから dG9a はユーコロマチン領域における HP1 の局在や、転写の抑制に重要な働きをしていることが考察された。一方 dG9a を複眼原基特異的に過剰発現すると成虫の複眼形態異常 (rough eye 表現型) が観察され、詳細な解析から、dG9a のメチル化活性が蛹期の複眼の形態形成に関わる遺伝子の転写制御に影響を与え、その結果 rough eye 表現型が誘導されることが示唆された。また dG9a が誘導する rough eye 表現型を指標に遺伝学的相互作用する因子の探索を行い、遺伝子量が低下すると rough eye 表現型が増強されるものとして Polycomb (PcG) 遺伝子群が、抑圧するものとして H3-K4 の脱メチル化酵素をコードする *little imaginal discs* 遺伝子が同定された。これらの因子はクロマチン構造変換に関わる因子であり、生体内において、PcG は dG9a の機能を負に、lid は正に制御していることが示唆された。これらの結果は、dG9a 機能についての新しい知見であり、高く評価できる。

また申請者はヒトとショウジョウバエの G9a のアミノ酸配列の比較から、進化的に保存されている領域、G9a homology domain (GHD)を見出した。この GHD をおとりとした酵母 two-hybrid 法により、ヒト G9a と相互作用する因子として ZNF200 という 5 個の C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> タイプの Zn フィンガーをタンデムに持つタンパク質を同定した。*in vitro* 結合実験及びヒト HEK293 細胞抽出液を用いた免疫沈降により、内在性の ZNF200 と G9a が相互作用していることが明らかにされた。また免疫染色の結果から ZNF200 は HEK293 細胞の核内で、hG9a と共に局在していることも明らかとなった。ZNF200 と hG9a は精巣で発現量が高いことがわかっていることから、両タンパク質の精巣特異的なクロマチン構造の制御及び転写制御への関与が示唆され興味深い。

学位論文は英文で丁寧に作成されており、論旨も明解であった。本論文の内容は、査読制のある国際的学会誌にすでに公表済みである下記の 3 編の論文を基礎としている。

- 1) Kato, Y., Kato, M., Tachibana, M., Shinkai, Y. and Yamaguchi, M.: Characterization of *Drosophila* G9a *in vivo* and identification of genetic interactants. *Genes to Cells*, 13, 703-722, 2008.
- 2) Nishida, M., Kato, M., Kato, Y., Sasai, N., Ueda, J., Tachibana, M., Shinkai, Y. and Yamaguchi, M.: Identification of ZNF200 as a novel binding partner of histone H3 methyltransferase G9a. *Genes to Cells* 12, 877-888, 2007.
- 3) Kato, M., Kato, Y., Nishida, M., Hayakawa, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Inoue, Y. H., Yamaguchi, M.: Functional domain analysis of human HP1 isoforms in *Drosophila*. *Cell Struct. Funct.* 32, 57-67, 2007.

また、参考論文として以下の論文が公表されている。

- 1) Sasai, N., Kato, Y., Kimura, G., Takeuchi, T. and Yamaguchi, M.: The *Drosophila jumonji* gene encodes a JmjC-containing nuclear protein that is required for metamorphosis. *FEBS J.* 274, 6139-6151, 2007.