

「クロマチン構造を人工的に変換する新規バイオ技術の開発」

京都大学大学院農学研究科 黒田浩一

【背景と目的】

真核生物のゲノム DNA はヒストンタンパク質と結合し、クロマチンを形成する。クロマチンは、その凝縮の度合いによりユークロマチンとヘテロクロマチンといった状態をとる。クロマチン凝縮度の変化により、転写や DNA 複製などの重要な生命機能に参与するタンパク質のゲノム DNA へのアクセス性が調節されている。実際、クロマチン凝縮度に異常が生じると様々な疾病が引き起こされる。そこで、クロマチンの凝縮度を部位特異的に制御することができれば、細胞分化などの生命現象の制御やクロマチン構造異常に起因する疾患の治療にもつながることが期待される。しかし、クロマチンの凝縮度を制御する方法は、これまで化学触媒を用いたものが主流であり、部位特異的にクロマチンの凝縮度を制御することは不可能であった。そこで、本研究ではクロマチンの凝縮度を部位特異的に制御できる技術の開発に挑戦した(図 1)。

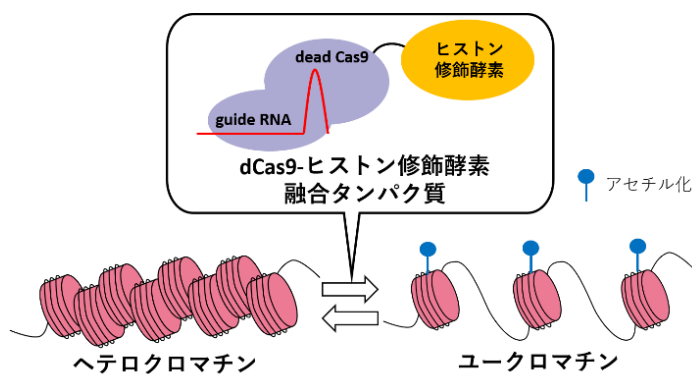


図 1 本研究の概要

【方法と結果】

① dead Cas9 (dCas9)-ヒストン修飾酵素融合タンパク質の核局在確認

クロマチン構造を制御する機構の一つであるヒストン修飾に着目し、目的のゲノム領域においてヒストンを修飾する系の構築と導入を試みた。目的領域に特定のヒストン修飾酵素を輸送するため、ヌクレアーゼ活性を欠損させた dead Cas9 (dCas9) とヒストン修飾酵素を連結した融合タンパク質の発現を試みた。ヒストン修飾酵素として、ヒストンアセチル化酵素とヒストン脱アセチル化酵素を用い、dCas9 との融合タンパク質を発現するプラスミドを構築した。dCas9-ヒストン修飾酵素融合タンパク質の C 末端に EGFP を付加して発現させ、共焦点顕微鏡を用いて観察することで、核への局在を確認すると同時により多くの細胞で発現する発現系を決定し、以後の実験に使用した。

② クロマチンを弛緩させる技術の開発

dCas9 とヒストンアセチル化酵素 Gcn5 の融合タンパク質を発現するプラスミドとヘテロクロマチン領域に挿入された *URA3* 上流領域を認識する guide RNA (gRNA) を発現する

プラスミドを構築した。これらのプラスミドを導入した酵母はウラシル非含有培地で野生型株よりも良好に生育したため、dCas9-Gcn5によりクロマチンが弛緩していることが示唆された。生育度が向上した酵母のユークロマチン領域をフェノール/クロロホルム抽出により選択的に抽出し、qPCRにより定量した(FAIRE-qPCR)。その結果、標的とした領域においてユークロマチン状態の割合が増加していることが分かった(図2)。

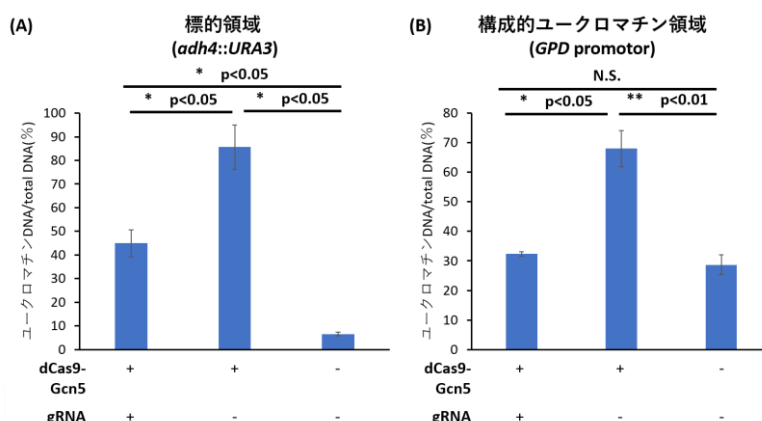


図2 FAIRE-qPCRの結果 (n=3, means ± SEM)

③ クロマチンを凝縮させる技術の開発

dCas9とヒストン脱アセチル化酵素 Hda1の融合タンパク質を生産するプラスミドとCAN1上流領域を認識するgRNAを発現するプラスミドを構築した。そして、CAN1遺伝子の発現抑制時に見られる形質であるカナバニン耐性の向上を指標としてクロマチン凝縮を間接的に評価した。その結果、形質転換体の65.8%がカナバニンに耐性を示したため、CAN1遺伝子領域においてクロマチンが凝縮したことが示唆された。さらに先程と同様、FAIRE-qPCRを用いてユークロマチン状態にあるDNAを選択的に回収し、得られたカナバニン耐性株のクロマチンの凝縮度を調べた。その結果、標的領域においてユークロマチンの割合が減少していたため、標的領域のクロマチン構造が凝縮していることが確認できた(図3)。

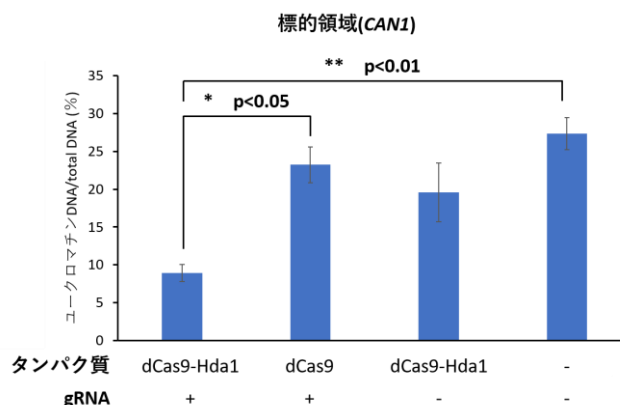


図3 FAIRE-qPCRの結果 (n=3, means ± SEM)

【まとめ】

本研究では、クロマチンを部位特異的に弛緩させる技術および、部位特異的に凝縮させる技術の2つを開発してきた。今後、時間分解能が高い光を用いた発現制御などにより、これらの技術のon/offをコントロールすることで、クロマチンの凝縮度を部位特異的にかつ自由に制御する技術の確立が可能になると考えられる。これにより、細胞の分化制御や神経病の治療において有用な分子ツールにもなり得る。

【学会発表】

Ryota Yamamoto, Takamitsu Amai, Mitsuyoshi Ueda, Kouichi Kuroda

“Development of artificial technology of euchromatin induction in *Saccharomyces cerevisiae*”

World Microbe Forum (オンライン) 2021 年 6 月 20 日

山本凌大、天井貴光、植田充美、黒田浩一

「出芽酵母におけるヒストン脱アセチル化酵素を用いた部位特異的なクロマチン凝縮法の開発

第 44 回 日本分子生物学会年会 (パシフィコ横浜) 2021 年 12 月 3 日

Ryota Yamamoto, Takamitsu Amai, Mitsuyoshi Ueda, Kouichi Kuroda

“Development of technology for inducing euchromatin in specific genome regions and its application to genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*”

Pacificchem 2021 (オンライン) 2021 年 12 月 19 日

山本凌大、天井貴光、植田充美、黒田浩一

「出芽酵母における部位特異的にクロマチン凝縮度を制御する新規手法の開発」

日本農芸化学会 2022 年度大会 (オンライン) 2022 年 3 月 18 日

【論文発表】

Ryota Yamamoto, Genki Sato, Takamitsu Amai, Mitsuyoshi Ueda, Kouichi Kuroda*

Development of artificial system to induce chromatin loosening in *Saccharomyces cerevisiae*

Biomolecules, 12(8):1138 (2022)

Doi: 10.3390/biom12081138

【謝辞】

本研究の実施にあたり支援していただきました、一般財団法人 杉山産業化学研究所ならびに関係の皆様には厚く御礼申し上げます。