

器として ASICs, 新たな熱侵害受容器として ANO1, 圧受容器として piezo タンパク質など, 様々なタイプのイオンチャンネルが侵害受容器として機能していることも明らかとなりつつある。しかし, 特に, 圧侵害受容器など, 今回取り上げた piezo タンパク質以外にも, 多数の分子が関与しているものと考えられ, 今後の探索が待たれる。侵害受容器を標的とした新規鎮痛薬の開発は, TRPV1 阻害薬の開発が臨床段階で副作用の問題等からことごとく失敗しており, 新たな標的の開発を躊躇している感がある。しかし, TRPA1 など痛み以外にも, かゆみ, しびれ, 感覚異常等の様々な感覚に寄与しているものや, ANO1, piezo 等の新たな候補も出てきたことから, 侵害受容器を標的とした新規鎮痛薬の今後の開発を大いに期待したい。

- 1) Vay, L., Gu, C., & McNaughton, P.A. (2012) *Br. J. Pharmacol.*, 165, 787–801.
- 2) Moran, M.M., McAlexander, M.A., Bíró, T., & Szallasi, A. (2011) *Nat. Rev. Drug Discov.*, 10, 601–620.
- 3) Gunthorpe, M.J. & Chizh, B.A. (2009) *Drug Discov. Today*, 14, 56–67.
- 4) De Petrocellis, L. & Di Marzo, V. (2009) *Cell Calcium*, 45, 611–624.
- 5) Park, U., Vastani, N., Guan, Y., Raja, S.N., Koltzenburg, M., & Caterina, M.J. (2011) *J. Neurosci.*, 31, 11425–11436.
- 6) Chung, M.K., Lee, H., Mizuno, A., Suzuki, M., & Caterina, M. J. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 21569–21575.
- 7) Todaka, H., Taniguchi, J., Satoh, J., Mizuno, A., & Suzuki, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, 279, 35133–35138.
- 8) Xing, H., Chen, M., Ling, J., Tan, W., & Gu, J.G. (2007) *J. Neurosci.*, 27, 13680–13690.
- 9) Andrade, E.L., Meotti, F.C., & Calixto, J.B. (2012) *Pharmacol Ther.*, 133, 189–204.
- 10) Wilson, S.R., Gerhold, K.A., Bifolck-Fisher, A., Liu, Q., Patel, K.N., Dong, X., & Bautista, D.M. (2011) *Nat. Neurosci.*, 14, 595–602.
- 11) Zhao, M., Isami, K., Nakamura, S., Shirakawa, H., Nakagawa, T., & Kaneko, S. (2012) *Mol. Pain*, 8, 55.
- 12) Deval, E., Gasull, X., Noël, J., Salinas, M., Baron, A., Diocot, S., & Lingueglia, E. (2010) *Pharmacol. Ther.*, 128, 549–558.
- 13) Qadri, Y.J., Rooj, A.K., & Fuller, C.M. (2012) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 302, C943–C965.
- 14) Cho, H., Yang, Y.D., Lee, J., Lee, B., Kim, T., Jang, Y., Back, S.K., Na, H.S., Harfe, B.D., Wang, F., Raouf, R., Wood, J.N., & Oh, U. (2012) *Nat. Neurosci.*, 15, 1015–1021.
- 15) Coste, B., Xiao, B., Santos, J.S., Syeda, R., Grandl, J., Spencer, K.S., Kim, S.E., Schmidt, M., Mathur, J., Dubin, A.E., Montal, M., & Patapoutian, A. (2012) *Nature*, 483, 176–181.
- 16) Kim, S.E., Coste, B., Chadha, A., Cook, B., & Patapoutian, A. (2012) *Nature*, 483, 209–212.

中川 貴之

(京都大学大学院薬学研究科生体機能解析学分野)

Sensory mechanism of pain and novel analgesics
Takayuki Nakagawa (Department of Molecular Pharmacology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29 Yoshida-Shimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan)

ヘテロクロマチン構造の形成と RNA サイレンシング

1. はじめに

真核生物のゲノム DNA は, クロマチンと呼ばれる構造に折りたまれて核内に収められている。ヒトなどの高等真核細胞は, このクロマチン構造をダイナミックに変化させることで, 発生や分化における遺伝子発現を巧妙に調節している。一方, 真核生物のゲノムには, 細胞にとって必要とされる遺伝子に加えて, 機能の明らかにされていない偽遺伝子や単純な反復配列, また利己的に増幅するトランスポゾンなど非コード DNA 配列が数多く存在している。このような配列は, 不適切な DNA 組換えを引き起こすばかりでなく, その増幅によって必須遺伝子の機能が損なわれるなど, 細胞にとって脅威となる存在である。細胞は「ヘテロクロマチン」と呼ばれる高次のクロマチン構造を形成することで, これらの非コード DNA 領域の組換えや増幅を抑制している。近年の研究によって, このヘテロクロマチンの形成と RNA サイレンシングと呼ばれる機構が密接に結びついていることが明らかにされてきている。RNA サイレンシングとは, 転写された RNA を分解, あるいはその翻訳を阻害することによって遺伝子の機能を抑制する現象であり, 最も良く知られた例は二本鎖 RNA の導入によって引き起こされる RNA 干渉 (RNAi) である。本稿では, ヘテロクロマチン構造形成の分子機構を概説するとともに, RNA サイレンシングとの関わりについてモデル生物での最近の知見を紹介する。

2. ヘテロクロマチンの分子構造

真核細胞のゲノムは, ユークロマチンとヘテロクロマチンに大別することができる。遺伝子に富み活発な遺伝子発現が見られるユークロマチンに対して, ヘテロクロマチン

れ、それぞれモノ (mono), ジ (di), トリ (tri) と区別される。ヘテロクロマチンでは主としてトリメチル化されたリシンが重要な役割を果たしている。

構成的ヘテロクロマチンを規定する H3K9me は、進化的に保存された SUV39H ファミリーのメチル化酵素によって導入され、メチル化されたヒストンには、クロモドメインを持つタンパク質が結合する¹⁾。その最も代表的な因子が Heterochromatin Protein 1 (HP1) である。二量体を形成した HP1 がこの H3K9me を認識して結合し、様々なクロマチン制御因子をリクルートすることで抑制的なヘテロクロマチン構造が形成されている (図 1)。

一方、条件的ヘテロクロマチンの規定する H3K27me は、酵母などの単細胞真核生物には存在せず、多細胞体制を持つ高等真核生物に特徴的に見いだされる。このメチル化は、ポリコム (polycomb) と呼ばれる発生・分化に関わる遺伝子群の一つである EZH2 ファミリーに属するメチル化酵素によって導入される。K27 がメチル化されたヒストン H3 には、同じポリコム遺伝子群に属するポリコム (Pc) タンパク質ファミリーの因子が結合し、抑制的なクロマチン構造が形成されている。ヒトなどの高等真核生物では、上述の代表的な H3K9, H3K27 メチル化酵素に加えて複数のメチル化酵素が存在している。それぞれの酵素が協調的に働くことで、抑制的なヘテロクロマチン構造が維持されていると考えられるが、その詳細にはまだ不明な点も多く残されている。

ヒストンのメチル化修飾と並んで、ヘテロクロマチン形成において重要な役割を果たすのが DNA のメチル化である。ヒトや植物の細胞では、シトシン、特に CpG という配列のシトシンがメチル化される。ヒトやマウスなどの高等真核生物では、DNA メチル化が遺伝子発現制御に関わることが知られているが、他の多くの生物種では、DNA メチル化はサテライト DNA やトランスポゾンなどの外来 DNA をホストゲノムと区別するマークとしての役割を果たしている。ヘテロクロマチン領域では、ヒストン H3K9, H3K27 のメチル化と DNA メチル化が協調的に働き、抑制的な高次クロマチン構造の形成に寄与している (図 1)。

3. ヘテロクロマチンと RNA サイレンシング

上述のように、ヘテロクロマチンはヒストンや DNA の特異的なメチル化修飾と、その修飾に結合するクロマチンタンパク質によって特徴付けられる構造である。ヘテロクロマチンとして細胞内で観察される構造は、すでに「でき

上がった」構造であり、細胞分裂を通じて安定に維持される。一方、トランスポゾンが新しいゲノム領域に挿入されたり、反復配列が組換えによって増幅されたりした場合、細胞は新たに (*de novo* に) ヘテロクロマチン構造を作り出す必要がある。このような過程は「確立」の過程と呼ばれ、ヘテロクロマチンを維持する機構とは別個の機構が関与していると考えられる。近年の解析から、この確立の過程に関わる主要な経路に RNA が関与していることが様々な生物種で報告されている^{1,2)}。ここではまず分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) で明らかにされたメカニズムを説明し、その後他のモデル生物との比較から普遍的な機構について考察する。

分裂酵母では、セントロメア、テロメア、接合型遺伝子座 (mat 座) などの領域に特徴的なヘテロクロマチンが存在する。この領域ではヒストンメチル化酵素である Ctr4 (ヒト SUV39H の相同因子) が H3K9 をメチル化し、上述したクロモドメインタンパク質 HP1 の相同因子である Swi6 や Chp2 が結合することで抑制的なクロマチン構造が形成される³⁾。この H3K9me と HP1 によるシステムは分裂酵母からヒトに至るまで非常に良く保存された機構である。一方、分裂酵母には、他の生物種で RNAi 機構に関わるとして知られる三つの主要な因子である Argonaute (Ago1), Dicer (Dcr1), RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (Rdr1) が保存されており、これらの欠損によってヘテロクロマチンが異常になる⁴⁾。これまでの解析によって、分裂酵母では細胞周期の S 期に RNA ポリメラーゼ II によってセントロメアの反復配列から転写が起こり、この RNA が RNAi 経路を介して 20 数塩基の小分子 RNA (siRNA) に変換される。さらに、この siRNA が Ago1 とともにヘテロクロマチン上の新生 RNA を標的とし結合することで、Ctr4 による H3K9me が促進されるという機構が明らかにされている (図 2A, 左)⁴⁾。ところで、ヒストンの修飾と RNAi 経路のどちらが上流の機構なのだろうか? まず RNAi 経路の欠損によってセントロメアの H3K9me が減少する。逆に Ctr4 の欠損によって H3K9me がなくなると siRNA の産生ができなくなる。以上のことから、H3K9me によるヘテロクロマチン形成と RNAi 経路は相互依存的な関係にあり、自己増強型のループによって維持されていると考えられている。

興味深いことに、RNAi 経路の欠損によってセントロメアでの H3K9me は減少するが、テロメアや接合型遺伝子座 (mat 座) ではほとんど H3K9me は変化しない。つまり、テロメアや mat 座では RNAi 経路とは独立な機構を介して

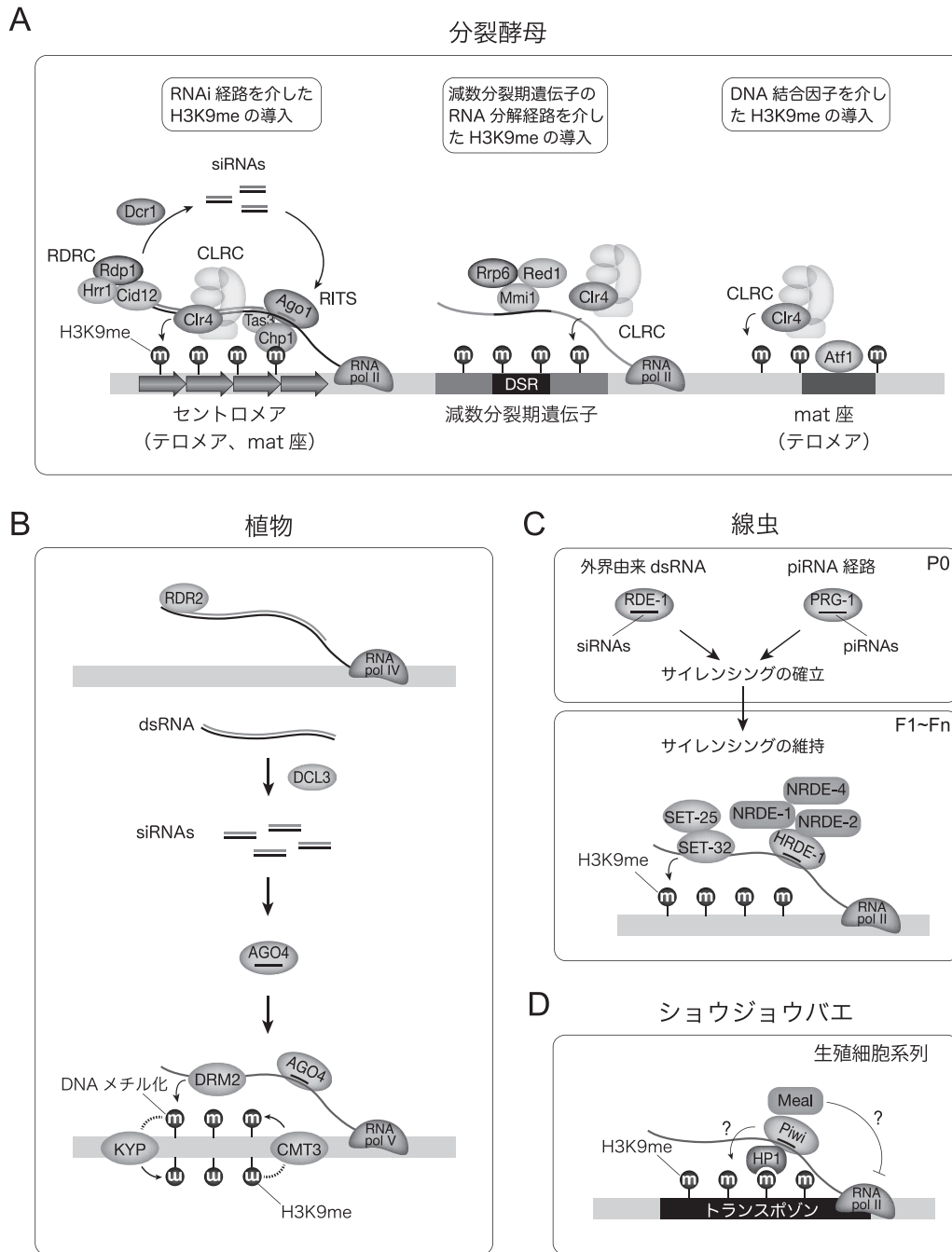


図2 ヘテロクロマチン形成とRNAサイレンシング

(A) 分裂酵母におけるヘテロクロマチン形成とRNAサイレンシング。セントロメアでは、小分子RNAを介したRNAi経路とヒストンH3K9meの導入が共役している(左)。テロメアやmat座でもRNAi経路は関与しているが、DNA結合タンパク質による並行した経路が存在している(右)。また減数分裂特異的に発現する遺伝子は、DSRという配列を介した経路によって栄養増殖期に分解される。この分解経路に依存してH3K9meが導入される(中央)。(B) 植物におけるRNA依存DNAメチル化のモデル図。RNAポリメラーゼIVによる転写産物が小分子RNA (siRNA) に変換されAGO4に取り込まれる。このAGO4がRNAポリメラーゼVの転写産物へターゲティングすることでDNAメチル化が導入される。DNAメチル化とH3K9meはKYPとCMT3の共役によって維持される(文献8を改変)。(C) 線虫でのRNAサイレンシングとクロマチン構造変換。外来の二本鎖RNAやpiRNA経路を介して確立されたサイレンシングは、核内でのH3K9meを介して安定に次世代へ受け継がれる(文献11を改変)。(D) ショウジョウバエの生殖細胞系列におけるRNAサイレンシングとクロマチン構造変換。核内に局在するPiwiとMea1の働きによって標的トランスポソンの領域へH3K9meが導入される(文献14参照)。

H3K9meが維持されているのである(図2A, 右)⁵⁾。逆の言い方をすれば, RNAi経路はヘテロクロマチンのマークとしてのH3K9meを呼び込む経路の一つと考えることができる。最近分裂酵母を用いたゲノムワイドな解析から, 減数分裂期で発現する遺伝子領域にH3K9meが存在することが報告されている⁶⁾。このH3K9meは減数分裂の過程でダイナミックに変化し, その確立の過程にはRNAi経路は関与せず, 減数分裂期特異的な遺伝子を通常の栄養増殖期に分解する際に機能するRNAサーベイランス経路がその確立に必要であることが明らかにされている(図2A, 中央)⁷⁾。これらの遺伝子領域は, 高等真核生物で見られるような条件的ヘテロクロマチンと考えられる。この減数分裂期特異的な遺伝子のH3K9meは, 高次クロマチン構造を介して転写や組換えを抑制するというよりはむしろ, 転写後サイレンシングに付随して, サイレンシングすべき遺伝子領域をマークしておくような役割を果たしていると思われる。

4. 世代を超えて伝えられるサイレンシング機構

分裂酵母に限らず, 他の高等真核生物でもヘテロクロマチン化とRNAサイレンシング経路の関与が次々に明らかにされている。まず植物では, トランスポゾンや反復配列の抑制にDNAメチル化が重要な役割を果たしており, このDNAメチル化を導入する過程に24塩基のsiRNAが深く関わっている。この過程はRNA依存性DNAメチル化と呼ばれ, 植物特異的な2種類のRNAポリメラーゼ(RNAポリメラーゼIV/V)が関与する多段階のメカニズムを介してDNAメチル化が導入されている(図2B)⁸⁾。植物のヘテロクロマチン領域のサイレンシングには, このDNAメチル化だけでなくヒストンH3K9のメチル化も必要とされ, SUV39Hファミリーに属するKRYPTONITE(KYP)がその主要なメチル化酵素であると考えられている。他の多くの生物種では, H3K9meはHP1ファミリータンパク質によって認識され, 高次クロマチン構造を引き起こすマークとなっているが, 植物ではその認識様式が異なっているように見える。実際, 植物のHP1ファミリータンパク質はH3K9meに結合せず, H2K27meを認識し, 遺伝子発現制御に関わっている。一方, ヘテロクロマチンに存在するH3K9meは, DNAメチル化酵素の一つであるCHROMOMETHYLASE3(CMT3)によって認識され, DNAメチル化の維持に寄与している。興味深いことに, KYPはメチル化DNAを認識するSRAドメインを持っており, 植物でのDNAメチル化とヒストンH3K9メチル化はそれ

ぞれの酵素の機能的共役によって維持されていると考えられている(図2B)⁹⁾。

植物や分裂酵母とは対照的に, RNAサイレンシングの研究でその分子メカニズムの解明に大きく寄与してきた線虫やショウジョウバエでは, RNAサイレンシングと核内の転写制御の関係については長いこと明らかにされていなかった。しかし, 最近の詳細な解析から, 線虫やショウジョウバエでも核内のRNAサイレンシングとヒストン修飾の関係が明らかになってきた。まず, 線虫において特定の遺伝子に対してRNAiを起こさせると, その遺伝子座にH3K9meの修飾が誘導されることが示されている¹⁰⁾。非常に興味深い事実は, 一旦RNAiによって入れられたH3K9meが, RNAiを起こしていないはずのF1やF2の世代にまで伝わるという結果である。この結果はRNAサイレンシングとヒストンのメチル化が線虫においても密接に結びついていること, またH3K9meというエピジェネティックなマークが, 世代を超えて維持されることを示している(図2C)。さらに最近, ゲノムに1コピーだけ挿入されたトランスジーンを用いた詳細な解析から, 上述のようにRNAi機構によって導入されたヒストン修飾が何世代にもわたって子孫に伝えられること, また核内で働くRNAi因子やHP1タンパク質が, このH3K9meの世代を超えた維持に関与していることが明らかにされた^{11,12)}。線虫では, 外来DNAを小分子RNAによって認識し, RNAi経路を介した転写後サイレンシングだけでなく, クロマチン構造変換を伴った転写レベルのサイレンシングを共役させることで, その情報を次世代まで伝播しているらしい。

RNAサイレンシングに関わる研究で良く知られたもう一つのモデル生物であるショウジョウバエでは, 生殖細胞系列特異的なArgonauteファミリータンパク質であるPiwiがトランスポゾンのサイレンシングに重要な役割を果たしている。このPiwiは核に局在しHP1タンパク質と結合するという報告から¹³⁾, 分裂酵母と同様なRNAi経路とクロマチン構造変換の共役が示唆されていたが, その詳細はなかなか明らかにされなかった。しかし最近, トランスポゾンの発現が転写レベルでも抑制されていること, またその遺伝子座にH3K9meが蓄積しているという結果が報告された(図2D)¹⁴⁾。実際にどのようにヒストンのメチル化が起きるのか, その機構についてはまだまだわからないことが多く残されているが, piRNAを含むPiwiが転写されたばかりのRNAを認識して結合し, そのクロマチン領域にH3K9meの導入する機構が示唆されている。

5. おわりに

本稿では、現在までに明らかにされているヘテロクロマチンとRNAサイレンシングの関わりについて、特にモデル生物での最近の報告を中心に紹介した。分裂酵母や植物で最初に明らかにされたRNAを介したクロマチン構造変換の過程が、線虫やショウジョウバエの生殖細胞系列におけるトランスポゾンの抑制に寄与しているという最近の報告はとても興味深い。これらの生物種で確認されたH3K9meの蓄積が、どの程度転写レベルの抑制につながっているのか、今後の解析によって解明されると考えられる。またPiwiによるトランスポゾンの抑制は哺乳類動物の生殖細胞系列でも起きており、実際PiwiによってDNAメチル化が引き起こされることが報告されている¹⁵⁾。哺乳類でもRNAサイレンシングとDNAメチル化とH3K9meに機能的な共役が存在しているのかどうか、今後の解析によって解明されると期待される。

- 1) Grewal, S.I. (2010) *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **20**, 134–141.
- 2) Moazed, D. (2009) *Nature*, **457**, 413–420.
- 3) Nakayama, J., Rice, J.C., Strahl, B.D., Allis, C.D., & Grewal, S.I. (2001) *Science*, **292**, 110–113.
- 4) Goto, D. & Nakayama, J. (2012) *Develop. Growth Differ.*, **54**, 129–141.
- 5) Sadaie, M., Iida, T., Urano, T., & Nakayama, J. (2004) *EMBO J.*, **23**, 3825–3835.
- 6) Cam, H.P., Sugiyama, T., Chen, E.S., Chen, X., FitzGerald, P. C., & Grewal, S.I. (2005) *Nat. Genet.*, **37**, 809–819.
- 7) Zofall, M., Yamanaka, S., Reyes-Turcu, F.E., Zhang, K., Rubin, C., & Grewal, S.I. (2012) *Science*, **335**, 96–100.
- 8) Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., & Nishimura, T. (2012) *Plant Cell Physiol.*, **53**, 766–784.
- 9) Du, J., Zhong, X., Bernatavichute, Y.V., Stroud, H., Feng, S., Caro, E., Vashisht, A.A., Terragni, J., Chin, H.G., Tu, A., Hetzel, J., Wohlschlegel, J.A., Pradhan, S., Patel, D.J., & Jacobsen, S.E. (2012) *Cell*, **151**, 167–180.
- 10) Gu, S.G., Pak, J., Guang, S., Maniar, J.M., Kennedy, S., & Fire, A. (2012) *Nat. Genet.*, **44**, 157–164.
- 11) Ashe, A., Sapetschnig, A., Weick, E.-M., Mitchell, J., Bagijn, M.P., Cording, A.C., Doebley, A.-L., Goldstein, L.D., Lehrbach, N.J., Pen, J.L., Pintacuda, G., Sakaguchi, A., Sarkies, P., Ahmed, S., & Miska, E.A. (2012) *Cell*, **150**, 88–99.
- 12) Shirayama, M., Seth, M., Lee, H.-C., Gu, W., Ishidate, T., Conte, D., Jr., & Mello, C.C. (2012) *Cell*, **150**, 65–77.
- 13) Brower-Toland, B., Findley, S.D., Jiang, L., Liu, L., Yin, H., Dus, M., Zhou, P., Elgin, S.C., & Lin, H. (2007) *Genes Dev.*, **21**, 2300–2311.
- 14) Sienski, G., Donertas, D., & Brennecke, J. (2012) *Cell*, **151**, 964–980.
- 15) Siomi, M.C., Sato, K., Pezic, D., & Aravin, A.A. (2011) *Nat.*

Rev. Mol. Cell. Biol., **12**, 246–258.

中山 潤一

(名古屋市立大学大学院システム自然科学研究科)

Heterochromatin assembly and RNA silencing

Jun-ichi Nakayama (Graduate School of Natural Sciences, Nagoya City University, 1 Yamanohata, Mizuho, Nagoya, Aichi 467-8501, Japan)

神経活動依存的な選択的スプライシング機構とその役割

1. はじめに

選択的スプライシングは一つの遺伝子から機能的に異なった多様な遺伝子産物を生み出すための非常にパワフルな仕組みである。哺乳類の中樞神経系では非常に多くの分子がこの選択的スプライシングによる制御を受けており、複雑かつ精密な神経ネットワーク構築に重要な神経細胞の多様性、シナプス結合の特異性やシナプス可塑性などに寄与していることが示唆されている。特に神経活動による選択的スプライシングの制御はヒトをはじめとした高等動物の高度な神経・精神活動に重要な役割を担うと考えられる。本稿では神経活動に依存的な選択的スプライシングのメカニズムに焦点を置き、これを制御するRNAエレメントやRNA結合タンパク質群の最近の知見を中心に、著者の研究成果を含めて紹介していきたい。

2. Ca²⁺シグナルによる神経活動依存的な選択的スプライシング

成熟した神経系では神経活動により引き起こされるCa²⁺流入が特定の細胞内シグナルを活性化させることで神経細胞間の情報伝達効率をコントロールする。特に記憶・学習が長期に持続するためには、神経活動に応じた新規の遺伝子発現とタンパク質の合成による特定のシナプスの形態的かつ機能的変化が必須であることが知られてきた。さらに近年ではNMDA (N-メチル-D-アスパラギン酸) 受容体やL型Ca²⁺チャネルからのCa²⁺流入によって、シナプスタンパク質をコードする複数のpre-mRNAの選択的スプライシング変化が起こり、これが成熟脳でのシナプス機能に重要な役割を果たしていることが示唆されてきた^{1,2)}。その中でよく研究されているものとしてはBK (big potas-