

転移因子の転写と複製の状態を SET する : ATXR5 と ATXR6

SET ドメインは Su(var)3-9, Enhancer of zeste (E(Z)), Trithorax に共通することから命名されたドメインで、ヒストンのリシン残基のメチル化を担う。E(Z)はヒストン H3K27 のメチル化を触媒する酵素であり、このホモログだけが H3K27 のメチル化を触媒することが知られていた。*Arabidopsis thaliana* には 3 つの E(Z)ホモログがあり、内 2 つ、CURLY LEAF (CLF) と SWINGER (SWN) が成熟個体で発現している。しかし、これらは H3K27 のメチル化活性を持たない。*A. thaliana* に 32 種存在する SET ドメインタンパク質の内の 2 つ、ATXR5 (*Arabidopsis trithorax-related protein 5*) と ATXR6 は既知の酵素との類似性が低く、基質がわかっていなかった。Jacob らの研究はこの 2 つのタンパク質が H3K27 のメチル化酵素であることを明らかにしている (Jacob et al. 2009)。

酵素を精製し、基質として各種ヒストンと放射性ラベルした S-アデノシルメチオニン (メチル基の供与体) を加えると、ヒストン H3 だけが放射性ラベルされた。また、ヒストン H3 の 5 種類のメチル化を特異的に認識する抗体を用いることで、メチル化される位置が H3K27 であることが示された。さらに、K27 を A に置換するとメチル化されないこと、元々 K27 のメチル化のほとんどない酵母に ATXR5 あるいは ATXR6 を導入すると H3K27 のメチル化が観察されることから、ATXR5 と ATXR6 が H3K27 のメチル化を担う酵素であることが確認された。また、K27 の 1 メチル化 (H3K27me1) から 3 メチル化 (H3K27me3) を認識する抗体により、メチル化が 1 つであることが示された。

atxr5 変異体、atxr6 変異体は発生異常を示さなかったが、二重変異体は野生型よりも小さくなったことから、この 2 つの遺伝子は相補していることがわかった。生体中での H3K27 のメチル化の程度は単独変異体では野生型と変わらない。

二重変異体では、クロモセンターの凝縮が弱まること、クロモセンター中の転移因子 (CACTA、Ta3、AtMuI) の転写が活性化することがわかった一方で、180-bp セントロメア反復配列領域は脱凝縮しないこともわかった。二重変異体の脱凝縮の表現型は ddm1 や met1 の変異体と類似している。

ATXR5、ATXR6 は in vitro での結果通り、細胞内でも H3K27 の 1 メチル化だけに関わり、二重変異体でも 2 メチル化状態、3 メチル化状態に変化は生じない。更に DNA のメチル化状態、H3K9 のメチル化状態も変化しない。*Arabidopsis* では DNA のメチル化と H3K9me2 とは相互に関係しているので、この DNA・H3K9me2 系と、H3K27me1 の系が独立しておりどちらも遺伝子の転写抑制に必須であることが明らかとなった。

ATXR5 と ATXR6 の欠損は転写だけではなく、クロマチン構造の変化により DNA 複製にも影響する (Jacob et al. 2010)。葉では細胞分裂と、細胞分裂を伴

わないゲノム倍加の両方が起こっているため、葉から DNA を抽出し、Propidium iodide で染色した後フローサイトメトリーで細胞中の DNA 量を測定すると、野生株では、細胞中の DNA 量は 2 の n 乗 (2C, 4C, 8C, 16C, 32C) にそれぞれかたまって分布する。atxr5 単独変異体、atxr6 単独変異体でも同様であった。ところが atxr5/atxr6 二重変異体では 8C と 16C がより分散しており、8 倍体、16 倍体の細胞で一部の領域だけが余分に DNA 複製を起こしていることが示された。atxr5/atxr6 二重変異体ではヘテロクロマチンの凝集が弱まることがわかっており、実際に顕微鏡観察で、細胞中の DNA 量が多いほど凝集が弱まっていることがわかった。

続いて Illumina シーケンサを用いてランダムにゲノム DNA の配列を決定し、ゲノム上にマップしたところ、野生株ではゲノム上に均等に分布したのに対して、atxr5/atxr6 二重変異体ではヘテロクロマチン化している領域の DNA が有意に多いことがわかった。この結果は、ヘテロクロマチン領域が余分に DNA 複製されていることを示している。細かく見ると、ヘテロクロマチン領域が一様に余分に複製されているのではなく、多数のブロックに分かれていることがわかった。ブロックの大きさはほとんどが 25kb 以下で H3K9me2 領域と 8 割が一致し、転移因子や反復配列が集中していた。atxr5/atxr6 二重変異体で活性化する TSI、Ta3、CACTA はブロックに集まっており、転移因子の活性化と DNA 過剰複製の相関が示唆された。

1 回の S 期において、特定の箇所から複数回複製が開始されるとすると過剰に複製される配列は中心が一番多く、その両側に行くに従って対称的に少なくなることが予想される。実際、atxr5/atxr6 二重変異体でもそのような分布が確認された。

ヒストン H3 抗体による ChIP ではヘテロクロマチン領域が濃縮されていたことから DNA 単独ではなくクロマチン構造ごと過剰に複製されていることが示された。また、H3K27me1 抗体による ChIP では正常細胞での H3K27me1 の分布と、atxr5/atxr6 二重変異体での過剰 DNA 領域とが一致した。ATXR5 と ATXR6 はヒストン H3K27me1 を触媒するので矛盾しない結果である。

atxr5/atxr6 二重変異体での DNA 過剰複製は外部から ATXR6 を導入してやると起こらなくなる。ATXR6 の 3 つのドメイン、PHD、PIP、SET いずれの変異も DNA 過剰複製の抑制を失わせる。ATXR5 と ATXR6 の PHD ドメインはヒストン H3 の 1-21 領域に結合する。この結合は H3K9 のメチル化状態には影響を受けないが、H3K4 がメチル化されるほど弱まる傾向がある。すなわち、ATXR5 と ATXR6 の結合は H3K4me0 の際に最も強い。

従って、正常な ATXR5、ATXR6 は 3 つのドメイン全てを使ってヘテロクロマチン領域のヒストン H3K27 のメチル化を介して DNA の過剰複製の抑制、その領

域の転移因子の抑制、クロマチンの凝縮を維持する機能を果たしている。DNA トランスポゾン是一般には転移の際に元の位置から切り出され別の位置に挿入される。従って転移そのものでは数は増減しない。数を増やすには既に複製された位置から複製される前の位置に転移することが必要である。だから過剰に複製された DNA 領域から転移することはコピー数を増やすのに有効な戦略であると言える。逆にクロマチンの凝集は過剰な複製と転写を防ぎ、DNA と RNA レベルの両方で転移因子を押さえ込む機構と言うこともできるだろう。

Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, Johnson LM, Pellegrini M, Jacobsen SE, Michaels SD.

ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing.

Nat Struct Mol Biol. 2009 Jul;16(7):763-8. Epub 2009 Jun 7.

PubMed PMID: 19503079; PubMed Central PMCID: PMC2754316.

Jacob Y, Stroud H, Leblanc C, Feng S, Zhuo L, Caro E, Hassel C, Gutierrez C, Michaels SD, Jacobsen SE.

Regulation of heterochromatic DNA replication by histone H3 lysine 27 methyltransferases.

Nature. 2010 Aug 19;466(7309):987-91. Epub 2010 Jul 14.

PubMed PMID: 20631708; PubMed Central PMCID: PMC2964344.

2011/04/20

小島 健司 著

禁 無断複写転載