

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 15日現在

機関番号：34204

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770223

研究課題名（和文）カタユレイボヤの胚発生におけるヒストンメチル化修飾の動態の解析

研究課題名（英文）Analysis of dynamics of histone modifications during embryogenesis of the ascidian *Ciona intestinalis*

研究代表者

和田 修一（WADA SHUICHI）

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・講師

研究者番号：20378607

研究成果の概要（和文）：

動物の胚発生におけるヒストン修飾の役割を理解するため、カタユレイボヤを対象としてヒストンメチル化修飾の分布解析とヒストン修飾酵素の発現解析を行った。尾芽胚における4番目のリジンがメチル化されたヒストン H3 の分布を調べ、これが活発に転写されている遺伝子の転写領域に多いことを明らかにした。さらにヒストンメチル化酵素および脱メチル化酵素のほぼ全ての遺伝子について胚期における発現パターンを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

To understand the role of histone modifications in animal embryogenesis, the histone methylation pattern and the expression of genes for histone lysine methyltransferases (HKMTs) and histone lysine demethylases (HKDMs) during ascidian embryogenesis were investigated. It has been shown that histone H3 lysine 4 (H3K4) methylation is an active mark for transcription while histone H3 lysine 27 (H3K27) methylation marks repressive states of transcription. ChIP-qPCR analysis of the distribution of methylated H3K4 in several selected regions of the genome of *Ciona* tailbud stage embryos revealed that the methylated H3K4 mark is associated with the transcribed region of active genes. Expression patterns of almost all HKMT and HKDM genes were examined and genes that are expressed during *Ciona* embryogenesis were identified.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1700000	510000	2210000
2011年度	1100000	330000	1430000
年度			
年度			
年度			
総計	2800000	840000	3640000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：遺伝子発現調節、ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

真核生物において核内DNAはコアヒストンに巻き付き、クロマチンの基本単位であるヌクレオソームを形成している。コアヒストン

は4種類のヒストンタンパク質（H2A、H2B、H3、H4）各2分子からなる8量体として構成されている。コアヒストンの翻訳後修飾は、クロマチン構造の調節に重要な役割を果た

すと共に、遺伝子発現調節における重要なメカニズムである。中でもヒストンのリジン残基のメチル化修飾は、他の修飾の上位にあり、クロマチンの構造や遺伝子発現の調節で中心的な働きをすると考えられている。ヒストンのリジン残基のメチル化にはメチル基の数に応じてモノ (me1)、ジ (me2)、トリ (me3) という3通りのメチル化状態が存在している。他の生物におけるこれまでの研究により、ヒストン H3 の4番目のリジン (H3K4) のメチル化が転写の活性化の目印であり、ヒストン H3 の27番目のリジン (H3K27) のメチル化が転写の抑制状態の目印であることが示されている。

ヒストンの修飾には、特異的な活性を持つ酵素が関与する。ヒストンのリジン残基のメチル化を触媒する酵素が、ヒストンリジンメチル化酵素 (HKMT) である。HKMT には触媒ドメインとして SET ドメインを持つタイプと、DOT1L ドメインを持つタイプが存在する。一方ヒストンのリジン残基の脱メチル化を触媒する酵素が、ヒストン脱メチル化酵素 (HKDM) である。HKDM には触媒ドメインとして JMJC ドメインを持つタイプと、Amine oxidase (AO) ドメインを持つタイプが存在する。

クロマチン構造の調節や遺伝子発現調節におけるヒストン修飾の役割は、これまでに主に培養細胞を利用して活発に研究されてきた。しかし、動物の胚発生過程においてヒストン修飾がどのように変化し、どのような機能を果たすのかについては、不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

そこで本研究では、脊椎動物に近縁であり、発生の解析に向けた特徴を多く備えたカタユウレイボヤをモデルとして、(1)胚発生過程におけるヒストンメチル化修飾の実態を解明すること、および(2)カタユウレイボヤの胚発生過程における HKMT 遺伝子と HKDM 遺伝子の発現を網羅的に解明すること、を目的とした。

3. 研究の方法

(1)胚発生過程におけるヒストンメチル化修飾の実態を解明するために、クロマチン免疫沈降-定量的 PCR 法 (ChIP-qPCR 法) による解析を行った。その際、クロマチンの断片化は超音波処理により行った。免疫沈降には抗ヒストン H3 抗体、抗 H3K4me3 抗体、抗 H3K4me1/2/3 抗体、抗 H3K9ac 抗体、抗 H3K27me3 抗体、抗 H3K9me2 抗体、抗 H3K9me3 抗体を用いた。

(2)カタユウレイボヤの胚発生過程における HKMT 遺伝子と HKDM 遺伝子の発現の解明のためには、Whole mount in situ hybridization

法による解析を行った。

4. 研究成果

(1)胚発生過程におけるヒストンメチル化修飾の解明

カタユウレイボヤ胚でヒストンメチル化が起きているかどうかを知るために、また、起きているならば転写の状態とどのような関係があるのかを知るために、ChIP-qPCR 法によってホヤ胚のクロマチンにおけるヒストンメチル化の解析を行った。発生過程を通しての変化を知る目的で、当初はサンプルとして卵割期胚、原腸胚、神経胚、尾芽胚、幼生、若幼体を用いて実験を行った。試行錯誤をしたものの、十分な質と量のクロマチンを回収できたのは尾芽胚のみだったため、以降の解析は尾芽胚で行った。

解析するゲノム上の領域として、胚期に活発に転写されている遺伝子の領域と、胚期に転写されない遺伝子の領域を選択した。EST データベースの情報に基づき、胚期に活発に転写されている遺伝子として *Ci-EF1A1*、*Ci-SLC25A4/5/6*、*Ci-RPS3* を選んだ。また胚期に転写されない遺伝子として *Ci-PP1L6*、*CLSTR03445*、*Ci-HSP-24-3* (この遺伝子についてはすぐ上流に *Ci-HSP-24-4* 遺伝子という、配列が類似し、同じく胚期に転写されていない遺伝子が存在しているので、その領域も調べた) を選んだ。これらの遺伝子の転写開始点上流、転写開始点近傍、遺伝子本体、遺伝子本体下流に ChIP-qPCR 用のプライマーを設計した。

免疫沈降に用いる抗体としては、転写活性化に相関があるとされる H3K4me3 (トリメチル化 H3K4)、H3K4me1/2/3 (モノメチル化、ジメチル化およびトリメチル化した H3K4)、H3K9ac (アセチル化 H3K9) それぞれに対する抗体、転写抑制に相関があるとされる H3K9me2 (ジメチル化 H3K9)、H3K9me3 (トリメチル化 H3K9)、H3K27me3 (トリメチル化 H3K27) それぞれに対する抗体、コアヒストンの分布を知るためのヒストン H3 に対する抗体を用いて実験を行った。しかし、理由は不明だが、H3K9me2、H3K9me3、H3K27me3、ヒストン H3 に対する抗体については免疫沈降後に十分な量の DNA が回収されず結果を得ることができなかった。H3K4me3、H3K4me1/2/3、H3K9ac に対する抗体については結果を得ることができた。

胚期に活発に転写されている *Ci-EF1A1* 遺伝子については、抗 H3K4me3 抗体で免疫沈降した結果、主に遺伝子本体で ChIP DNA の回収量が多く、特に翻訳開始点から下流 738bp から 820bp で最も多く回収された。転写開始点上流と遺伝子本体の下流では殆ど回収されなかった。抗 H3K4me1/2/3 抗体および抗 H3K9ac 抗体では、DNA の回収量は少ないもの

の、同様の結果となった。*Ci-SLC25A4/5/6* 遺伝子については、抗 H3K4me3 抗体で免疫沈降した結果、主に遺伝子本体で ChIP DNA の回収量が多く、特に翻訳開始点から下流 554bp から 678bp で最も多く回収された。転写開始点の上流と遺伝子本体の下流では殆ど回収されなかった。抗 H3K9ac 抗体では、同様の傾向が見られたが、DNA の回収量は少なかった。一方、抗 H3K4me1/2/3 抗体を用いた場合、抗 H3K4me3 抗体の場合と類似した結果が得られたが、転写開始点の上流でも DNA が回収された。*Ci-RPS3* 遺伝子については、抗 H3K4me3 抗体で免疫沈降した場合、主に転写開始点上流から遺伝子本体の転写開始点近傍の領域で ChIP DNA の回収量が多く、特に転写開始点から下流 203bp から 383bp で最も多く回収された。転写開始点から下流 2349bp 以降では殆ど回収されなかった。抗 H3K4me1/2/3 抗体と抗 H3K9ac 抗体では、DNA の回収量は少ないものの、同様の結果となった。以上の結果から、胚期に活発に転写されている遺伝子については、遺伝子本体領域のクロマチンに H3K4me1、H3K4me2、H3K4me3、H3K9ac が存在していることが示唆された。

一方、胚期に転写されない *Ci-PP16* 遺伝子については、抗 H3K4me3 抗体で免疫沈降した結果、転写開始点付近とその上流領域で ChIP DNA の回収量が多く、特に転写開始点で最も多く回収されていた。ただし回収率は *Ci-EF1A1* の遺伝子の場合と比べ少なかった。遺伝子本体とその下流では ChIP DNA はほとんど回収されなかった。抗 H3K4me1/2/3 抗体および抗 H3K9ac 抗体では、全体的に DNA の回収量は少なかった。*CLSTR03445* 遺伝子については、抗 H3K4me3 抗体で免疫沈降した結果、転写開始点のすぐ下流領域で ChIP DNA の回収が見られた。転写開始点上流と遺伝子本体、遺伝子本体の下流では DNA はあまり回収されなかった。抗 H3K4me1/2/3 抗体で免疫沈降した場合にも、ChIP DNA の回収量は少ないものの、同様の結果となった。抗 H3K9ac 抗体では全体に渡って DNA はほとんど回収されなかった。*Ci-HSP-24-3* と *Ci-HSP-24-4* 遺伝子については、抗 H3K4me3 抗体で免疫沈降した結果、調べた全領域において ChIP DNA は回収されなかった。これらの遺伝子については抗 H3K4me1/2/3 抗体と抗 H3K9ac 抗体を使った解析は行わなかった。以上の結果から、胚期に転写されない遺伝子については、主に転写開始点付近に H3K4me3 が存在する場合と、全体に渡って H3K4me3 が存在しない場合とがあることが示唆された。

調べた遺伝子の数が限られているため、今回の結果でカタユウレイボヤのクロマチン全体について一般的な傾向を推定することは困難である。しかし少なくとも以上の結果は、カタユウレイボヤ胚において活発に転写

されている遺伝子の転写領域において H3K4 のメチル化が起きる例が複数存在することを示している。

(2) カタユウレイボヤの胚発生過程における HKMT 遺伝子と HKDM 遺伝子の発現の解析

上述の結果は、カタユウレイボヤ胚においてヒストンメチル化が実際に起こっていることを示唆した。そこで次に、ヒストンリジンメチル化を制御する HKMT と HKDM に注目して発現解析を行った。これまでにカタユウレイボヤの持つ HKMT 遺伝子と HKDM 遺伝子の同定は行われていなかった。そこでゲノム配列を検索し、各遺伝子群の同定と分類を行った。その結果、HKMT 遺伝子については、SET ドメイン含有タンパク質の遺伝子が 22 種類、DOT1L ドメイン含有タンパク質の遺伝子が 1 種類同定された。SET ドメイン含有タンパク質遺伝子のうち、*ASH1L*、*SETD2*、*SETD8*、*SMYD1*、*SMYD3*、*SMYD4*、*SMYD5*、*SETD3*、*SETD4*、*SETD6* についてはヒト遺伝子のオーソログと考えられるカタユウレイボヤ遺伝子が存在した。一方、*EHMT1* と *EHMT2*、*SETDB1* と *SETDB2*、*SUV39H1* と *SUV39H2*、*NSD1* と *WHSC1* と *WHSC1L1*、*EZH1* と *EZH2*、*MLL* と *MLL4*、*MLL2* と *MLL3*、*SETD1A* と *SETD1B*、*MLL5* と *SETD5*、*SUV420H1* と *SUV420H2*、*PRDM9* と *PRDM7*、*PRDM10* と *PRDM15* については、複数のヒト遺伝子に対応する単一のカタユウレイボヤ遺伝子が存在した。ヒトの *SETMAR*、*SETD7*、*SMYD2*、*PRDM1*~*6*、*PRDM8*、*PRDM11*~*14*、*PRDM16* については、対応する遺伝子がカタユウレイボヤには見つからなかった。ヒトの DOT1L ドメイン含有タンパク質遺伝子は *DOT1L* のみであり、この遺伝子のオーソログと考えられるカタユウレイボヤ遺伝子が存在した。

HKDM 遺伝子については、JmjC ドメイン含有タンパク質をコードする遺伝子が 12 種類、AO ドメイン含有タンパク質をコードする遺伝子が 5 種類見つかった。JmjC ドメイン含有タンパク質遺伝子のうち、*JMJD6*、*JMJD4*、*HSPBAP1*、*C2orf60*、*HIF1AN* についてはヒト遺伝子のオーソログと考えられるカタユウレイボヤ遺伝子が存在した。一方、*KDM4A* と *KDM4B* と *KDM4C* と *KDM4D* と *KDM4DL*、*KDM5A* と *KDM5B* と *KDM5C* と *KDM5D* と *JARID2*、*KDM6A* と *KDM6B* と *UTY*、*KDM2A* と *KDM2B* と *JHDM1D* と *PHF8*、*JMJD7* と *JMJD8*、*JMJD5* と *JMJD*、*KDM3A* と *KDM3B* と *JMJD1C* については、複数のヒト遺伝子に対応する単一のカタユウレイボヤ遺伝子が存在した。ヒトの *HR*、*PHF2*、*MINA*、*C14orf169* については、対応する遺伝子がカタユウレイボヤには見つからなかった。AO ドメイン含有タンパク質遺伝子のうち、*KDM1A*、*KDM1B*、*PPOX* についてはヒト遺伝子のオーソログと考えられるカタユウレイボヤ遺伝子が存在した。一方、*PAOX* と *SMOX*、*MAOA* と *MAOB* と *IL4I1* に

については、複数のヒト遺伝子に対応する単一のカタユレイボヤ遺伝子が存在した。ヒトの *RVLS* については、対応する遺伝子がカタユレイボヤには見つからなかった。

同定した HKMT および HKDM 遺伝子について、各遺伝子の胚での発現の有無や発現パターンの概略を知るために、Whole mount in situ hybridization 法により mRNA の局在を調べた。8 細胞期、64 細胞期、中期原腸胚期、中期神経胚期、中期尾芽胚期の胚について解析を行った。23 種類の HKMT 遺伝子のうち、cDNA クローンを入手できた 22 遺伝子について発現を調べた結果、15 種類の遺伝子について胚での発現が検出された。そのうち、卵に母性 mRNA の形で発現していた遺伝子は 14 種類だった。また 4 遺伝子が中期尾芽胚期に筋肉特異的に発現していた。複数の遺伝子が中期尾芽胚の内胚葉に発現していた。次に、17 種類の HKDM 遺伝子全てについて発現を調べた結果、9 種類の遺伝子について胚での発現が検出された。そのうち、卵に母性 mRNA の形で発現していた遺伝子は 8 種類だった。したがって HKMT 遺伝子と比べると胚に発現する遺伝子の割合は少ない。4 遺伝子は中期尾芽胚の内胚葉に発現していた。

以上により、カタユレイボヤ胚における HKMT 遺伝子と HKDM 遺伝子の発現パターンのほぼ全容が判明した。特に、組織特異的な発現を示す遺伝子が存在することは、組織ごとにヒストンのメチル化が異なる調節を受けている可能性を示す結果であり、そうした調節の解明には個々の HKMT 遺伝子と HKDM 遺伝子の機能解析が今後必要である。今回の成果はそうした解析ための基礎となるものと言える。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 森田真希、和田修一、カタユレイボヤにおけるヒストンメチル化酵素とヒストン脱メチル化酵素の網羅的解析、第 33 回日本分子生物学会年会第 83 回日本生化学会合同大会、2010 年 12 月 7 日、神戸ポートアイランド
- ② 森田真希、和田修一、Analysis of histone methylation in the ascidian *Ciona intestinalis*、6th International Tunicate Meeting、2011 年 7 月 6 日、カナダ・モントリオール・マギル大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和田 修一 (WADA SHUICHI)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・

講師

研究者番号 : 20378607

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :