

織毛虫の大核形成(1) : *Tetrahymena* の場合

単細胞生物の 1 グループである織毛虫は大核と小核という 2 種類の核を持ち、大核は小核の DNA が大幅に再構成されて作られるという独自の生活環を持つ。小核は生殖核とも呼ばれ、二倍体ゲノムを持つ。一方大核は栄養核とも呼ばれ、小核のゲノムの遺伝子部分だけが増幅された多倍体ゲノムを持つ。栄養成長時の遺伝子の転写は全て大核で起こる。大核の再構成は接合の際に起こる。接合では、まず接合型の異なる 2 つの細胞がそれぞれ細胞質の分裂を伴わない減数分裂を行ない、核の退化、分解を経て半数体の核を 2 つ形成する。このうちの片方を接合相手の細胞に送り込むことで接合が完了する。その後、元々の大核が分解され、新しい小核から複製された DNA によって新しい大核が形成される。形成途中の大核は anlagen と呼ばれる。

Tetrahymena thermophila は貧膜口類に分類される織毛虫で、同じグループにはゾウリムシ *Paramecium* などが属する。*T. thermophila* では小核ゲノムの 15% 程度が取り除かれ、残りが 50 倍ほどに増幅されて大核が形成される。このゲノム再編成は、internal eliminated sequences (IESs) と呼ばれる配列が取り除かれて両側の DNA がつながれる反応と、染色体が切断され、末端配列 breakage eliminated sequences (BESs) が削られた後にテロメアが付加される反応の 2 種類の反応によって進行する。IES はゲノム中に 6000 カ所ほどあり、長さは 0.5kb から 20kb 以上にわたる。BES は 50bp 未満の短い配列であり、染色体の切断によって単数体当たり 5 本の小核染色体から、200~300 個の大核染色体が形成される。BES は 15bp の保存配列 chromosome breakage sequence (Cbs) により認識できる。BES を認識する蛋白質は未同定だが、エンドヌクレアーゼを呼び込み、Cbs 付近で染色体が切断された後、テロメラナーゼによってテロメア反復配列が付加されると考えられている。一方、IES には明瞭な保存配列は認められない。

IES の除去に特定の配列が必要でないことは、実験的に外来 DNA を小核に導入する実験で確かめられた (Yao et al. 2003)。Yao らは *T. thermophila* の小核ゲノム中に 1.5kb の外来 DNA を挿入した。そして外来 DNA を小核に持つが、大核には持たないような細胞を作り、接合させた。接合後の細胞の大核では、外来 DNA が取り除かれていた。他の座位に外来 DNA を挿入した場合にも外来 DNA は大核形成の際に除去されていた。この実験で外来 DNA が 1 コピーしかない場合でも大核から除去できることが示された。

最初に大核形成との関係が示された遺伝子は PDD1 である。なお、ここでは簡便のため遺伝子名と蛋白質名に同じ表記を使用する。programmed DNA degradation の略から PDD と名付けられた遺伝子はこれまでに 3 つ報告されているが、PDD1 はその最初に見つかったものである。PDD1 の全長配列と、PDD1

の局在の時期と場所が IES の除去と一致することは、Madirredi らの解析で示された (Madireddi et al. 1996)。PDD1 は 2 つの chromodomain を持つ蛋白質をコードしている。PDD1 を大核から除去したノックアウト細胞は、栄養成長では野生株と違いがない (Coyne et al. 1999)。しかし、接合させると、接合後の分裂までは正常に進むものの通常の体細胞分裂が出来ず死に至る。また、大核形成の状態を調べると、IES の除去は不完全にしか行なわれていなかった。一方、BES の除去とテロメア反復配列の付加には異常は無かった。実際、クロマチン免疫沈降法で PDD1 蛋白質が IES には局在するが BES には局在しないことが確かめられている (Nikiforov et al. 2000)。

2 番目の PDD 遺伝子、PDD2 は免疫沈降法により、PDD1 と結合する蛋白質として同定された (Smothers et al. 1997)。PDD1 との結合が観察された PDD2 は、大核形成の間にリン酸化状態が大きく変化する。PDD2 の局在は PDD1 とほぼ同じで形成中の大核に多い。しかし、PDD1 がアポトーシス中の旧大核にも観察されるのに対して、PDD2 は観察されない。PDD1 と同様、PDD2 の大核ノックアウト細胞でも接合後に細胞が分裂できず死に至る (Nikiforov et al. 1999)。PDD2 ノックアウト細胞では、IES の除去は不完全にしか起こらず、BES の除去とテロメア反復配列の付加も認められなかった。

見つかっている最後の PDD、PDD3 は chromodomain を 1 つだけ持つ蛋白質をコードしている (Nikiforov et al. 2000)。この PDD3 は他の 2 つと異なり、大核形成の後期から発現する。PDD3 も PDD1 と同様、IES には局在するが BES には局在しない。

近年になって、IES の除去に RNAi と同様の機構が関わっていることを示す証拠が蓄積されてきている。*T. thermophila* では接合開始の直後から接合後期まで、28 塩基程度の短い RNA が観察できる (Mochizuki et al. 2002; Mochizuki and Gorovsky 2004)。この RNA は scan RNA (scnRNA) と名付けられた。面白いことに scan RNA は接合の進行に従って、大核にハイブリダイゼーションする割合が減少し、小核にハイブリダイゼーションする割合が増加する。これは大核の配列と一致する scan RNA が選択的に分解されていることを示唆する現象である。

RNAi で主要な役割を果たす PIWI の *T. thermophila* ホモログである TWI1 蛋白質が scan RNA と結合することが、免疫沈降法で確かめられた。TWI1 蛋白質にタグを付けて免疫沈降を行なうと scan RNA の半分以上と一緒に沈降する。DNase を加えても沈降に変化がないこと、他の蛋白質が共沈してこないことも確かめられたので、TWI1 蛋白質は scan RNA と直接結合している。TWI1 は接合初期に転写され、接合以外の時期には発現しない。実際、栄養成長期には TWI1 遺伝子欠損細胞でも増殖に影響は出ない。しかし、接合させると分裂できないまま死んでしまう。TWI1 蛋白質は接合時に古い大核から新しい大核へと移動す

る。このような性質は PDD1 や PDD2 と共通する。TWI1 遺伝子を破壊すると、scan RNA の量は大きく減少する。しかし、TWI1 遺伝子を破壊しても scan RNA は少量ながら観察されるのも事実である。小核、大核両方の TWI1 を破壊してしばらく継代しても scan RNA は完全には失われないことから TWI1 は scan RNA の合成ではなく、安定性に寄与している可能性が高い。

RNAi で PIWI/Argonaute ファミリーの蛋白質とともに重要な役割を果たす Dicer ファミリーの蛋白質は *T. thermophila* ゲノム配列に 3 種類コードされていた (Mochizuki and Gorovsky 2005)。内 2 つ(DCR1、DCR2)は他の生物の Dicer と同様に、N 末側に RNA ヘリカーゼ、C 末側に 2 つの RNase III ドメインを持っていた。もう一つの Dicer 様遺伝子 DCL1 は N 末側の RNA ヘリカーゼをコードしていなかった。この 3 遺伝子の内、接合期特異的に発現するのは DCL1 のみで、scan RNA の蓄積する時期とちょうど一致する時期に発現が認められた。TWI1 と逆に、DCL1 蛋白質は接合期に小核に局在した。DCL1 を破壊した細胞でも栄養成長期には大きな影響は出ないが、小核の維持に問題が生じる。DCL1 破壊細胞では、染色体の分離や、小核が細長く伸びる現象、染色体の凝集にも異常が現れる。また、scan RNA が観察不可能なまで減少し、代わりに小核からの長い転写産物が増加する。これは、小核の転写産物を DCL1 蛋白質が切断し、scan RNA を生成しているためであると考えられる。

実験的に dsRNA を導入することで大核から除去される DNA を制御することもできる (Yao et al. 2003)。IES ではない、大核に残るべき配列を持った dsRNA を接合中の細胞に導入すると、dsRNA に対応する配列が大核から除去される。この除去の効率は導入の時期によって異なり、大核形成のより早い時期に導入するほど効率が高い。

前述の様に、接合期特異的に発現し、除去される DNA 領域に局在する蛋白質として 3 種類の蛋白質 (PDD1、PDD2、PDD3) が同定されている。この内、PDD1 と PDD3 は chromodomain を持つ蛋白質であることから、除去される領域のマーカーとして、ヒストンのメチル化が働いているのではないかという推測が成り立つ。実際、PDD1 と PDD3 の 2 つの蛋白質は 9 番目のリシン残基がメチル化されたヒストン H3 (H3K9me3) に結合する (Taverna et al. 2002)。この 9 番目のリシン残基のメチル化は接合期特異的に、新しい大核内で、除去される DNA 領域 (調べられたのは IES のみで BES については調べられていない) でのみ見られる。PDD1 蛋白質と H3K9me3 とは共局在し、PDD1 遺伝子破壊株ではメチル化が減少する。これは PDD1 蛋白質がメチル化されたヒストンを守っているためと考えられている。このヒストン H3 の 9 番目のリシンをグルタミンに置換した株では、新しい大核形成の際に IES の除去の効率が極端に悪くなることも証明されている (Liu et al. 2004)。

PDD1 は 3 つの chromodomain を持っている。この事実と対応するのかわからないが、PDD1 蛋白質は 9 番目のリシン残基がメチル化されたヒストン H3 (H3K9me3) だけでなく、27 番目のリシンがメチル化されたヒストン H3 (H3K27me3) にも結合する (Liu et al. 2007)。H3K9me3 と異なり、H3K27me3 には PDD3 は結合しない。H3K27me3 はヘテロクロマチンに広く分布するが、接合期の形成中の大核においては次第に IES 領域に凝集する。この 27 番目のリシンのメチル化は、Polycomb ファミリーの遺伝子の 1 つ E(z) の *T. thermophila* ホモログ 3 遺伝子の内の 1 つ、EZL1 によって触媒される。E(z) はヒストンのリシンをメチル化する酵素である。EZL1 遺伝子破壊株では、27 番目のリシンのメチル化が見られなくなるだけでなく、9 番目のリシンのメチル化も見られなくなることから、EZL1 は 9 番目のリシンのメチル化も触媒している可能性がある。EZL1 遺伝子破壊株では、IES の除去に加えて、Cbs での染色体の切断、テロメア反復配列付加も見られなくなる。また、H3K27me3 が IES から失われるため、PDD1 蛋白質も IES 領域に局在できなくなる。

ヒストン H3 の 9 番目のリシンをグルタミンに置換した株でも、27 番目のリシン残基のメチル化は影響を受けない。27 番目のリシンを置換した株は生育できなかったため代わりに作成した、28 番目のセリンをグルタミン酸に置換した株 (S28E) では、立体障害のため、PDD1 蛋白質と PDD3 蛋白質がヒストン H3 に結合できなくなる。この株では、ごく一部しか IES の除去が起こらない。S28E では、27 番目のリシンのメチル化は予想通り阻害されたが、予想に反して、9 番目のリシンがメチル化されたヒストン H3 が大量に増加し、除去される領域より外側に広がった。これは、ヒストン H3 の 27 番目のリシンのメチル化によって 9 番目のリシンのメチル化が制御されていることを示している。

RNAi 関連遺伝子とヒストンメチル化との関係からは、scan RNA の存在が、ヒストンメチル化を制御しているという順序を知ることができる。ヒストン H3 の 9 番目のリシン残基のメチル化は TWI1 遺伝子や DCL1 遺伝子の破壊により失われる (Liu et al. 2004; Liu et al. 2007)。また、TWI1 遺伝子や DCL1 遺伝子を破壊すると 27 番目のリシンのメチル化が著しく減少する (Liu et al. 2007)。一方、EZL1 遺伝子破壊では、scan RNA の量に変化は見られない。ただし、PDD1 遺伝子破壊株では、scan RNA の蓄積量が減少する (Mochizuki et al. 2003) ことから、scan RNA からヒストンメチル化への一方向の流れだけでなく、フィードバック経路があることがうかがえる。

以上の結果から想定されるモデルは以下のようなものである。小核での転写により長い dsRNA が合成される。dsRNA は DCL1 によって切断され、scanRNA となり、古い大核へ移動する。古い大核内では、scanRNA の内、古い大核の DNA にある配列が特異的に分解される。大核が持たない配列だけになった scanRNA はその後、TWI1 と結合して新しく形成中の大核に移動する。新しい大核では、

scanRNA の配列と同じ DNA 配列の領域のヒストン H3 の 27 番目のリシンが EZL1 によってメチル化される (H3K27me3)。この H3K27me3 の存在している領域でのみ 9 番目のリシンがメチル化される (H3K9me3)。H3K9me3 には PDD1 と PDD3 が、H3K27me3 には PDD1 が chromodomain を介して結合する。このようにしてマークされた DNA 領域をエンドヌクレアーゼが切断し、両末端をリガーゼがつなぐ。以上が IES の想定される除去機構である。BES の認識には、PDD1 や PDD3 は関わっておらず、PDD2 の関与が指摘されているが、メチル化との関連は報告されていない。どうやら少なくとも下流の機構は 2 本だてになっているようである。

Yao MC, Fuller P, Xi X.

Programmed DNA deletion as an RNA-guided system of genome defense.

Science. 2003 Jun 6;300(5625):1581-4.

Madireddi MT, Coyne RS, Smothers JF, Mickey KM, Yao MC, Allis CD.

Pdd1p, a novel chromodomain-containing protein, links heterochromatin assembly and DNA elimination in Tetrahymena.

Cell. 1996 Oct 4;87(1):75-84.

Coyne RS, Nikiforov MA, Smothers JF, Allis CD, Yao MC.

Parental expression of the chromodomain protein Pdd1p is required for completion of programmed DNA elimination and nuclear differentiation.

Mol Cell. 1999 Nov;4(5):865-72.

Nikiforov MA, Gorovsky MA, Allis CD.

A novel chromodomain protein, pdd3p, associates with internal eliminated sequences during macronuclear development in Tetrahymena thermophila.

Mol Cell Biol. 2000 Jun;20(11):4128-34.

Smothers JF, Mizzen CA, Tubbert MM, Cook RG, Allis CD.

Pdd1p associates with germline-restricted chromatin and a second novel anlagen-enriched protein in developmentally programmed DNA elimination structures.

Development. 1997 Nov;124(22):4537-45.

Nikiforov MA, Smothers JF, Gorovsky MA, Allis CD.

Excision of micronuclear-specific DNA requires parental expression of pdd2p and occurs independently

from DNA replication in *Tetrahymena thermophila*.

Genes Dev. 1999 Nov 1;13(21):2852-62.

Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA.

Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in *Tetrahymena*.

Cell. 2002 Sep 20;110(6):689-99.

Mochizuki K, Gorovsky MA.

Conjugation-specific small RNAs in *Tetrahymena* have predicted properties of scan (scn) RNAs involved in genome rearrangement.

Genes Dev. 2004 Sep 1;18(17):2068-73.

Mochizuki K, Gorovsky MA.

A Dicer-like protein in *Tetrahymena* has distinct functions in genome rearrangement, chromosome segregation, and meiotic prophase.

Genes Dev. 2005 Jan 1;19(1):77-89.

Taverna SD, Coyne RS, Allis CD.

Methylation of histone h3 at lysine 9 targets programmed DNA elimination in *Tetrahymena*.

Cell. 2002 Sep 20;110(6):701-11.

Liu Y, Mochizuki K, Gorovsky MA.

Histone H3 lysine 9 methylation is required for DNA elimination in developing macronuclei in *Tetrahymena*.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Feb 10;101(6):1679-84.

Liu Y, Taverna SD, Muratore TL, Shabanowitz J, Hunt DF, Allis CD.

RNAi-dependent H3K27 methylation is required for heterochromatin formation and DNA elimination in *Tetrahymena*.

Genes Dev. 2007 Jun 15;21(12):1530-45.

2008/04/21

小島 健司 著
禁 無断複写転載