

液-液相分離を介したクロマチン構造と機能の制御

野澤 竜介^{1*}・原 幸大²・丁 大橋³

1. はじめに

生物の遺伝情報伝達の流れは、DNAからRNA、そしてタンパク質へという、一方向で描かれるセントラルドグマの単純な図式で理解されているが、それだけでは説明することができない遥かに複雑な仕組みによって制御されている。DNA配列に変化がなくても、遺伝情報の産物であるRNAやタンパク質が、遺伝子発現を制御・維持し、それらを次世代に伝える、といったエピジェネティックなメカニズムがその一例である。またプリオンタンパク質は、異常に折りたたまれた自身のタンパク質構造を、正常に折りたたまれたタンパク質に伝え、さらにそれが伝播し、アミロイド繊維の形成を誘導する、といったタンパク質間の情報伝達も知られている。これらの仕組みを制御する原動力の一つとして、液-液相分離が近年注目されている¹⁻³⁾。さらに、細胞を構成する細胞小器官の中には、核小体をはじめとして、膜を持たない構造体が数多く存在することが知られているが、それらの形成、維持そして機能制御もまた液-液相分離で説明され始めている⁴⁾。

細胞内の液-液相分離は、主に核酸やタンパク質などが持つ電荷の偏りから生じる静電的に引き合う力によって引き起こされ、多数の分子の集合体や、細胞内構造体の形成を促すとされる。分子の集合のメカニズムや集合体の機能については未だ知見が限られているが、特定のタンパク質や核酸を液-液相分離を介して局所に濃縮することで、生化学的な反応を効率よく進めるための「場」が作られると考えられる⁴⁻⁷⁾。そこで本稿では、遺伝子発現制御、DNA複製と分配、そしてDNA損傷修復といった細胞の基本機能の土台となるクロマチン構造の制御と、液-液相分離との関係に焦点を当て、最近の知見を紹介する。

2. クロマチン構造の新たなモデル

ヒトの一つの核に含まれるゲノムDNAは、すべてつなぎ合わせると約2 mにも及ぶ。直径約10 μm程の核に、DNAが如何に折りたたまれて収納されているのかという問いに対して、長い年月にわたり研究が進められてき

た。なぜなら、DNAの折りたたみはDNAの遺伝情報の検索や読み取りに影響するためである。DNAは、その構造にリン酸基を持つため負の電荷を有し、塩基性アミノ酸を多く含み正の電荷を有するヒストン八量体に巻きつきヌクレオソームを形成する(図1A)。これまで、そのヌクレオソームを基本単位とするクロマチンは、規則正しく折りたたまれ、それらが階層構造をとり、さらにコンパクトに折りたたまれていると考えられてきた(図1A)。しかし、超解像顕微鏡を用いた生細胞観察から、クロマチンは流動的で不規則に振る舞う直径約160 nm程の構造体であるというモデルが新たに提案された(図1B)⁸⁾。このモデルは、クロマチンが遺伝子発現をはじめとする、さまざまな生化学的な反応に適した形に柔軟に構造変換する可塑性を有することを想像させる⁹⁾。

このモデルをサポートするように、ヌクレオソームが試験管内において液-液相分離することが観察された¹⁾。DNAの持つ負の電荷と、ヒストンテイルの正の電荷との間の静電相互作用が液-液相分離を誘導する一因であると思われる。また、DNAの負電荷は、正電荷を持つヒストン八量体に巻き付いても半分程度にしか中和されないとされ¹⁰⁻¹²⁾、この残りのDNAの負電荷が、DNAの折りたたみを調節するための“のりしろ”と考えることができる。ヌクレオソーム間のDNAに結合するリンカーヒストンH1は、ヌクレオソームの液-液相分離を促進したことから、クロマチンの集合を制御する役割を果たすと考えられる。一方で、ヒストンのリシン残基を

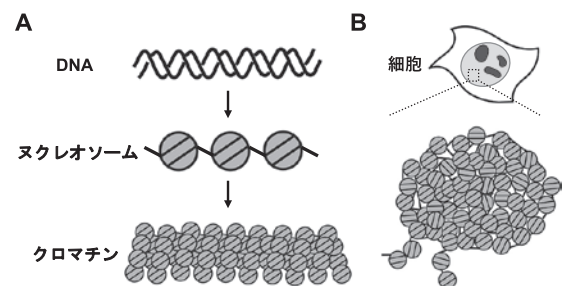


図1. クロマチン構造の新旧モデル。A:旧モデル。ヌクレオソームは規則正しく折りたたまれファイバー状の構造体を形成する。B:新モデル。ヌクレオソームは流動的で不規則に振る舞う構造体を形成する。

著者紹介 ¹公益財団法人がん研究会がん研究所実験病理部(研究員) E-mail: ryusuke.nozawa@jfcr.or.jp

²静岡県立大学薬学部(講師) E-mail: khara@u-shizuoka-ken.ac.jp

³情報通信研究機構未来ICT研究所バイオICT研究室(主任研究員) E-mail: ding@nict.go.jp

アセチル化すると、ヌクレオソームの液-液相分離が阻害された。さらに、アセチル化ヒストンを認識する転写因子BRD4を加えると、ヒストン八量体とDNAは新たにBRD4と液-液相分離し、アセチル化していないヌクレオソームとの液-液相分離とは融合せず、独立した液滴を形成した¹⁾。この観察は、物理的に近接していても性質や機能的に異なるクロマチン環境を、液-液相分離を介して作り出すことができることを示唆する重要な知見である。

3. クロマチンの凝縮と脱凝縮の分子メカニズム

ヘテロクロマチンは、細胞周期を通して凝縮したクロマチン領域として知られ、そのクロマチンの凝縮状態を周囲に伝播し、また転写に対して抑制的に働く機能が如何に制御されているのかが長く注目されてきた。HP1 (Heterochromatin protein 1) はヘテロクロマチンの主要な構成タンパク質の一つとして知られている。HP1は、N末端側のクロモドメイン (CD) で、ヘテロクロマチンのマークであるヒストンH3の9番目のリシンのメチル化 (H3K9me3) を認識し¹³⁾、またC末端側のクロモシャドウドメイン (CSD) で二量体を形成する (図2A)¹⁴⁾。HP1は二量体形成の際にできる疎水性表面を介して特定のタンパク質と結合し、ヘテロクロマチンに多くのタンパク質を呼び込むことが知られ、これまでにNozawaらはプロテオミクス解析により82種類のHP1結合タンパク質を同定した¹⁵⁾。

2017年に、HP1が液-液相分離することが観察され、この現象がヘテロクロマチンの形成に寄与するという仮説が提唱された^{16,17)}。この報告は液-液相分離の概念をクロマチン研究分野にもたらすきっかけの一つとなった。さらに続報として、分裂酵母のHP1 (Swi6) のCSDが、ヒストンH2Bに結合することで、ヒストン八量体の立体構造変換を誘導し、その結果、ヌクレオソームの液-液相分離を促進することが示された²⁾。HP1との結合により埋没していたヒストンのアミノ酸残基が露出し、新たな静電相互作用が生まれたものと解釈される。この発見により、HP1は液-液相分離を介してヌクレオソームを液滴内に濃縮することが観察された。HP1がクロマチンの凝縮に寄与することを直接的に示す傍証である (図2A)。

顕微鏡で観察されるような、メガベーススケールのヘテロクロマチン形成の分子メカニズムは未だ説明されていない。HP1の足場であるH3K9me3を導入するヒストンメチル化酵素SUV39HをHP1自らが呼び込むことから、HP1が積極的にヘテロクロマチンを広げるとい

モデルが提案されている¹⁸⁾。加えて、HP1のRNAへの親和性もまたヘテロクロマチン形成への寄与に着目されている^{19,20)}。またポリマーモデリング解析により、クロマチンはヌクレオソーム同士がタンパク質などにより橋渡しされることで、その近傍に橋渡しされやすい環境がさらに生まれ、その反応が繰り返されて凝縮したクロマチンの区画が作り出されると説明される (ポリマー-ポリマー相分離)^{21,22)}。実験で証明するには容易ではない多くのパラメータが、ヘテロクロマチンの形成に関わっているものと想像される。

HP1による転写抑制機構についても未だ不明な点が多いが、HP1が形成する集合体は転写因子TFIIBと親和性が低いことが示されており^{17,23)}、HP1が作り出す場は転写因子が集合しにくい環境であると予想される。また、Aurora BキナーゼによるヒストンやHP1のリン酸化は、細胞が分裂期に入る際、クロマチンからのHP1の解離を誘導する^{24,25)}。負の電荷を持つリン酸基により、HP1同士、HP1とヒストンとの静電相互作用のバランスが変化し、HP1のクロマチンからの解離を誘導したものと解釈できる。液-液相分離によって形成された集合体の持つ相互作用の選択性や、その集合と解離がダイナミックに制御される可塑性は、着目すべき特徴である。

ヘテロクロマチンが積極的にその凝縮状態を周囲に広げるのであれば、脱凝縮しているユークロマチンはそれに対して競合、または防ぐシステムを備えていることが予想される。これまでにNozawaらは、ヒトの細胞核において、転写に伴いクロマチン構造が脱凝縮することを

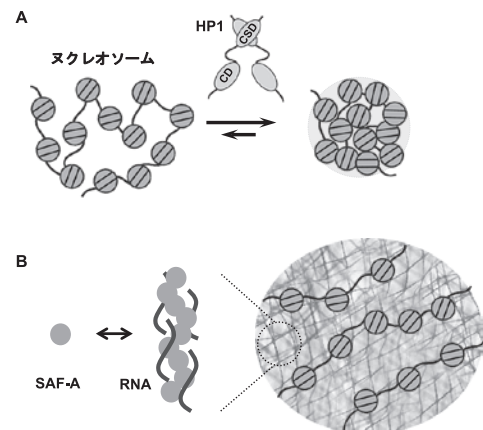


図2. クロマチン凝縮モデルと脱凝縮モデル。A: HP1はクロモシャドウドメインを介して二量体を形成し、ヌクレオソームに結合し液-液相分離を促進する。結果として、集合体内のヌクレオソームの濃度が高くなる。B: SAF-AはRNAとともに繊維状のオリゴマーを形成する。SAF-A/RNAオリゴマーは、メッシュ状の構造体を形成し、クロマチンの脱凝縮状態の保持に寄与する。

見いだし、そのメカニズムの一端を明らかにした²⁶⁾。かつて、核マトリクスと呼ばれる不溶性タンパク質と核内のRNAによる構造体が、クロマチンの裏打ち構造として、そして遺伝子発現の制御の足場として重要な役割を果たすというモデルが提唱された^{27,28)}。しかし、生細胞において核マトリクスの存在が証明されず、クロマチン構造の制御メカニズムや、生物学的反応の場の形成原理に新たな解釈が必要とされていた。Nozawaらは、核マトリクスの構成因子として同定されていたSAF-A (scaffold attachment factor A) /hnRNP Uに着目し、SAF-Aが自身のATPaseドメインによるATPとの結合と転写に伴ったRNAとの結合により繊維状のオリゴマーを形成する活性を持つことを見いだした。さらに、SAF-Aのオリゴマー化が転写活性領域のクロマチン構造の脱凝縮に必要であることが明らかとなったことから、SAF-A/RNA複合体はメッシュ状の構造体を形成することでクロマチン構造を制御することが予想された(図2B)²⁶⁾。続く、SAF-Aの動態解析とシミュレーション解析により、SAF-A/RNA複合体は、実際の核内ではゲルのように振る舞うことが予測された。クロマチンの脱凝縮した構造は、SAF-A/RNA複合体によって作りだされる粘度の高い局所環境によって保持されると想定し²⁹⁾、さらなる解析を続けている。

4. クロマチン高次構造とクロマチン機能

近年、クロマチンどうしのコンタクト頻度をゲノムワイドに決定し、クロマチンの三次元構造を予測するHi-C技術がブレークスルーとなり、クロマチンの高次構造に関する研究が進んだ。Hi-C解析により、数Mbの単位のゲノム領域どうしが集まった、コンパートメントと呼ばれるまとまりを形成することが示された³⁰⁾。興味深いことに、転写活性の高い領域どうし、低い領域どうしでコンパートメントを形成していたことから、それぞれA/Bコンパートメントと名付けられた。それだけではなく、1細胞レベルのゲノムワイド解析から、S期の前半に複製されるゲノム領域はAコンパートメント、後半に複製されるゲノム領域はBコンパートメントとよく一致することも明らかとなった³¹⁾。クロマチンの高次構造は、その形成機構は未だ不明であるが、クロマチン機能の制御と連動していることが明らかになりつつある。

さらなる解析から、A/Bコンパートメントは、TAD (topologically associated domain) と呼ばれる数百~1 Mbのドメインで構成されていることがわかってきた³²⁾。TADの形成のメカニズムとして、loop extrusion仮説が提唱されている³³⁾。コヒーシと呼ばれるリング状構造の

SMC (structural maintenance of chromosomes) タンパク質複合体に、クロマチンが取り込まれてループが形成され、クロマチンとコヒーシンの間の相対移動によってループが拡大し、それがTAD形成に寄与するという説である。SMC複合体は、他にコンデンシン、SMC5/6が知られ、コンデンシンもまたループ形成の活性を持つことが示されている³⁴⁾。以前より、コヒーシンは複製後の姉妹染色体接着、コンデンシンは分裂期染色体構造の構築に必要であると知られていたが、細胞周期特異的なクロマチン構造構築のメカニズムが解き明かされつつあるかもしれない。また、これまでにHaraらは、コヒーシンのサブユニットであるSA2-SCC1複合体、および、コンデンシンのサブユニットであるCAP-G-CAP-H複合体の結晶構造を明らかにした^{35,36)}。どちらの複合体もリング状複合体を閉じる留め具にあたり、HEATリピートと呼ばれる2本の両親媒性(親水・疎水)のアルファヘリックスが十数回繰り返されてソレノイド状に並んだ弾力性に富む構造を持つことが示された。構造情報に基づきSMC複合体を形成できない変異体を作製し、クロマチン高次構造への影響を調べたところ、これらの変異体は姉妹染色体の非接着や異常な染色体凝縮を起こした。HEATリピートは真核生物型のSMC複合体にのみ保存されたサブユニットであり、このことは真核細胞のクロマチン高次構造の形成機構を考えるうえで興味深い。天然変性領域がお互いを引き寄せ合い、液-液相分離するように、HEATリピートが集合し、ダイナミックなクロマチン構造変換を誘導する構造体を形成するといった非常に興味深い予測³⁷⁾もされており、SMC複合体もまたお互いを引き寄せることでその機能を発揮することを予感させる。

クロマチン機能においては、液-液相分離との、より直接的な関係が見えてきている。転写活性の場の形成は、複数のエンハンサーがクラスターを形成したスーパーエンハンサーに代表されるように、液-液相分離で説明されている³⁸⁾。転写の実行酵素であるRNAポリメラーゼII (Pol II)、FETファミリータンパク質 (FUS, EWS, TAF15) をはじめとした転写因子、そしてスーパーエンハンサーを構成するとされるメディエーター因子MED1や転写因子BRD4などが、自身らの持つ天然変性領域を介して液-液相分離し、また核内にクラスターを形成することが相次いで報告された³⁹⁻⁴¹⁾。核内で集合体どうしが分単位のオーダーで近づき離れるというダイナミックな挙動も特筆すべき観察である⁴²⁾。また上記と同様に、集合体間の相互作用には選択性があり、リン酸化による制御を受ける。Pol IIのC末端ドメインは、7つのアミノ酸 (YSPTSPS) が哺乳

類では52回繰り返される低複雑性の天然編成領域であり、その集合体形成の中心的な役割を担う。転写伸長に応じて段階的にリン酸化されることが知られているが、そのリン酸化により、転写因子から解離し、スプライシング因子と複合体を形成することが明らかとなった⁴³⁾。これらの観察により、Pol IIの液-液相分離を中心とした転写のダイナミックな制御メカニズムが見えてきている。

DNA複製やDNA損傷修復に関しては、液-液相分離との関連が観察され始めている。複製開始因子(ORC, Cdt1, Cdc6)はDNA依存的に液-液相分離を引き起こし、複製オリジン同士の組織化とそれらのコミュニケーションに寄与することが報告された⁴⁴⁾。また、DNA損傷修復に寄与する53BP1は、液滴様の振る舞いをするDNA損傷コンパートメントを形成することが観察された⁴⁵⁾。

クロマチン機能の土台となるクロマチン構造、そしてその機能制御に液-液相分離が密接に関わっていることは明らかである。

5. 相同染色体の認識・対合に液-液相分離が寄与する

クロマチン構造変化がもっとも激しく変化するのは、減数分裂期の前期である。減数分裂期前期にDNA複製、相同染色体の対合と組換え、シナプシスなど複雑なプロセスが次々に行われる。相同染色体の対合は、親世代から受け継いだ相同染色体が互いを見つけて接着する過程であり、正常な対合が相同組換えに不可欠である。しかし、相同染色体がどのようにお互いを認識して対合するのかほとんど不明である。

これまでにDingらは、分裂酵母を用いて対合に非コードRNAが重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた。分裂酵母では、核融合と同時にテロメアがスピンドル極体に集まり、ブーケの形状をとるホーステール核(horsetail nucleus)と呼ばれる細長い核が形成される。分裂酵母のホーステール期は、減数分裂期前期に相当し、核が往復運動しながら相同染色体の対合・組換えが行われる。変異体を用いた生細胞観察により、テロメアクラスターの形成と核運動は、相同染色体を空間的に近づかせることに必要であり、安定な染色体対合に寄与することを示した⁴⁶⁾。続く解析では、第2染色体の*sme2*遺伝子座が、テロメア付近よりも高い対合頻度を示すことを見だし、そのロバスタな対合には、*sme2*遺伝子座から転写される長鎖非コードRNA(lncRNA)である*sme2* RNAが必要であることを明らかにした⁴⁷⁾。*sme2* RNAは*sme2*遺伝子座に集積することが観察され(図3A)、*sme2* RNAが形成する集合体が相同染色体の対合を積極

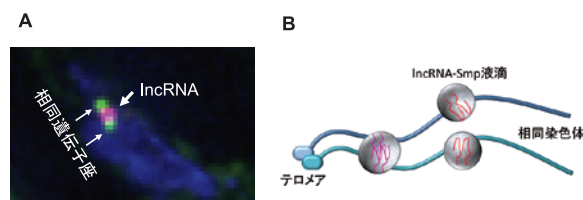


図3. 相同染色体の認識・対合に液-液相分離が寄与する。A: 相同染色体はIncRNAを介してリンクされている。IncRNAはsmFISHによって、相同遺伝子座はlacO/LacI-GFPによって可視化した。B: テロメアクラスターによって同じ方向に揃った相同染色体が、同じ位置に形成されたIncRNA-Smpの液滴の融合を介して認識・対合を行う。

的に促進することが示唆された。

興味深いことに、この*sme2* RNA集合体は液-液相分離により形成されることがごく最近明らかになった⁴⁸⁾。まず、RNA転写終結因子であり、複数存在するSmpタンパク質群(*sme2* RNA-associated proteins)が、*sme2* RNA集合体の形成に必要であることが明らかとなった。さらに解析を進めると、Smpタンパク質群は、*sme2*遺伝子座以外にも結合サイトが複数あり、それらのサイトから転写されるIncRNAもまたSmpタンパク質群と集合体を形成し、対合に必要であることを見いだした。実際に、Single molecule RNA fluorescence in situ hybridization (smFISH)を用いて、*sme2* RNAおよび新規に同定されたIncRNAが高頻度に相同染色体をリンクしていることを確認している(図3A)。これらの集合体の構成因子は、液-液相分離を阻害する1,6-hexanediol処理によって対合していた相同染色体から可逆的に分離することが観察された。つまりこれらの結果は、IncRNA-Smp複合体は液-液相分離を介して集合体を形成し、その集合体形成が相同染色体を互いに引きつける原動力を生み出していることを示唆している。さらに、異なるIncRNAを含む集合体どうしは融合せず、対合も促進しないことからIncRNAが対合の特異性を決めていると思われる(図3B)。

このように、RNAをノリとしてバーコード状に染色体上に配置し、相同染色体を認識対合させるメカニズムは、まさに進化の過程で獲得した生物の優れた知恵とも言えるだろう。ほ乳類の雌では、二つのX染色体のどちらか一方がランダムに不活性化されるが、その過程でTsixRNAの発現とX染色体上への蓄積に依存的にX染色体どうしが一時的に対合することが知られている⁴⁹⁾。これに同様のメカニズムが働いている可能性があり、今後の検証が待たれるところである。

おわりに

この数年の間に、特にクロマチン研究分野から液-液相分離に関する報告が相次ぎ、クロマチンを構成するタンパク質を中心に、分子が本来持つ性質やそれによる振る舞いについての理解が進んだ。しかしながら、細胞を用いた解析に関しては、核内におけるクロマチンタンパク質の液-液相分離現象の観察の記述に終始しており、その生物学的意義に迫る報告は未だ少ない。それは、細胞内でのタンパク質の液-液相分離を計測・解析する技術が限られていること、加えて、細胞内の液-液相分離を人為的に誘導・阻害といった制御する手法が確立されていないことに起因すると思われる。液-液相分離は多くの学問分野の興味をつなぐ現象である。研究者達がそれぞれの専門性を活かし協同し、液-液相分離の新たな研究の手立ての開発と、その先にある生命現象の理解の進展が大いに期待される。

文 献

- 1) Gibson, B. A. *et al.*: *Cell*, **179**, 470 (2019).
- 2) Sanulli, S. *et al.*: *Nature*, **575**, 390 (2019).
- 3) Franzmann, T. M. *et al.*: *Science*, **359**, eaao5654 (2018).
- 4) Banani, S. *et al.*: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**, 285 (2017).
- 5) Li, P. *et al.*: *Nature*, **483**, 336 (2012).
- 6) Shin, Y. and Brangwynne, C. P.: *Science*, **357**, eaaf4382 (2017).
- 7) Brangwynne, C. P. *et al.*: *Science*, **324**, 1729 (2009).
- 8) Nozaki, T. *et al.*: *Mol. Cell*, **67**, 282 (2017).
- 9) Prieto, E. I. and Maeshima, K.: *Essays Biochem.*, **63**, 133 (2019).
- 10) Khrapunov, S. N. *et al.*: *Biochim. Biophys. Acta*, **1351**, 213 (1997).
- 11) Everaers, R. and Schiessel, H.: *J. Phys. Condens. Matter*, **27**, 060301 (2015).
- 12) Maeshima, K. *et al.*: *Chromosoma*, **123**, 225 (2014).
- 13) Lachner, M. *et al.*: *Nature*, **410**, 116 (2001).
- 14) Brasher, S. V. *et al.*: *EMBO J.*, **19**, 1587 (2000).
- 15) Nozawa, R. S. *et al.*: *Nat. Cell. Biol.*, **12**, 719 (2010).
- 16) Strom, A. R. *et al.*: *Nature*, **547**, 241 (2017).
- 17) Larson, A. G. *et al.*: *Nature*, **547**, 236 (2017).
- 18) Nakayama, J. I. *et al.*: *Science*, **292**, 110 (2001).
- 19) Maisson, C. *et al.*: *Nat. Genet.*, **43**, 220 (2011).
- 20) Shirai, A. *et al.*: *Elife*, **6**, e25317 (2017).
- 21) Brackley, C. A. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 3605 (2013).
- 22) Erdel, F. and Rippe, K.: *Biophys. J.*, **114**, 2262 (2018).
- 23) Wang, L. *et al.*: *Mol. Cell*, **76**, 646 (2019).
- 24) Hirota, T. *et al.*: *Nature*, **438**, 1176 (2005).
- 25) Nishibuchi, G. *et al.*: *J. Biochem.*, **165**, 433 (2019).
- 26) Nozawa, R. S. *et al.*: *Cell*, **169**, 1214 (2017).
- 27) Berezney, R. and Coffey, D. S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **60**, 1410 (1974).
- 28) Pederson, T.: *J. Mol. Biol.*, **277**, 147 (1998).
- 29) Nozawa, R. S. and Gilbert, N.: *Trends Cell Biol.*, **29**, 201 (2019).
- 30) Lieberman-Aiden, E. *et al.*: *Science*, **326**, 289 (2009).
- 31) Takahashi, S. *et al.*: *Nat. Genet.*, **51**, 529 (2019).
- 32) Dekker, J. and Heard, E.: *FEBS Lett.*, **259**, 2877 (2015).
- 33) Sanborn, A. L. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 6456 (2015).
- 34) Ganji, M. *et al.*: *Science*, **360**, 102 (2018).
- 35) Hara, K. *et al.*: *EMBO Rep.*, **20**, e47183 (2019).
- 36) Hara, K. *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **21**, 864 (2014).
- 37) Yoshimura, S. H. and Hirano T.: *J. Cell Sci.*, **129**, 3963 (2016).
- 38) Henisz, D. *et al.*: *Cell*, **169**, 13 (2017).
- 39) Boehning, M. *et al.*: *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **25**, 833 (2018).
- 40) Chong, S. *et al.*: *Science*, **361**, eaar2555 (2018).
- 41) Sabari, B. R. *et al.*: *Science*, **361**, eaar3958 (2018).
- 42) Cho, W. K. *et al.*: *Science*, **361**, 412 (2018).
- 43) Guo, Y. E. *et al.*: *Nature*, **572**, 543 (2019).
- 44) Parker, M. W. *et al.*: *Elife*, **8**, e48562 (2019).
- 45) Kilic, S. *et al.*: *EMBO J.*, **38**, e101379 (2019).
- 46) Ding, D. Q. *et al.*: *Dev. Cell*, **6**, 329 (2004).
- 47) Ding, D. Q. *et al.*: *Science*, **336**, 732 (2012).
- 48) Ding, D. Q. *et al.*: *Nat. Commun.*, **10**, 5598 (2019).
- 49) Masui, O. *et al.*: *Cell*, **145**, 447 (2011).