

令和元年6月23日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04739

研究課題名(和文) 構成的ヘテロクロマチンと条件的ヘテロクロマチンの共通点と相違点

研究課題名(英文) Construction of constitutive heterochromatin and facultative heterochromatin

研究代表者

小布施 力史 (Chikashi, OBUSE)

大阪大学・理学研究科・教授

研究者番号：00273855

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：構成的ヘテロクロマチンはH3K9me3を基盤としセントロメアなどに形成される一方、条件的ヘテロクロマチンはH3K27me3を基盤とし不活性X染色体のように発生時期依存的な遺伝子発現の制御に関与する。本課題では、これら2つのヘテロクロマチンの共通点と相違点を理解することを目的とした。その結果、H3K9me3は不活性X染色体などにも濃縮されており、ある遺伝子を阻害するとH3K27me3に置き換わった。本課題により、構成的ヘテロクロマチン、条件的ヘテロクロマチンという明確な役割分担があるわけではなくそれぞれが、ヘテロクロマチンを構成するドメインのようなものと考えたほうが適当であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで、セントロメアやテロメアなどの構成的なヘテロクロマチンと、発生・分化依存的な条件的ヘテロクロマチンは、同じ凝縮したクロマチン構造をとりながら、基盤となるヒストン修飾や構成する因子が異なると考えられてきた。本課題により、構成的なヘテロクロマチンの形成に必要と考えられているヒストン修飾や因子が、条件的ヘテロクロマチン形成の一要素であることが示唆された。これらの成果は、今後遺伝子発現制御の要であるヘテロクロマチンを理解する上で重要な仮説であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Heterochromatin is defined into two categories; constitutive heterochromatin based on H3K9me3 which is responsible for the formation of stable heterochromatin, such as centromere and telomere, and facultative heterochromatin based on H3K27me3 which is responsible for developmentally formed heterochromatin, such as inactive X chromosome and Hox gene clusters. Aim of this study is to understand common and different points between two heterochromatins. Our results showed that H3K9me3 histone mark was on inactive X chromosome and formed domains as well as H3K27me3, and that the H3K9me3 domains were shrunk and replaced to H3K27me3 by knockdown/out of genes which are responsible for compaction of heterochromatin. These results suggest that there is no definition such as constitutive and facultative, rather H3K9me3 and H3K27me3 domains are constituents for the formation of functional heterochromatin to regulate gene expression properly.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ヘテロクロマチン エピジェネティクス ヒストン修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

個体は1個の受精卵から様々な系譜を経て組織や個体を形作る細胞に分化する。それぞれの細胞はすべて同じ遺伝情報を持ちながら、遺伝子の機能発現の組み合わせによりそれぞれの細胞の表現型を発現する。近年、遺伝子の機能発現は、DNAのメチル化、ヒストンの修飾、それらもたらすクロマチン構造など、いわゆるエピジェネティクスにより支配されていると理解されるようになってきた。エピジェネティックな環境を整える重要な染色体上の構造の1つとして、遺伝子発現に対して抑制的に働くと考えられているヘテロクロマチンが知られている。ヘテロクロマチンは、その性質や構築する因子の違いによって、構成的ヘテロクロマチンと条件的ヘテロクロマチンに大別されている。構成的ヘテロクロマチンは、セントロメアやテロメアのように発生段階や組織によらず転写に対して抑制的に働く凝縮した染色体状態が保たれており、メチル化したヒストン H3 の 9 番目のリジン (H3K9me3) を認識してクロマチンと結合する HP1 が主に関与している。一方で、条件的ヘテロクロマチンは、不活性 X 染色体や Hox 遺伝子クラスターのように発生過程や分化状態によって遺伝子発現の制御に関与し、不活性 X 染色体の Barr 小体のように形態的に構成的ヘテロクロマチンと同様の凝縮した染色体構造をとることが知られている。この条件的ヘテロクロマチンは、27 番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 (H3K27me3) を認識してクロマチンに働きかけるポリコム複合体である PRC1 と PRC2 が主に関与している。このように、構成的ヘテロクロマチンと条件的ヘテロクロマチンは、それぞれ異なる分子複合体を形成して異なる高次クロマチン構造を誘導し、それぞれの独立した機能を果たしていると考えられていた。

2. 研究の目的

構成的ヘテロクロマチンと条件的ヘテロクロマチンは、1)異なる構成因子やエピゲノムマークを使用していること、2)かたやテロメアやセントロメアなどの染色体の維持伝達に、かたや発生・分化に関与する遺伝子発現制御に機能することから、全く異なるものとして議論されてきた。本課題では、構成的、条件的ヘテロクロマチンの機能構造をそれぞれについて明らかにし、その共通点と相違点を理解することを目的とする。これにより、染色体の維持伝達、遺伝子発現制御に、2つのヘテロクロマチンのどのような共通点、相違点が働きかけているのか明らかとする。この成果は、発生工学に必要なエピゲノムの人為的な制御や、ヘテロクロマチンシステムの破綻によって引き起こされるがん、筋ジストロフィーなどの疾患メカニズムの解明につながる。

3. 研究の方法

主に、不活性 X 染色体と、常染色体にある Prader-Willi 症候群 (PWS) 領域に着目して解析した。PWS 領域は、片アリルのみで発現する遺伝子が存在する、いわゆるゲノムインプリンティング領域であり、どちらの親に由来するかで発現するアリルが決まる。また、マウス ES 細胞において SMCHD1 を細胞から除去することにより、この領域の遺伝子抑制異常が観察されることが知られている。SMCHD1 は、条件的ヘテロクロマチンである不活性 X 染色体のヘテロクロマチン化に寄与すること、HbiX1 との相互作用を介して、構成的ヘテロクロマチンの要素である HP1 と相互作用していることから、2つのヘテロクロマチンを議論する上で要となる因子と考えた。これらの領域について、SMCHD1、HbiX1 遺伝子ノックアウト、ノックダウンによる機能阻害、ChIP-seq (クロマチン免疫沈降法と次世代シーケンサーによる配列解析) によるヒストン修飾の分布の解析、RNA-seq 法による発現解析、蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション (FISH) 法を用いたアリル特異的な発現の観察、ヘテロクロマチン凝縮度の評価などを組み合わせて行った。

4. 研究成果

SMCHD1-HbiX1 複合体は、ヒトの不活性 X 染色体において XIST 非コード RNA を介して条件的ヘテロクロマチンであるヒストンマークである H3K27me3 領域と相互作用し、HP1 を介して構成的ヘテロクロマチンのヒストンマークである H3K9me3 領域と結合し、2種類の染色体領域をリンクすることにより、不活性 X 染色体の凝縮を引き起こす。この複合体を阻害すると、ヒトの体細胞で不活性 X 染色体の H3K9me3 領域の凝縮が解消されたが、H3K27me3 領域の構造には影響しなかった。SMCHD1-HbiX1 と独立して XIST の下流で働く PRC2 を阻害したところ、核内全体の H3K27me3 のヒストン修飾は消失するが、H3K27me3 領域、H3K9me3 領域、両方の凝縮度に影響しなかった。このことから、PRC2 複合体は XIST の下流で H3K27me3 の修飾に主に関与しており、ヘテロクロマチンの凝縮機能には関与していないことが示唆された。

SMCHD1-HbiX1 と PRC2 複合体は、それぞれ XIST 依存的に不活性 X 染色体に濃縮される。最近、PRC1 が hnRNPK を介して XIST に結合することにより、H2A のユビキチン化誘導され、このユビキチン化依存的に PRC2 複合体が不活性 X 染色体に呼び込まれることが報告された。SMCHD1-HbiX1 も PRC2 と同様に、XIST 依存的な不活性 X 染色体への濃縮が hnRNPK を介しているか否か検証するために、hnRNPK をヒト体細胞由来細胞株から除去を行なったところ、HbiX1-SMCHD1 複合体の不活性 X 染色体への局在が減退した。一方で、SMCHD1 の機能ドメイン解析を行ったところ、C 末端に存在する SMC ヒンジドメインのみで XIST RNA と結合しうること

が示唆された。これらのことから、体細胞において、HbiX1-SMCHD1 は hnRNPK を介する経路と、直接 XIST と結合する経路により、不活性 X 染色体に濃縮されていることが示唆された。

不活性 X 染色体と同様に、SMCHD1-HbiX1 が PWS 領域を凝縮したヘテロクロマチンの形成に寄与するか否かについて、この領域約 3 Mb 内に 14 種類のプローブを設計し FISH 法で検証した。その結果、PWS 内の一部の領域において、SMCHD1 を阻害することにより、2 つのアレルのうち片方のみ高次構造が変化することがわかった。よって、SMCHD1 は PWS において、アレル特異的な凝縮したクロマチン構造の形成に寄与し、遺伝子発現抑制に関与していることが示唆された。

近畿大学佐渡敬教授との共同研究により、SMCHD1、HbiX1 のノックアウトマウスを作成し、主に、E13.5 の胚から得た MEF (マウス胎児線維芽細胞) を用いて解析を行った。本来野生型ならば、不活性 X 染色体上ではほぼ全ての遺伝子が転写抑制されているが、SMCHD1 ノックアウトでは約半数の遺伝子が脱抑制していた。また、興味深いことに、脱抑制されている遺伝子領域は、本来覆っているはずの H3K27me3 のヒストン修飾が欠失していた。このことは、SMCHD1 が不活性 X 染色体の不活性化が確立する初期胚において、ヘテロクロマチン化による転写抑制の確立または維持に寄与している可能性を示すものである。

SMCHD1、HbiX1 のノックアウト MEF において、不活性 X 染色体上の H3K9me3 と H3K27me3 の分布を調べたところ、H3K9me3 が占める領域が広がり、その分、排他的に分布している H3K9me3 の分布が縮小していた。このことは、SMCHD1、HbiX1 は、X 染色体の不活性化が確立する初期胚において、H3K27me3 と H3K9me3 が働く領域の確立に寄与していることを示している。この現象は、PWS 領域においてもみられ、母型特異的な H3K9me3 の分布が減退し、この領域の遺伝子発現が脱抑制した。

本研究課題により、SMCHD1-HbiX1 複合体が不活性 X 染色体においても、PWS のような常染色体領域においても、H3K27me3 と H3K9me3 領域の確立と維持に寄与し、クロマチン凝縮と遺伝子発現抑制という、機能的なヘテロクロマチン形成に寄与していることが明らかとなった。これまで、H3K9me3 が覆う領域が構成的ヘテロクロマチンと、H3K27me3 が覆う領域が条件的ヘテロクロマチンは別々のものと考えられてきたが、SMCHD1-HbiX1 複合体はその両方に働きかけることにより、機能制御を行なっていることが示唆された。また、SMCHD1-HbiX1 複合体の機能进行操作することにより H3K9me3 領域が変動すること、H3K9me3 が不活性 X 染色体や PWS 領域などいわゆる条件的ヘテロクロマチンに局在していることから、H3K9me3 が即構成的ヘテロクロマチンではなく、H3K9me3 と H3K27me3 が協調して発生・分化に伴い制御される条件的ヘテロクロマチン形成に寄与していることが考えられた。これらを考え合わせると、構成的ヘテロクロマチン、条件的ヘテロクロマチンという明確な役割分担があるわけではなく、それぞれが、ヘテロクロマチンを構成するために協調して働くドメインのようなもの、と考えたほうが適当である場合もあると思われる。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

- 1: Takahashi S, Miura H, Shibata T, Nagao K, Okumura K, Ogata M, Obuse C, Takebayashi SI, Hiratani I. Genome-wide stability of the DNA replication program in single mammalian cells. *Nat Genet.* 2019 Mar;51(3):529-540. doi: 10.1038/s41588-019-0347-5. 査読有
- 2: Sakakibara Y, Nagao K, Blewitt M, Sasaki H, Obuse C, Sado T. Role of SmcHD1 in establishment of epigenetic states required for the maintenance of the X-inactivated state in mice. *Development.* 2018 Sep 25;145(18). pii: dev166462. doi: 10.1242/dev.166462. 査読有
- 3: Terui R, Nagao K, Kawasoe Y, Taki K, Higashi TL, Tanaka S, Nakagawa T, Obuse C, Masukata H, Takahashi TS. Nucleosomes around a mismatched base pair are excluded via an Msh2-dependent reaction with the aid of SNF2 family ATPase Smarcd1. *Genes Dev.* 2018 Jun 1;32(11-12):806-821. doi: 10.1101/gad.310995.117. 査読有
- 4: Hirano Y, Kinugasa Y, Asakawa H, Chikashige Y, Obuse C, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lem2 is retained at the nuclear envelope through its interaction with Bqt4 in fission yeast. *Genes Cells.* 2018 Mar;23(3):122-135. doi: 10.1111/gtc.12557. 査読有
- 5: Kajitani T, Kato H, Chikashige Y, Tsutsumi C, Hiraoka Y, Kimura H, Ohkawa Y, Obuse C, Hermand D, Murakami Y. Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017 Dec 26;114(52):E11208-E11217. doi: 10.1073/pnas.1714579115. 査読有
- 6: Sakata Y, Nagao K, Hoki Y, Sasaki H, Obuse C, Sado T. Defects in dosage compensation impact global gene regulation in the mouse trophoblast. *Development.* 2017 Aug 1;144(15):2784-2797. doi: 10.1242/dev.149138. 査読有
- 7: Ogushi S, Yamagata K, Obuse C, Furuta K, Wakayama T, Matzuk MM, Saitou M.

- Reconstitution of the oocyte nucleolus in mice through a single nucleolar protein, NPM2. *J Cell Sci.* 2017 Jul 15;130(14):2416-2429. doi: 10.1242/jcs.195875. 査読有
- 8: Isobe SY, Nagao K, Nozaki N, Kimura H, Obuse C. Inhibition of RIF1 by SCAL Allows BRCA1-Mediated Repair. *Cell Rep.* 2017 Jul 11;20(2):297-307. doi: 10.1016/j.celrep.2017.06.056. 査読有
- 9: Takahashi A, Okada R, Nagao K, Kawamata Y, Hanyu A, Yoshimoto S, Takasugi M, Watanabe S, Kanemaki MT, Obuse C, Hara E. Exosomes maintain cellular homeostasis by excreting harmful DNA from cells. *Nat Commun.* 2017 May 16;8:15287. doi: 10.1038/ncomms15287. 査読有
- 10: Iwamoto M, Osakada H, Mori C, Fukuda Y, Nagao K, Obuse C, Hiraoka Y, Haraguchi T. Compositionally distinct nuclear pore complexes of functionally distinct dimorphic nuclei in the ciliate *Tetrahymena*. *J Cell Sci.* 2017 May 15;130(10):1822-1834. doi: 10.1242/jcs.199398. 査読有
- 11: Yamaguchi L, Nishiyama A, Misaki T, Johmura Y, Ueda J, Arita K, Nagao K, Obuse C, Nakanishi M. Usp7-dependent histone H3 deubiquitylation regulates maintenance of DNA methylation. *Sci Rep.* 2017 Mar 3;7(1):55. doi: 10.1038/s41598-017-00136-5. 査読有
- 12: Hiraga SI, Ly T, Garzón J, Hořejší Z, Ohkubo YN, Endo A, Obuse C, Boulton SJ, Lamond AI, Donaldson AD. Human RIF1 and protein phosphatase 1 stimulate DNA replication origin licensing but suppress origin activation. *EMBO Rep.* 2017 Mar;18(3):403-419. doi: 10.15252/embr.201641983. 査読有
- 13: Isono M, Niimi A, Oike T, Hagiwara Y, Sato H, Sekine R, Yoshida Y, Isobe SY, Obuse C, Nishi R, Petricci E, Nakada S, Nakano T, Shibata A. BRCA1 Directs the Repair Pathway to Homologous Recombination by Promoting 53BP1 Dephosphorylation. *Cell Rep.* 2017 Jan 10;18(2):520-532. doi: 10.1016/j.celrep.2016.12.042. 査読有
- 14: Hamanaka K, Goto K, Arai M, Nagao K, Obuse C, Noguchi S, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Nishino I. Corrigendum to "Clinical, muscle pathological, and genetic features of Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 (FSHD2) patients with SMCHD1 mutations": [*Neuromuscular Disorders* 26/4-5 (2016) 300-308]. *Neuromuscul Disord.* 2016 Jul;26(7):472. doi: 10.1016/j.nmd.2016.05.015. 査読有
- 15: Funami K, Matsumoto M, Oshiumi H, Obuse C, Seya T. The dataset of proteins specifically interacted with activated TICAM-1. *Data Brief.* 2016 Jun 28;8:697-9. doi: 10.1016/j.dib.2016.06.030. 査読有
- 16: Suzuki S, Kato H, Suzuki Y, Chikashige Y, Hiraoka Y, Kimura H, Nagao K, Obuse C, Takahata S, Murakami Y. Histone H3K36 trimethylation is essential for multiple silencing mechanisms in fission yeast. *Nucleic Acids Res.* 2016 May 19;44(9):4147-62. doi: 10.1093/nar/gkw008. 査読有
- 17: Funami K, Matsumoto M, Obuse C, Seya T. 14-3-3-zeta participates in TLR3-mediated TICAM-1 signal-platform formation. *Mol Immunol.* 2016 May;73:60-8. doi: 10.1016/j.molimm.2016.03.010. 査読有
- 18: Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep.* 2016 Apr 11;6:24318. doi: 10.1038/srep24318. 査読有
- 19: Hamanaka K, Goto K, Arai M, Nagao K, Obuse C, Noguchi S, Hayashi YK, Mitsuhashi S, Nishino I. Clinical, muscle pathological, and genetic features of Japanese facioscapulohumeral muscular dystrophy 2 (FSHD2) patients with SMCHD1 mutations. *Neuromuscul Disord.* 2016 Apr-May;26(4-5):300-8. doi: 10.1016/j.nmd.2016.03.001. 査読有

[学会発表](計22件)

高橋沙央里、三浦尚、柴田隆豊、長尾恒治、小布施力史、竹林慎一郎、平谷伊智朗、「分化前後のES細胞における複製ドメインは細胞間で極めて均一なプロファイルを示す」、第12回日本エピジェネティクス研究会年会、2018年

Hisashi Miura, Saori Takahashi, Takahiro Shibata, Koji Nagao, Chikashi Obuse, Shin-ichiro Takebayashi, Ichiro Hiratani, "Single-cell DNA replication timing profiling and

3D genome organization dynamics during development”, Nuclear Organization & Function on Cold Spring Harbor Meeting, 2018 年

浅川 東彦、糀谷 知子、楊 恵如、大槻 千鶴、小坂田 裕子、松田 厚志、岩本 政明、近重 裕次、高木 尚充、長尾 恒治、小布施 力史、平岡 泰、原口 徳子、「分裂酵母に特異的な核膜孔複合体の構造と機能」、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

長尾 恒治、榊原 祐樹、柴田 幸子、野澤 竜介、坂口 武久、木村 宏、佐渡 敬、小布施 力史、「Smchd1-Hbix1 依存的な不活性化 X 染色体の区画化」、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

磯部 真也、長尾 恒治、野崎 直仁、木村 宏、小布施 力史、「RIF1-PP1 複合体の DNA 損傷における機能解析」、第 41 回日本分子生物学会年会、2018 年

長尾 恒治、榊原 祐樹、坂口 武久、木村 宏、佐渡 敬、小布施 力史、「染色体不活性化における非コード XIST RNA と Smchd1-Hbix1X の役割」、第 41 回日本分子生物学会年会(招待講演)、2018 年

長尾恒治、榊原祐樹、元田裕佳里、坂口武久、木村宏、佐渡敬、小布施力史、「X 染色体不活性化過程における Smchd1-Hbix1 の役割」、第 91 回日本生化学会大会(招待講演)、2018 年

小布施力史、「HP1 結合因子とクロマチン機能」、染色体研究の最前線 2018(招待講演)、2018 年

小布施力史、「遺伝子の傷をどうやって直すか」、遺伝子研究の最前線 一般公開シンポジウム(招待講演)、2018 年

小布施 力史、「ヒストンメチル化酵素 G9a と複製開始複合体 ORC との相互作用とその意義」、生命科学系学会合同年次大会(招待講演)、2017 年

小布施 力史，“Elucidation of structure and function of heterochromatin through human HP1 binding proteins”, HMGU-Japan meeting(招待講演)(国際学会), 2017 年

Chikashi OBUSE, “Conserved repressive chromatin properties on inactive X chromosome in human and mouse”, SMC proteins; Chromosomal organizers from bacteria to human(国際学会), 2017 年

小布施力史、「HP1 結合因子によるクロマチン制御」、ワークショップ「染色体研究の最前線」2017 年

長尾恒治、榊原祐樹、柴田幸子、野澤竜介、坂口武久、木村宏、佐渡 敬、小布施力史、「アリル特異的 ChIP/RNA-seq 法によるマウス不活性化 X 染色体のクロマチン動態の解析」、第 39 回日本分子生物学会、2016 年

磯部真也、大久保義真、長尾恒治、野崎直仁、木村宏、小布施力史、「新規 53BP1 結合タンパク質 SCAI は、Rif1 に阻害的に働くことで相同組換え修復を促進する」、第 39 回日本分子生物学会、2016 年

長尾恒治、柴田幸子、野澤竜介、磯部真也、元田裕佳里、三橋里美、濱中耕平、西野一三、木村宏、佐渡敬、小布施力史、「ヘテロクロマチンの機能構造と疾患との関わり」、第 39 回日本分子生物学会(招待講演)、2016 年

Shinya Isobe, Koji Nagao, Naohito Nozaki, Hiroshi Kimura, Chikashi Obuse, “DSB repair pathway is controlled by differential phosphorylation of 53BP1”, The 10th International 3R Symposium(国際学会), 2016 年

Koji Nagao, Sachiko Shibata, Y Sakakibara, Takehisa Sakaguchi, Ryu-suke Nozawa, Hiroshi Kimura, Takashi Sado, Chikashi Obuse, “Conserved repressive chromatin properties on inactive X chromosome between human and mouse”, Royal Society Meeting; X-chromosome inactivation: a tribute to Mary Lyon(国際学

小布施 力史、「エピジェネティックコードを基盤としたヘテロクロマチンの形成機構」、日本遺伝学会 第 88 回大会(招待講演)、2016 年

小布施 力史、「HP1 結合タンパク質を通じたクロマチン機能の解明」、RNA フロンティアミーティング(招待講演)、2016 年

Isobe S, Ohkubo Y, Nagao K, Nozaki N, Kimura H, Obuse C., “DNA Double Strand Breaks Repair Pathway is Controlled by Differential Phosphorylation of 53BP1”, 12th International Congress of Cell Biology(ICCB)(国際学会)、2016 年

小布施力史、「HP1 の解析から見てきたヘテロクロマチンの構造と機能」第 1 回 ATR-X 症候群シンポジウム(招待講演)、2016 年

〔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〕

ホームページ等

大学：<https://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/dbs01/re-paper-temp.php?id=98>

http://www.bio.sci.osaka-u.ac.jp/bio_web/lab_page/obuse/

research map: <https://researchmap.jp/obuse/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：長尾恒治

ローマ字氏名：Koji NAGAO

研究協力者氏名：磯部真也

ローマ字氏名：Shin-Ya Isobe

研究協力者氏名：佐渡敬

ローマ字氏名：Takashi Sado