

【第122回生涯教育講座】

熱ショックタンパク質は
ヘテロクロマチン形成に寄与するかとう ひろ あき うらの たけし
加 藤 太 陽 浦 野 健キーワード：熱ショックタンパク質，エピジェネティクス，
RNAi，ヘテロクロマチン

要 旨

真核生物は、DNAの配列変化によらず細胞の形質を変化させる仕組みである“エピジェネティクス”をもっている。電子顕微鏡観察により密度の高い染色質として知られるヘテロクロマチンは、その中に含まれる遺伝子の発現をエピジェネティックに抑制する染色体構造である。その構造の形成にはDNAのシトシン残基のメチル化やヒストンの翻訳後修飾が関与する。ヘテロクロマチン構築メカニズムの理解は、分裂酵母やハエなどの単純なモデル生物で先行している。分裂酵母には、非コードRNAを用いたRNA干渉(RNAi)によってヘテロクロマチンを形成するRNAi依存のヘテロクロマチン形成経路が存在する。著者らは最近、この経路に関わる因子として、2つの熱ショックタンパク質(Hsp90とMas5)を発見した。本総説では、RNAi依存のヘテロクロマチン形成経路について概論し、その制御因子として熱ショックタンパク質が発見された意義について考察する。

1. はじめに

真核生物と原核生物の細胞学的な違いは、遺伝情報の本体である染色体DNAを核に収めているかどうかである。更に微細なスケールで眺めると、真核生物の染色体は原核生物にない特徴をもっている。それは、ヌクレオソームである(図1)。ヌクレオソームとは、4種類のヒストンタンパク

質(H2A, H2B, H3, H4)が2分子ずつ集合した8量体に、約147塩基対のDNAが超らせんとして巻き付いた構造である。ヒストン分子は、中央の顆粒形成領域(ヒストンコア)ばかりではなく、そのコア領域から突出したN末端やC末端部分にも塩基性アミノ酸を豊富に含む尾部(ヒストンテイル)をもっている。これらの塩基性アミノ酸は骨格にリン酸をもつDNAと強い親和性をもつ。このため、転写調節因子の認識配列を含むDNA領域にヌクレオソームが形成されると、その転写調節因子がDNAに作用できず、転写を開

Takeshi URANO et al.

島根大学医学部病態生化学

連絡先：〒693-8501 出雲市塩冶町89-1

島根大学医学部病態生化学

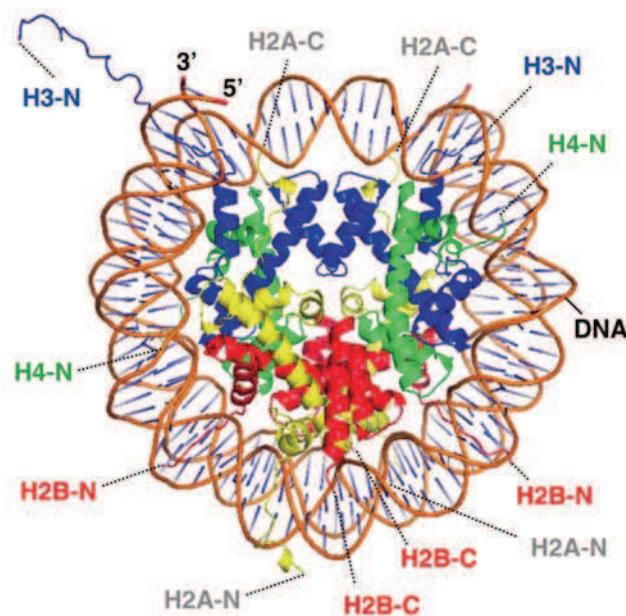


図1. ヌクレオソーム

4種類のヒストン分子、H2A (黄色)、H2B (赤)、H3 (青) および H4 (緑) を2分子ずつ含む8量体を作るヒストンコアにDNA (橙) が巻き付き、ヌクレオソームを形成する。この図は、公共データベースPDBに登録された1AOIを元に作成した。H2AとH2BのN末端とC末端のテイル、H3とH4のN末端テイルの付け根が位置する部分を点線で示す。これらのヒストンテイルは決まった構造をとらないため構造を解くことが難しい。

始することができない。ヒストンアセチル化酵素 (HAT, histone acetyltransferase) によるヒストンのアセチル化は、ヒストンの塩基性を中和し、DNAとの親和性を弱める。一方、ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC, histone deacetylase) はアセチル化ヒストンからアセチル基を取り除き、ヒストンとDNAの相互作用を強固にする。ヒストンはアセチル化以外にも、メチル化、リン酸化やユビキチン化などの翻訳後修飾を受けることが知られており、これらのヒストンの翻訳後修飾はクロマチンのエピジェネティック制御と密接に関係する。

2. がんとエピジェネティクス

細胞は、その分化状態に見合った遺伝子発現パターンを確立し維持する。この遺伝子発現制御に

エピジェネティクスが深く関与することから容易に推察されるように、がん細胞においてはエピジェネティックな異常が頻繁に観察される。よく知られるDNAメチル化の異常に加え、ヒストン翻訳後修飾の異常も既に10年以上前から議論されている。特にがんの特徴的な異常として有名なのは、ヒストンH4の16番目のリジンのアセチル化 (H4K16Ac) と20番目のリジンのトリメチル化 (H4K20me3) の大幅なレベル低下である¹⁾。また、HDAC阻害剤とがんとの関係は20年も前に遡ることができる。がん細胞の増殖を抑制する天然化合物トリコスタチンAの発見は、その阻害対象タンパク質であるHDACが発見される以前の出来事であった²⁾。近年は次世代シーケンシング技術の目覚ましい発展により、HDACやHMTなどのエピジェネティクス制御因子をコードする遺伝

子の変異が、がんゲノムに頻繁に見つかるようになった。また、脳腫瘍を誘発するドライバー変異として、ヒストン H3 バリエーションのひとつであるヒストン H3.3 の変異 (K27M, G34R, G34V) が見つかり、ヒストンの翻訳後修飾を介したエピジェネティック制御の乱れが細胞のがん化と密接に関連することが示唆されている³⁾。これらの変異とがんの関係を理解するためには、転写が活発あるいは不活発な個々のクロマチン構造がどのように確立され、維持されるかを理解する必要がある。しかしながら、ヒトを対象とした研究のみでその全容を把握するのは困難であり、モデル生物における知見との照らし合わせによって徐々に理解が深まってきているのが実情である。

3. ヘテロクロマチンを理解するためのモデル生物としての分裂酵母

ヒトのヘテロクロマチンは、DNA がメチル化され、ヒストンが脱アセチル化されるだけでなく、ヒストン H3 の 9 番目あるいは27番目のリジン残基のメチル化によって特徴づけられる。27番目のメチル化 (H3K27me) はポリコム複合体に含まれる EZ ファミリーのヒストンメチル化酵素 (HMT, histone methyltransferase) によって触媒される。この H3K27me 修飾をもつヘテロクロマチンは、ハエからヒトまで観察され、主に発生制御に寄与する。9 番目のメチル化 (H3K9me) は Su(var)3-9 ファミリーの HMT によって触媒される。H3K9me 修飾をもつヘテロクロマチンは分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) からヒトまで観察され、ヒトでは、セントロメア周縁部などの構成的ヘテロクロマチンや、発生段階等に応じて形成される条件的ヘテロクロマチンとして存在する。

分裂酵母はもうひとつの重要なモデル生物である出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と混同されることがあるが、この2つの酵母は進化上極めて離れた関係にある。分裂酵母が出芽酵母と進化上分岐したのは3~4億年前だと見積もられており、この距離は哺乳類と真菌の距離に匹敵する⁴⁾。ヒトと出芽酵母の間では保存されていない多くの遺伝子がヒトと分裂酵母の間で保存されているなど、ヒトと分裂酵母は様々な生物学的側面において類似している。出芽酵母は分子生物学の発展に大きく貢献した生物だが、H3K9me や H3K27me を介さない独特の遺伝子サイレンシング機構を採用しているため、残念ながらヒトにおけるヘテロクロマチン形成メカニズムを理解するためのモデル生物とは言えない。一方、分裂酵母で見つかるヘテロクロマチン形成因子の多くがヒトにも見つかり、分裂酵母はヒトとよく似た分子メカニズムでヘテロクロマチンを形成すると考えられている。ただし、分裂酵母のヘテロクロマチンはヒトと違い DNA がメチル化されないため、この点には注意が必要である。

4. 分裂酵母における RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成

分裂酵母のヘテロクロマチンは、ヒトと同じで、ヒストンの脱アセチル化と H3K9me 修飾によって特徴づけられる⁵⁾。H3K9me 修飾は、それを特異的に結合するクロモドメインをもつタンパク質 (Chp1, Chp2, Clr4, Swi6) によって認識される。このうち Chp2 と Swi6 はヒトにも保存された HP1 (heterochromatin protein 1) ファミリーに属するタンパク質であり、周囲のヒストンを脱アセチル化する HDAC のリクルートメント等に寄与する。Clr4 は Su(var)3-9 ファミリーの

HMT であり, 自身のクロモドメインによって H3K9me 修飾を認識するだけでなく, 未修飾ヒストンのメチル化を触媒することで, ヘテロクロマチンの構築と拡張に貢献している。Chp1 は後述の RITS (RNA-induced transcriptional silencing) 複合体の構成因子のひとつである。分裂酵母は 3 本の染色体をもち, それぞれの染色体のセントロメア周縁部とテロメア近傍, それに加えて性決定遺伝子座に明確なヘテロクロマチン構

造が形成される。ヘテロクロマチン形成は複数の経路によって達成されるが, ここではセントロメア周縁部で主要な役割を果たす RNA 干渉 (RNAi) 依存的ヘテロクロマチン形成について述べる (図 2)。

ヘテロクロマチンは転写の起きない不活性なクロマチン領域とされているが, 分裂酵母の RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成経路では, 転写それ自体が重要な役割を果たしている⁵⁾。セントロメ

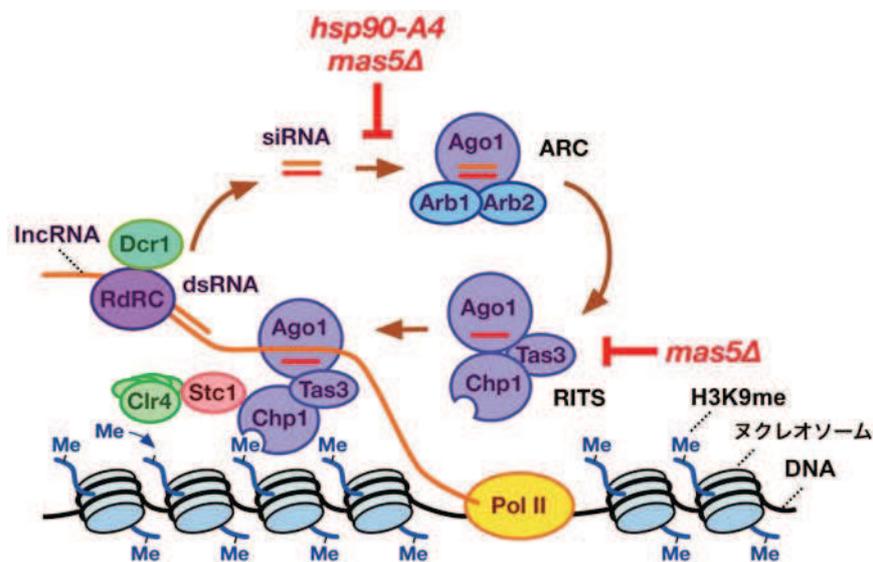


図 2. 分裂酵母の RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成機構と熱ショックタンパク質の想定作用点

siRNA を含む ARC 複合体と RITS 複合体の形成は, 分裂酵母セントロメア周縁部における RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成における重要なステップである。これらの 2 つの複合体では, Argonaute ファミリータンパク質 Ago1 が, それぞれ二本鎖 (ARC) と一本鎖 (RITS) の siRNA を保持する。クロマチンに結合しない ARC 複合体のサブユニット (Arb1 と Arb2) は, Ago1 への siRNA のローディングに関わる。Ago1 はサブユニット構成を変えてクロマチン結合型のエフェクター因子である RITS 複合体となる。RITS は, Ago1 が保持する siRNA による相同性によって, RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が転写した lncRNA に結合し, Chp1 がもつクロモドメインによって H3K9me を認識することで, 標的クロマチン領域に留まる。RITS は更に, siRNA 生産のために RdRC (RdRP complex) を呼び込み, LIM ドメインタンパク質 Stc1 を介して Clr4 HMT 複合体を呼び込んで未修飾ヒストンの H3K9me 修飾に貢献する。細胞内の siRNA 生産と H3K9me の維持は熱ショックタンパク質である Hsp90 と Mas5 を必要とする。Hsp90 と Mas5 の変異によって Ago1 に結合した siRNA が検出できなくなり, Ago1 のクロマチン局在が損なわれる。また, Ago1 と Chp1 をつなぐ Tas3 サブユニットの細胞内安定性は Mas5 に依存している。これらのことから, Hsp90 と Mas5 は分裂酵母の RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成に必要であると言える。この図は, クリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 (CC BY 4.0) ライセンスで保護された文献⁸⁾ (<https://doi.org/10.1186/s13072-018-0199-8>) から引用した。

ア周縁部では RNA ポリメラーゼ II が非コード長鎖 RNA (lncRNA, long noncoding RNA) を転写する。この転写産物は RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ (RdRP, RNA-dependent RNA polymerase) によって複製され、Dicer ファミリーに属する二本鎖 RNA 切断酵素 Dcr1 が、生じた二本鎖 RNA を 21-24 nt の長さに切断する。この短鎖二本鎖 RNA のうち片方の鎖が siRNA (small interfering RNA) として働く。Argonaute ファミリーに属するガイド RNA 依存的エンドリボヌクレアーゼ Ago1 は、2つの付随タンパク質 (Arb1 と Arb2) と共に、Dcr1 が生産した二本鎖 siRNA を取り込み、ARC (Argonaute siRNA chaperone) 複合体を形成する。次に、Ago1 から Arb1 と Arb2 が離れて Chp1 と Tas3 が結合し、片方の鎖を遊離して一本鎖となった siRNA を含む RITS 複合体が形成される。RITS 複合体は、Ago1 が保持する siRNA との相補性を利用して、クロマチンに留まる lncRNA に結合し、Chp1 のクロモドメインによって付近の H3K9me を認識する。RITS はこの領域に Clr4 HMT 複合体を連れてきて、未修飾のヒストン H3 を修飾する。

5. ヘテロクロマチン制御因子としての熱ショックタンパク質 Hsp90 と Mas5 の同定

我々は、主に順遺伝学的アプローチによってこの分野の発展に貢献してきた。例えば、RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成のために RNA ポリメラーゼ II が必須の役割を果たすことを世界に先駆けて示し、ヘテロクロマチン形成経路が転写と共役するというアイデアの構築に貢献した⁶⁾。その後も、RNA ポリメラーゼ II に結合するヒストンシャペロンである Spt6 やメディエーターがこの

経路に関わることを報告してきた⁷⁾。しかしながら、RNA ポリメラーゼ II による lncRNA の転写と RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成経路の共役についての詳細は未だに明らかになっておらず、新規因子の発見による現状打開が期待されていた。

このような背景のもと、新規に同定したのが熱ショックタンパク質の Hsp90 と、熱ショックタンパク質 Hsp40 ファミリーに属する Mas5 である⁸⁾。Hsp90 は、ヘテロクロマチン形成異常を指標とする順遺伝学的スクリーニングで発見した。Mas5 は、Spt6 相互作用因子の質量分析による探索の過程で、遺伝子破壊によりヘテロクロマチン形成異常を引き起こす因子として発見した。Hsp90 や Mas5 に変異をもつ細胞では、セントロメア周縁部における RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成経路の異常が観察される。即ち、siRNA を生産することができず、Ago1 が標的遺伝子座に留まれない。その上、H3K9me 修飾が減少し、本来抑制すべき転写が起きてしまう。また、これらの変異をもつ細胞では、Ago1 や Tas3 のタンパク質量の減少が認められるほか、ARC 複合体の形成不全も認められる。これらの表現型は、Hsp90 と Hsp40 が RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成経路で重要な役割を果たすことを示している。

RNAi と熱ショックタンパク質の関係については、主に試験管内の再構成系を用いた研究で以前から議論されてきた^{9,10,11)}。これまでに試験されたすべての生物種において、Argonaute タンパク質に siRNA をローディングして RNAi エフェクター複合体を構築するために Hsp90 が必要であることが示されている。また、ハエにおいて、Mas5 と同じ Hsp40 サブファミリーに属する Droj2 というタンパク質が RNAi エフェクター

複合体構築の促進機能をもつことが明らかになっている¹²⁾。しかしながら、以前の研究は細胞質でクロマチン制御とは独立に働く RISC (RNA-induced silencing complex) の形成に注目しており、RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成に熱ショックタンパク質が関与することが明らかになったのは今回が初めてである。

6. おわりに

これまで述べてきたとおり、分裂酵母の RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成機構においては、RdRP による二本鎖 RNA の生産が重要な位置を占める。哺乳類において分裂酵母と同様の RNAi 依存的ヘテロクロマチン形成機構が存在するかどうかについては、哺乳類のゲノム中に RdRP のホモログが見つからないことから懐疑的な見方もある一方、ウイルス由来の RdRP や、テロメラゼがもつ RdRP 活性が関与する可能性がある¹³⁾。この他にも、Argonaute タンパク質に siRNA を搭載するシステムとは若干異なるが、ハエには Piwi ファミリーに属する Argonaute 類似タンパク質に piRNA (Piwi-interacting RNA) を搭

載したエフェクター複合体がトランスポゾンへヘテロクロマチン化して抑制する機構が存在し、哺乳類にも保存されている。興味深いことに、試験管内での Piwi への piRNA 前駆体のローディングやマウス細胞内での piRNA 合成に Hsp90 が必要であることが判明している^{14,15)}。これらの知見を総合すると、低分子 RNA によって標的を決める RNAi や Piwi のシステムはエピジェネティクス制御に大きく貢献しており、これらの制御システムにおいて熱ショックタンパク質は普遍的に重要な働きをしていると考えられる。今回我々が分裂酵母をモデルとして明らかにしたように、Hsp90 等の熱ショックタンパク質の機能欠損や阻害は、クロマチンレベルでエピジェネティック制御の大幅な乱れを引き起こす。同様の事象は、ヒトを含む哺乳類や他のモデル生物においても見つかる可能性が高く、今後の研究動向が注目される。

7. 利益相反

本稿に関し開示すべき利益相反はありません。

参 考 文 献

- 1) Fraga MF, *et al.*, Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat. Genet.* 37: 391-400, 2005.
- 2) Yoshida M and Beppu T, Reversible arrest of proliferation of rat 3Y1 fibroblasts in both the G1 and G2 phases by trichostatin A. *Exp. Cell Res.* 177: 122-131, 1988.
- 3) Kallappagoudar S, *et al.*, Histone H3 mutations--a special role for H3.3 in tumorigenesis? *Chromosoma* 124: 177-89, 2015.
- 4) Hoffman CS, Wood V and Fantes PA, An Ancient Yeast for Young Geneticists: A Primer on the *Schizosaccharomyces pombe* Model System. *Genetics* 201: 403-323, 2015.
- 5) Allshire RC and Madhani HD, Ten principles of heterochromatin formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19: 229-244, 2018.
- 6) Kato H *et al.*, RNA polymerase II is required for RNAi-dependent heterochromatin assembly. *Science* 309: 467-469, 2005.
- 7) Kato H, Okazaki K and Urano T, How does Hsp 90

- function in RNAi-dependent heterochromatin assembly? *Curr. Genet.* Epub ahead of print (doi: 10.1007/s00294-018-0866-0), 2018.
- 8) Okazaki K *et al.*, RNAi-dependent heterochromatin assembly in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* requires heat-shock molecular chaperones Hsp90 and Mas 5. *Epigenetics Chromatin* 11: 26, 2018.
- 9) Iwasaki S, *et al.*, Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplex. *Mol. Cell* 39: 292-9, 2010.
- 10) Iki T, *et al.*, In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol. Cell* 39: 282-91, 2010.
- 11) Miyoshi T, *et al.*, A direct role for Hsp90 in pre-RISC formation in *Drosophila*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17: 1024-6, 2010.
- 12) Iwasaki S, *et al.*, Defining fundamental steps in the assembly of the *Drosophila* RNAi enzyme complex. *Nature* 521: 533-6, 2015.
- 13) Maida Y and Masutomi K, Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase. *Cancer Sci.* 106: 1486-92, 2015.
- 14) Izumi N, *et al.*, Hsp 90 facilitates accurate loading of precursor piRNAs into PIWI proteins. *RNA* 19: 896-901, 2013.
- 15) Ichiyanagi T, *et al.*, HSP90 α plays an important role in piRNA biogenesis and retrotransposon repression in mouse. *Nucleic Acids Res.* 42: 11903-11, 2014.