

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18453

研究課題名(和文) H3K27ヒストン修飾によるエンハンサー制御機構の解析

研究課題名(英文) Genome wide analysis of epigenetic regulation of enhancer activity via H3K27 modifications

研究代表者

細金 正樹 (HOSOGANE, Masaki)

東北大学・医学系研究科・助手

研究者番号：30734347

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：細胞のエンハンサー形成におけるヒストン修飾H3K27me3の役割は未だ明らかではない。本研究では、その役割を明らかにするためにH3K27me3欠損K562細胞を用いて各種ヒストン修飾とp300のChIP-seqならびにRNA-seq解析を実施した。その結果、エンハンサー領域のH3K27me3の減少がエンハンサー活性化の指標であるH3K27acならびにp300の上昇を誘発し、Gene body領域のH3K27me3減少は遺伝子発現を活性化させることが観察された。これらの結果よりH3K27のアセチル化とメチル化の動的な関係によりエンハンサー活性および遺伝子発現が制御されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：It is still unknown whether H3K27me3 histone modification has a repressive role toward enhancer activity. To address this issue, we performed series of genome wide analysis to map and quantify H3K27me3, H3K27ac, p300 and mRNA expression in H3K27me3-depleted K562 human leukemia cells. We observed that the decrease in H3K27me3 level in enhancer region led to massive accumulation of H3K27ac and p300 at the same enhancer region, whereas the decrease in H3K27me3 in gene body was associated with upregulation of transcription of the same gene. Our results thus provide insights into the causal relationship between H3K27 histone modifications in regulatory elements and gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：エピジェネティクス 転写 ヒストン修飾 エンハンサー CRISPR/Cas9 ポリコーム

1. 研究開始当初の背景

神経や表皮といった様々な細胞系譜は発現する遺伝子の組み合わせで生み出されており、これら適切な遺伝子発現の組み合わせはプロモーターやエンハンサーといった遺伝子発現制御領域の働きによって制御されている。エンハンサー活性は、転写因子とその結合配列で制御されることが知られているが、それらのみで説明はできず、エピジェネティクスを含めた複合的な要素によって決定されると考えられている。近年の次世代シーケンス技術の普及により、これら遺伝子発現制御領域には特定のヒストン修飾が集積していることが明らかになりつつあり、エンハンサーの活性化にはヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) のアセチル化 (H3K27ac) が関与することが明らかとなった (文献 1)。一方で特定のエンハンサーが細胞種特異的に活性化する際、それ以外の不要なエンハンサーの H3K27ac は適切に抑制されている。しかしながら、この H3K27ac を抑制する分子機構に関して不明な点が多い。H3K27 のメチル化 (H3K27me3) はクロマチンの凝集を促進することが知られているため、H3K27 アセチル化酵素 p300 がエンハンサーに接近・結合することを阻害する可能性がある (文献 2)。さらに H3K27me3 は H3K27ac と同一リジンの修飾であり、H3K27 がメチル化されているとアセチル化酵素 p300 の基質にならず、p300 が存在しても H3K27 をアセチル化できないことが予想される (文献 3)。そこで本研究課題では、H3K27 のメチル化は、アセチル化酵素 p300 の動員・機能を阻害することを介してエンハンサーの抑制機能を担っていると仮説をたて検証をおこなった。

2. 研究の目的

本研究では、H3K27me3 がエンハンサーを抑制する分子機構と H3K27me3 が抑制する遺伝子発現プロファイルを、分子生物学手法とゲノムワイド解析手法で解明することを目的とする。

3. 研究の方法

H3K27me3 欠損ならびにコントロール K562 細胞を用いて各種ヒストン修飾 ChIP-seq、p300 ChIP-seq ならびに RNA-seq 解析を実施した。

H3K27me3 欠損細胞は H3K27me3 修飾酵素である PRC2 複合体 (Suz12) の shRNA を恒常的に発現させることで樹立した (方法 1)。

ChIP-seq により H3K27me3 がエンハンサー領域のアセチル化を抑制する分子機構の解析をおこなった。RNA-seq の情報解析より H3K27me3 によるエンハンサー抑制によって

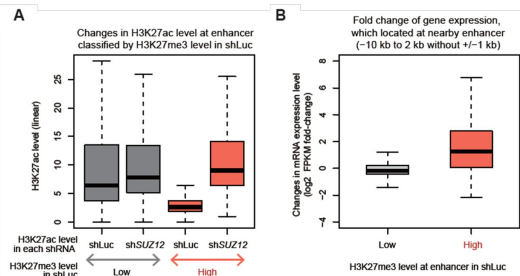
遺伝子発現抑制状態が保たれている遺伝子発現プロファイルを同定した。

4. 研究成果

(1) H3K27me3 減少によるエンハンサーの活性化

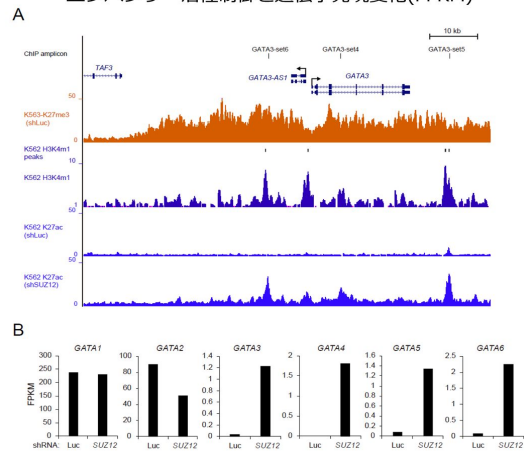
H3K27me3 欠損ならびにコントロール K562 細胞を用いて H3K27 ヒストン修飾の ChIP-seq ならびに RNA-seq 解析を実施した。H3K4me1 修飾でマークされたエンハンサー領域における H3K27me3 修飾が減少すると H3K27ac 修飾が増加し、その近傍に位置する遺伝子の発現量が増加することを見出した (図 1)。また、

図1 エンハンサー領域のH3K27me3修飾変化とエンハンサー活性の関係



H3K27me3 欠損 K562 細胞では、本来抑制されるべき GATA 転写因子群のうち GATA3、GATA4、GATA5、GATA6 が大きく発現上昇していることが明らかとなった。これらの遺伝子周囲には新規に H3K27ac 修飾部位が出現しており、エンハンサー制御の破たんにより K562 本来の分化系譜とは異なる遺伝子発現が生じていると考えられた (図 2)。これらの解析よりエンハンサー領域の H3K27me3 修飾がエンハンサーを抑制する可能性が強く示唆された。

図2 GATA遺伝子群におけるH3K27me3修飾依存的なエンハンサー活性制御と遺伝子発現変化 (FPKM)



(2) H3K27me3 減少による p300 局在変化の解析

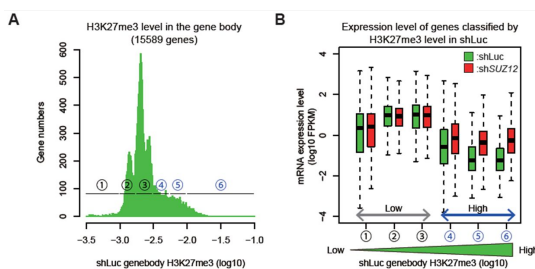
H3K27me3 欠損ならびにコントロール K562 細胞を用いて p300 ChIP-seq を実施し、H3K27me3 修飾が減少することによる p300 の局在変化を解析した。その結果、コントロール細胞ならびに H3K27me3 欠損細胞において H3K27ac 修飾される領域に p300 の集積が確認された。一方で、申請者の p300 ChIP-seq 解析では H3K27me3 修飾と p300 の共局在は確認

されなかった。したがって、p300 は常に結合するものの、H3K27me3 修飾が事前に集積することで p300 のアセチル化活性が阻害されている可能性は低いと考えられた。

### (3) Gene body 領域における H3K27me3 減少と遺伝子発現の活性化

本研究課題の関連課題として、我々はマウス NIH3T3 細胞において遺伝子の転写開始点から終結点までの遺伝子領域 (Gene body) の H3K27me3 修飾が転写抑制と相関することを見出してきた (文献 4)。そこで、Gene body 領域の H3K27me3 修飾と遺伝子発現制御の関係を K562 細胞において精査した。その結果、Gene body 領域の H3K27me3 修飾が減少すると当該遺伝子の遺伝子発現が増加することを見出した (図 3)。

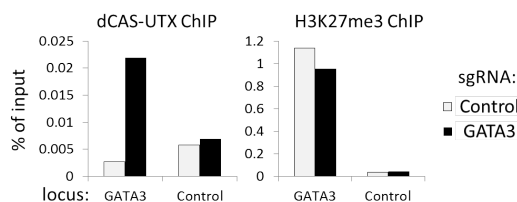
図3 GenebodyのH3K27me3修飾変化と遺伝子発現変化の関係



### (4) エンハンサー領域特異的 H3K27me3 修飾変化の誘導方法の検討

H3K27me3 修飾をゲノムワイドに減少させると、Gene body の H3K27me3 修飾減少とエンハンサーの H3K27me3 修飾減少のどちらの影響で遺伝子発現抑制が解除されるかを区別できない。そこで、細胞全体の H3K27me3 修飾量は維持したまま、特定の部位でのみ H3K27me3 修飾レベルを低下させるために、dCas9 システム (文献 5) と H3K27 脱メチル化酵素の融合タンパク質を作製し、この dCAS-UTX 融合タンパク質と特定 DNA 配列を標的とした sgRNA を K562 細胞に共発現させることで、dCAS-UTX 融合タンパク質を標的 DNA 配列に動員することに成功した。しかしながら、dCAS-UTX 融合タンパク質が動員されても、当該部位の H3K27me3 量は不変であることが観察された (図 4)。したがって脱メチル化活性を有する dCAS-UTX 融合タンパク質の作製のための更なる条件検討が必要と考えられる。

図4 dCAS-UTXを用いた領域特異的脱メチル化の条件検討

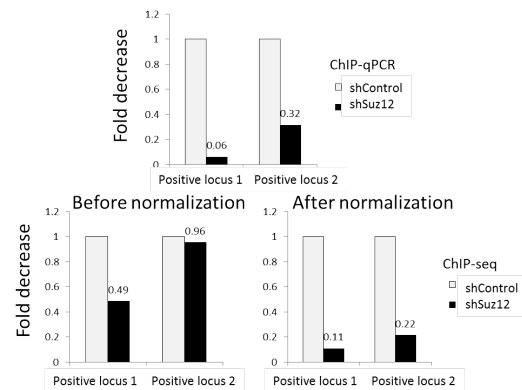


### (5) ChIP-seq データのサンプル間比較にお

### けるスパイクインの有用性の確認

本研究を遂行する過程で、各種ヒストン修飾 ChIP-seq の絶対量の変化をサンプル間で比較するためにはスパイクインを用いたサンプル間補正が必要と予想された。そこで東北大・五十嵐研究室で作成されたスパイクインを用いて H3K27me3 ChIP-seq のサンプル間比較における補正の有用性を確認することとした。従来の ChIP-seq 法における免疫沈降反応過程において H3K27me3 ペプチドと DNA 配列を融合させたスパイクインを添加して、免疫反応時ならびにライブラリ作成時の内部標準としてサンプル情報の補正をおこなった。その結果、従来の補正なしの ChIP-seq では、ChIP-qPCR 時点で確認される Suz12 ノックダウン細胞とコントロール細胞のサンプル間の H3K27me3 修飾量の変化情報が失われていることに対し、スパイクインを用いた補正有りの ChIP-seq ではサンプル間の H3K27me3 修飾量の変化情報が維持されていることが確認された (図 5)。したがって、本研究課題を遂行する際に問題となる、ChIP-seq のライブラリ作成時に失われてしまうサンプル間の量比情報をスパイクインを用いることで改善できることが明らかとなった。

図5 補正有無のH3K27me3 ChIP-seqとChIP-qPCRの比較



従来のヒストン修飾と遺伝子発現制御のゲノムワイド解析の多くは、単一のヒストン修飾と遺伝子発現制御の相関関係を示しており、異なる種類のヒストン修飾間の関係を示す解析は不足している。本研究において H3K27 のアセチル化とメチル化の動的な関係を介入実験によってゲノムワイドに示したことで、ヒストン修飾とエンハンサー活性の因果を示す網羅解析データを取得することができた。また、H3K27me3 はアセチル化酵素 p300 の動員を阻害することでエンハンサー活性を抑制することが示唆された。エンハンサーの不適切な活性化は細胞のがん化を引き起こす。今回の研究で明らかとなった H3K27me3 によるエンハンサー抑制機構によって、成熟分化した細胞の多分化能を消失させ、細胞のがん化を未然に防ぐのではないかと考えている。今後はより詳細な因果関係を解析するために、ゲノム全体でヒストン修飾

を増減させるのではなく、領域特異的にヒストン修飾を増減させることが必要と考えられる。また、2種類の細胞間のヒストン修飾の変化を解析するために必要なスパイクインの開発をさらに進めることによって、がん細胞と正常細胞、未分化細胞と分化細胞といった異なる細胞間のヒストン修飾変化と遺伝子発現変化を正確に定量する必要であると考えられる。

#### 引用文献

- 文献1 Dunham I, et al. Nature 489: 57-74 (2012)  
文献2 Di Croce L, Helin K Nat. Struct. Mol. Biol. 20: 1147-1155 (2013)  
文献3 Pasini D, et al. EMBO 23: 4061-4071 (2004)  
文献4 Hosogane M, et al. Cell Rep 16: 696-706 (2016)  
文献5 Mendenhall EM, et al. Nat Biotechnol. 12: 1133-1136 (2013)

#### 5. 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計2件)

Hosogane, M., Bosu, L., Fukumoto, E., Yamada, H., Sato, S., Nakayama, K. Geminin is an indispensable inhibitor of Cdt1 in mouse embryonic stem cells. Genes Cells 2017. 査読有  
doi: 10.1111/gtc.12482. [Epub ahead of print]

Hosogane, M., Funayama, R., Shiota, M., Nakayama, K. Lack of Transcription Triggers H3K27me3 Accumulation in the Gene Body. Cell Rep 16, 696-706, 2016. 査読有.  
doi: 10.1016/j.celrep.2016.06.034.

##### 〔学会発表〕(計5件)

細金正樹、中山啓子. H3K27 ヒストン修飾によるエンハンサー制御のゲノムワイド解析. 第39回日本分子生物学会年会. 2016/12/1. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Tadashi Nakagawa, Masaki Hosogane, Ryo Funayama, Keiko Nakayama. Reactivation of cell proliferation by continuous TGF- treatment. 第39回日本分子生物学会年会. 2016/11/30. パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

がん原遺伝子 RAS による遺伝子サイレンシングの分子機構の解析. 舟山亮, 細金正樹, 長嶋剛史, 中山啓子. 第38回日本分子生物学会年会 2015/12/1 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

TGF- 刺激によるTFIID構成因子TAF7の分解とその役割の解明. 中川直, 細金正樹, 舟山亮, 中山啓子. 第38回日本分子生物学会年会 2015/12/4 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

TGF- 刺激によるTFIID構成因子TAF7の分解とその役割の解明. 中川直, 細金正樹, 舟山亮, 中山啓子. 第38回日本分子生物学会年会 2015/12/4 神戸コンベンションセンター (兵庫県神戸市)

##### 〔その他〕

##### ホームページ等

東北大学医学系研究科細胞増殖制御分野  
<http://www.devgen.med.tohoku.ac.jp/>

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

細金正樹 (HOSOGANE, Masaki)  
東北大学・大学院医学系研究科・助手  
研究者番号: 30734347

##### (2) 研究分担者 該当なし

##### (3) 連携研究者 該当なし

##### (4) 研究協力者

中山啓子 (NAKAYAMA, Keiko)  
東北大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 60294972

舟山亮 (FUNAYAMA, Ryo)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 20452295

城田松之 (SHIROTA, Matuyuki)  
東北大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号: 00549462