

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：12501

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2010～2014

課題番号：22131003

研究課題名（和文）ヒストン修飾酵素の欠損による転写疾患とゲノム機能調節

研究課題名（英文）Histone methyltransferase links transcription to DNA repair.

## 研究代表者

青田 聖恵（浦聖恵）（Kiyoe, Aota）

千葉大学・理学（系）研究科（研究院）・教授

研究者番号：80289363

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 59,900,000円

研究成果の概要（和文）：転写活性領域にはヒストンH3K36メチル化が種を越えて集積している。そのヒストン修飾を担う酵素の一つであるWhsc1は転写因子とともにDNA損傷応答因子と複合体を形成する。しかし通常のDNA損傷応答因子と異なってDNA切断部位への集積は認められない。そこで転写とDNA切断修復が共役して細胞分化が進むB細胞でWhsc1の機能解析を行ったところ、Whsc1欠損によりV(D)J組み換え異常によってB細胞分化が抑制されることが明らかになった。この結果は、転写活性領域に誘導されるDNA損傷修復にH3K36メチル化酵素Whsc1が機能する新規のクロマチン制御機構の存在を示す。

研究成果の概要（英文）：Histone H3 di/trimethylation at lysine 36 (H3K36me<sub>2/3</sub>) is associated with actively transcribed regions, however, the control mechanisms and functions of H3K36me in higher eukaryotes are still enigmatic.

We found that H3K36 methyltransferase Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (WHSC1) associates with not only transcription factors but also DNA-damage response factors without exogenous DNA-damage, suggesting molecular coupling between transcription and DNA repair. Non-competitive reconstitution of hematopoietic cell analysis reveals that Whsc1 is required for normal B-cell development in vivo. The absence of Whsc1 partially blocks V(D)J recombination and induces apoptosis during early B-cell development. p53-deficiency rescues abnormal B-cell differentiation from Whsc1<sup>-/-</sup> hematopoietic stem cells. Based on these results we propose that Whsc1 links transcription and DNA damage repair for maintenance of genome integrity.

研究分野：分子生物学

キーワード：ヒストンメチル化 転写 DNA損傷修復 B細胞分化 H3K36me Whsc1

## 1. 研究開始当初の背景

遺伝情報を担う DNA は、ヒストンタンパク質と結合し、クロマチンとして折り畳まれて核に収納されている。ヒストンの特定のアミノ酸残基でのアセチル化やリン酸化、メチル化そしてユビキチン化は、今世紀初頭には 30 種類ほど見出されていたが、今では 100 種類を越え、塩基配列を越えた遺伝情報（エピゲノム情報）として広く認識されるに至った。クロマチンはヒストン修飾によって、直接、あるいは特定のヒストン修飾を認識する因子を介して、染色体構造を変化させ、また転写制御のシグナル伝達を行う。しかし、ほとんどのヒストン修飾に関しては、断片的な情報は積み重ねられているが制御の本質が見出せないのが現状である。

中でもヒストン H3K36 のメチル化は、酵母からヒトまで、種を越えて転写活性領域をマークするようにゲノムクロマチン上に分布しているにも関わらず、この修飾をヒストンメチル化酵素遺伝子の欠損によって除いても、mRNA レベルで転写に顕著な変化は見出せない。長年、世界のエピジェネティクス研究者を悩ませて来た。一方で、遺伝子発現制御から始まったヒストン修飾の研究は、細胞分裂に伴った染色体構造変換や転写以外の DNA 代謝制御に深く関わることが明らかになってきた。

私達は既存の転写制御の枠組みにとらわれずに、ヒストン H3K36 のメチル化の制御とその機能を探究することによって、未知のゲノム機能制御機構が解き明かされるのではないかと考えた。そして酵母で唯一ヒストン H3K36 のメチル化を担う Set2 のヒト/マウス類似体の中からクロマチン機能調節に関わる様々なドメインを有し、しかもヒト疾患に繋がる可能性を有したタンパク質として、Wolf-Hirschhorn syndrome candidate 1 (WHSC1、別名 NSD2, MMSET) に焦点を絞って、分子から個体レベルまで統合した機能解析を開始した。WHSC1 は、ヒト 4 番染色体短腕の片アレル欠損によって発症する発育不良、精神遅滞を特徴とする 4p-症候群の遺伝子欠損領域に含まれ、多発性骨髄腫においては、転座によって生じた WHSC1 融合タンパク質の過剰な発現が見られる。WHSC1 が、ヒストン修飾酵素ならば、単独欠損でも様々なゲノム機能の異常を引

き起こすと考え、再構成クロマチンと遺伝子欠損 ES 細胞および欠損マウスを用いた生化学的、遺伝学的機能解析を推進した。そしてマウス Whsc1 が、ヒストン H3K36 特異的なメチル化酵素であり、Whsc1 の欠損が転写因子の機能異常によって発生異常を引き起こし、成長遅延や精神遅滞を特徴とする 4p-症候群の主要な原因遺伝子である事をつきとめた (Nimura and Ura K., *et al.*, Nature, 2009)。しかし未だにヒストン H3K36 メチル化酵素の機能は不明である。興味深いことに Whsc1 複合体の解析から Whsc1 が ES 細胞において、転写因子とともに DNA 損傷修復因子と複合体を形成していることが明らかになった。

## 2. 研究の目的

細胞核内で DNA は、ヌクレオソームを基本単位とした高次のクロマチン構造を形成し、DNA 複製、転写、修復そして組み換え反応など、あらゆる DNA 代謝反応が同一のクロマチン鑄型の上で営まれている。いずれの DNA 代謝反応も複数の因子が巨大なタンパク質複合体を DNA 上に形成して進行することから、互いに相互干渉や分子共役を起こすことが容易に想像される。私達は Whsc1 が転写因子とともに DNA 損傷修復因子と複合体を形成していることに着目して、ヒストン H3K36 メチル化を介した転写と DNA 損傷応答の分子共役の可能性を探究し、新規のゲノム機能制御機構の解明を目指した。

## 3. 研究の方法

**(1) 胎仔繊維芽細胞(MEF)を用いた Whsc1 の機能解析** Whsc1 欠損マウスの胎仔(E12.5~E14.5)から MEF 細胞を調整し、細胞増殖、遺伝子発現さらに DNA ストレスに対する感受性を野性型に比較してその機能を検討する。遺伝子発現は RNA を調整して、DNA アレイを用いて網羅的に遺伝子発現を解析した。DNA ストレス応答は、紫外線およびγ線照射、DNA アルキル化剤 (MMS)、DNA 架橋剤 (MMC) などの薬剤処理をして、48 時間後の生存を解析した。

**(2) 造血幹細胞の分化に果たす Whsc1 の機能解**

**析:** **Whsc1** 欠損マウスは出生直後に死ぬ。転写とゲノム切断修復が共役して分化が進む造血幹細胞からリンパ球への分化過程における **Whsc1** の機能を、**Whsc1** 欠損マウス胎仔 (E14.5) の肝臓細胞の骨髓移植によって解析した。

### (3) **ex vivo B 細胞分化における Whsc1 の機能解**

**析:** **Whsc1** 欠損マウス胎仔 (E14.5) の肝臓細胞から造血幹細胞をフローサイトメトリー (FACS) で単離し、ストローマ細胞 OP9 との共培養によって B 細胞へ分化誘導する。分化誘導後、時間を追って細胞増殖、細胞周期、分化、遺伝子発現を野性型に比較して解析し、**Whsc1** の機能を探究する。非相同 DNA 切断修復 (NHEJ) 異常の可能性を FACS を用いた抗体 IgM 発現、ゲノム DNA の PCR による Igh, Igκ, Igl 遺伝子座の V(D)J 組み換え、さらに中性コメットアッセイによる DNA 二本鎖切断の集積の解析によって行う。

## 4. 研究成果

### (1) **胎仔繊維芽細胞(MEF)を用いたWhsc1の機能解**

**析:** **Whsc1** 欠損 MEF 細胞は野性型の MEF に比べて増殖速度の低下が早く、細胞老化の傾向が強く見られた。しかし網羅的な遺伝子発現解析では遺伝子型と関連した経路を特定することができなかった。そこで遺伝子発現より DNA 修復への **Whsc1** の関与を様々な DNA ストレス処理によって解析し、紫外線およびγ線照射、DNA アルキル化剤 (MMS)、DNA 架橋剤 (MMC) に対する感受性は遺伝子欠損によって影響されない結果を得た。さらに **Whsc1** 欠損 MEF 細胞で、DSB 修復応答因子である 53BP1 のゲノム損傷部位での集積を米国との共同研究で解析したところ、既報告に反して、**Whsc1** は影響しない結果を得た (Hartlerode A., et al., PLoS ONE, 2012)。この結果から、**Whsc1** がランダムな DNA 切断修復でなく、プログラムされた DNA 切断修復に機能するとの仮説を導き、B 細胞に焦点を絞った解析に移行した。

### (2) **造血幹細胞の分化に果たす Whsc1 の機能解**

**析:** **Whsc1** 欠損マウス胎仔由来の造血幹細胞は、骨髓に生着して正常に増殖するが、B 細胞への分化は

そのステージを追って徐々に抑制され、最終的に抗体 IgM を産生する未成熟 B 細胞が激減することが判明した。この異常は、骨髓移植実験で、V(D)J 組み換えを済ませた免疫グロブリン遺伝子を導入したマウスでは **Whsc1** がなくても正常に B 細胞産生を回復することから、**Whsc1** が V(D)J 組み換えに関与することが強く示唆された。

### (3) **ex vivo B 細胞分化における Whsc1 の機能解**

**析:** B 細胞分化過程で **Whsc1** 欠損による異常を詳細に解析したところ、V(D)J 組み換えのどのステージでも増殖が滞り、B 細胞への分化導入は野性型とほぼ同様に起こるが、最終的に抗体 IgM を発現する未成熟 B 細胞の現象が認められた。RNA-seq および RT-PCR による遺伝子発現かいせきから、**B 細胞分化抑制に繋がる転写異常は見出せなかった**。一方で、ゲノム PCR により、V(D)J 組み換え確認され、**Whsc1** 欠損によって DSB が集積する傾向が認められた。以上の結果から **Whsc1** がランダムな DSB 修復には関与しないが、Igh 遺伝子座のように転写活性が高い特定のゲノム領域の DSB 修復に関与することが明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)  
〔雑誌論文〕(計 7 件)

すべて査読あり。\* コレスポンディングオーサー

1. Saito S., Ura K., Kodama M., and \* Adachi N. Construction and applications of exon-trapping gene-targeting vectors with a novel strategy for negative selection. *BMC Research Notes*, in press
2. \* Suzuki H, Maeda R, Ura K., and \* Tamura T. TBP-like protein (TLP) interferes with Taspase1-mediated processing of TFIIA and represses TATA box gene expression. *NAR*. 43, 6285-6298, 2015
3. Ahmed M., Ura K., and \* Streit A. Auditory hair cell defects as potential cause for sensorineural deafness in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, 6, 1027-1035, 2015
4. Machida S., Takaku M., Ikura M., Sun J., Suzuki H., Kobayashi W., Kinomura A., Osakabe A.,

Tachiwana H., Horikoshi Y., Fukuto A., Matsuda R., **Ura K.**, Tashiro S., **Ikura T.**, \* Kurumizak H. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci. Rep.* 4, 4863, 2014

5. Shirakawa T., 他9名, **Ura K.**, Muto M., Koseki H., Suda T., \* Ohbo K. An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to transition from an undifferentiated Kit-negative to a differentiating Kit-positive identity. *Development*, 140, 3565-3576, 2013
6. Sarai N., Nimura K., Tamura T., Kanno T., Patel M.C., Heightman T. D., **Ura K.** and \*Ozata K. WHSC1 links transcription elongation to HIRA-mediated histone H3.3 deposition in activated genes. *EMBO J.*, 32, 2392-2406, 2013
7. Kanao, Kashiwagi K., Nimura K., \***Ura K.** and Kaneda Y. DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin. *Nucleic Acids Res.*, 39, 874-888, 2011

〔学会発表〕(計13件)

招待講演

1. **Ura K.** “Histone H3 lysine 36 methyltransferase controls the programmed DNA-damage response”, the 5<sup>th</sup> meeting of the Asian Forum of Chromosome and Chromatin Biology, (2015年1月14-18日, Bangarol, India)
2. **浦 聖恵**, “ヒストン H3K36 メチル化酵素による転写活性領域のゲノム維持” がん支援公開シンポジウム, 2015, 1月27日, 東京都, 一橋
3. **Ura K.** “Histone H3 lysine 36 methyltransferase controls the programmed DNA-damage response” the 5<sup>th</sup> US-Japan DNA Repair Meeting, (2014年10月28-31日, 徳島県, 鳴門)
4. **Ura K.** “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 controls the programmed DNA-damage response.”ゲノム普遍的制御国際シンポジウム, 2014年2月4-5日, 京都, 京都市)
5. **Ura K.** “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 controls the programmed DNA-damage response.”第65回日本細胞生物学会、シンポジウム, 2013年6月20日, 愛知県, 名古屋市
6. **Ura K.** Regulation and Function of Histone Diversity in Development and Gene Regulation. 第35回日本分子生物学会, 神奈川県 横浜市 2012, 12.
7. **Ura K.** “Regulation and Function of Histone Diversity in Development and Disease.”第11回日

本蛋白質科学会年会ワークショップ, 大阪, 吹田市, 2011, 6. (オーガナイザー)

8. **浦 聖恵**, “ヒストンの多種多様性を介したエピジェネティック制御” 第5回日本エピジェネティクス研究会年会シンポジウム, 熊本, 熊本市 2011, 5.
9. **浦 聖恵**, “再構成クロマチンから疾患モデルマウスを用いたヒストン多種多様性の生物学的意義の探求” 構造エピジェゲノム研究会第3回ワークショップ, 横浜, 鶴見市 2011, 4.
10. **Ura K.** “Role of histone methylation and histone variants in developmental gene regulation.” CDB Symposium 2011, 兵庫県, 神戸, 2011, 3.
11. **Ura K.** “A histone H3 lysine 36 methyltransferase links developmental transcription factors to Wolf-Hirschhorn syndrome.” International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 兵庫県, 淡路島, 2011, 1.
12. 佐伯英昭, 柏木克信, 二村圭祐, **浦 聖恵** “転写制御の根底にあるクロマチンダイナミクスを創る” 細胞を創る研究会 3.0, 東京, 駒場 2010, 11.
13. **浦 聖恵**, “ヒストン H3K36 メチル化酵素による転写制御と疾患” 日本分子生物学会第10回春期シンポジウム, 宮城県, 松島, 2010, 6.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1)研究代表者

浦 聖恵 (URA, Kiyoe)

千葉大学大学院・理学研究科・教授

研究者番号: 80289363