T2R2 東京科学大学 リサーチリポジトリ
Science Tokyo Research Repository

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	SUV420H2のヘテロクロマチン局在化メカニズム
Title(English)	
著者(和文)	中尾勝
Author(English)	Masaru Nakao
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第12657号, 授与年月日:2024年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:木村 宏,德永 万喜洋,田口 英樹,野澤 佳世,藤田 尚信
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第12657号, Conferred date:2024/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

Powered by T2R2 (Science Tokyo Research Repository)

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学　系 生命理工学　コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士（　理学　） Doctor of
学生氏名： Student's Name	中尾　勝	審査員主査： Chief Examiner	木村　宏

要旨（和文 2000 字程度）
Thesis Summary（approx.2000 Japanese Characters ）

繰り返し配列を豊富に含むゲノム領域は、凝縮したクロマチン構造であるヘテロクロマチンを形成し、転写が抑制されている。このようなヘテロクロマチンにはヒストン H3 の 9 番目リジンのトリメチル化（H3K9me3）とヘテロクロマチンタンパク質１（HP1）が豊富に存在している。HP1 はそのクロモドメインを介して H3K9me3 に結合し、さらに様々なタンパク質が HP1 のクロモシャドウドメインと結合することで、遺伝子発現の抑制に関与する。ヒストン H4 の 20 番目リジンのトリメチル化（H4K20me3）は H3K9me3 と同様にヘテロクロマチンに豊富なヒストン修飾である。H4K20me3 の修飾酵素 SUV420H2 は、そのヘテロクロマチン標的モジュール（HTM）が HP1 と結合することでヘテロクロマチンに局在化することが報告されている。しかし、SUV420H2 HTM のクロマチン結合は HP1 依存的であるにも関わらず、その結合は HP1 よりも安定であるなど、SUV420H2 HTM のヘテロクロマチン局在化機構は明らかではなかった。本研究では、SUV420H2 の HP1 との結合様式を調べることで、SUV420H2 の安定的なヘテロクロマチン局在化のメカニズムや HP1 動態の制御機構を明らかにすることを目的とした。

はじめに、superfolder GFP を融合した各種欠損変異体の細胞内局在を観察し、ヘテロクロマチンへの集積に必須な領域を絞り込んだ。その結果、HTM の N 末端側(aa 352-380)および C 末端側（aa 389-410）の二つの領域が特定され、これらを HTM-N、HTM-C と名付けた。この領域はマウス SUV420H2 についての過去の報告とほぼ一致した。次に、進化的に保存されたアミノ酸は重要であると仮定し、生物種間のアミノ酸配列の保存性を調べた。その結果、HTM-N 内に２つ、HTM-C 内に１つ、HP1 結合モチーフが保存されていた。これらのモチーフの点変異体ではヘテロクロマチンへの集積が消失し、また、免疫沈降実験によって HP1 と相互作用しないことが確認された。これらの結果から、HP1 との相互作用を介して SUV420H2 HTM がヘテロクロマチンにリクルートされることがわかった。また HTM-N 内には１つのヒスチジン（His）と２つのシステイン（Cys）が進化的に保存されており、4 つの His と Cys からなる zinc finger モチーフに似た構造をとる可能性があった。これらの His/Cys の点変異体とフレキシブルリンカーである 3x(GGGGS)配列の挿入変異体は、それぞれ、ヘテロクロマチンへの集積が消失または大幅に減弱した。このことから、２つの HP1 結合モチーフの適切な立体配置が安定的なヘテロクロマチン局在に必要であることが示唆された。

次に HTM の発現が HP1 のヘテロクロマチンへの結合に与える影響について調べた。HTM の発現細胞と野生型細胞について抗 HP1 抗体を用いた免疫染色を行い比較した結果、HTM 発現細胞ではヘテロクロマチンに結合する HP1 のシグナルが顕著に増加していた。HTM-N、HTM-C および HTM V374D（HTM の 2 つ目の HP1 結合モチーフの点変異体）についても同様の実験を行なったところ、HP1 のヘテロクロマチン濃縮率は HTM-N の発現によって増加し、HTM-C の発現によってわずかに低下した。このことから、HP1 のヘテロクロマチン結合安定化には HP1 結合モチーフの数が重要であることが示唆された。他方で、HTM V374D 変異体は、2 つの HP1 結合モチーフを持つが、その変異体の発現は HP1 のヘテロクロマチン濃縮率に変化をもたらさなかった。同様の結果が光褪色後蛍光回復法（Fluorescence recovery after photobleaching; FRAP）による HP1 の動態解析でも得られた。これらの結果から、HP1 のヘテロクロマチン結合を安定化させるには、複数のモチーフが協調して作用することが重要であることが示唆された。この安定化現象は、二つの HP1 結合モチーフを持つ SENP7 などでも報告されている。したがって細胞内において HP1 の動態は単一もしくは複数の HP1 結合モチーフを持つタンパク質群のバランスを反映している可能性がある。

以上をまとめると、本研究では SUV420H2 HTM 内部の３つの HP1 結合モチーフおよびそれらの適切な立体配置が、SUV420H2 の安定的な局在と HP1 のヘテロクロマチン結合の安定化に必要であることが分かった。これらの結果から、SUV420H2 は HP1 の動態を制御することでヘテロクロマチン構造の形成・維持に働く可能性が示唆された。ただし、内在性 SUV420H2 を欠失させても HP1 の局在性にはほとんど影響を与えなかった。HP1 のヘテロクロマチン結合安定化の生理学的意義を明らかにすることが今後の課題である。

最後に、これらの知見を活用し、ヘテロクロマチン動態の可視化プローブを開発した。特に、HTM V374D 変異体は HP1 の動態に影響を与えないことから、ヘテロクロマチン動態の追跡に応用できると考えた。HTM V374D-sfGFP は sfGFP 融合型 HP1α と比べてコントラストよくヘテロクロマチン上に集積した。また、H3K9me3 非依存的に HP1 の集積が見られる構造体（PML ボディや M 期染色体上のセントロメア）には集まらなかった。HTM V374D を用いて複製中のヘテロクロマチン動態を追跡した結果、複製 foci では HTM V374D が薄く見られた。このことから、複製中のヘテロクロマチンからは HP1 が外れている、もしくはクロマチンの脱凝縮が起きていることが示唆された。以上から、HTM V374D はヘテロクロマチン動態の可視化プローブとして応用可能であることが実証された。

（博士課程）
Doctoral Program

論 文 要 旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学　系 生命理工学　コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士　（　理学　） Doctor of
学生氏名： Student's Name	中尾　勝	審査員主査： Chief Examiner	木村　宏

要旨（英文 300 語程度）
Thesis Summary（approx.300 English Words ）

The genomic regions rich in repetitive sequences form condensed chromatin structures called heterochromatin, characterized by histone H3 Lys9 trimethylation (H3K9me3) and heterochromatin protein 1 (HP1), which recruit various effectors to suppress transcription. SUV420H2, a methyltransferase responsible for histone H4 Lys20 trimethylation, is recruited to heterochromatin by binding to HP1 through its Heterochromatic Targeting Module (HTM). Despite SUV420H2's heterochromatin localization depending on HP1, it binds to heterochromatin more stably than HP1. I aim to uncover the binding mode of SUV420H2 to HP1 and elucidate the mechanism of SUV420H2 heterochromatin retention and the regulation of HP1 dynamics. By expressing a series of deletion mutants fused with the superfolder GFP, I identified HTM regions that are essential for heterochromatin accumulation at the N-terminus (aa 352-380) and C-terminus (aa 389-410), which were designated HTM-N and HTM-C, respectively. Point mutation analyses revealed that evolutionarily conserved HP1 binding motifs in HTM-N and HTM-C play a critical role in heterochromatin accumulation and interaction with HP1. Within HTM-N, evolutionally conserved one histidine and two cysteine residues, resembling a zinc finger-like motif, were observed. Point mutations in these residues or an insertion mutant with a flexible linker (3xGGGGS) had defects in heterochromatin accumulation, suggesting that a specific configuration of HTM-N is required for stable HP1 binding and heterochromatin localization. I also found that HTM stabilizes HP1 binding to heterochromatin by immunostaining and fluorescence recovery after photobleaching. The impacts on HP1 stabilization varied among HTM, HTM-N, HTM-C, and HTM V374D (a mutant harboring a mutation in the second HP1 binding motif). These results indicated that not only the number of HP1 binding motifs but also the configuration of the HP1 binding motifs within HTM are crucial for stabilizing HP1 binding to heterochromatin. In conclusion, this study reveals the mechanism of SUV420H2's heterochromatin localization and the regulation of HP1 dynamics via multiple and properly configured HP1 binidng motifs. In addition, HTM V374D, which does not affect HP1 dynamics, could serve as a probe for tracking heterochromatin dynamics, demonstrating its applicability in visualizing replication-associated heterochromatin changes.