

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23310134

研究課題名(和文)骨格筋分化の運命を決定する高次クロマチン構造制御機構の解析

研究課題名(英文)Lineage potential regulated by high order chromatin structure

研究代表者

大川 恭行(OHKAWA, Yasuyuki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：80448430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,800,000円、(間接経費) 4,740,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、分化に伴って発現するすべての遺伝子の発現制御、つまり、高次制御の全容解明を行うため、発生胚を含めたゲノムワイドな解析系を構築した。その結果、骨格筋分化の発生段階ではH3.3のマーキングが形成されたゲノム領域ではH3K27me3とH3K4me3の双極性修飾が形成されること、分化に伴って双極性修飾がいずれか片方に変化していくことが明らかとなった。またH3.1を強制的に取り込ませた場合、H3.3と異なりH3K27me3の修飾のみが形成されることが明らかとなった。以上のことからヒストンバリエントはヒストン修飾の選択性を決定することで分化制御を行っていることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Lineage potential is triggered by lineage-specific transcription factor expression in association with structural chromatin changes. Histone H3.3 variant is a critical chromatin component that regulates lineage potential, but the function of each H3 variant remains unclear. Here, we found that forced incorporation of H3.1 (canonical H3 variant) into lineage-specific genes diminished trimethylation on H3K4 (H3K4me3) and increased trimethylation on H3K27 (H3K27me3), resulting in loss of lineage potential. In mouse embryos, bivalent modifications of H3K4me3 and H3K27me3 were equivalently formed on the H3.3-incorporated region before embryonic skeletal muscle differentiation at myogenic loci. These results suggest that lineage potential is established through selective H3.3 incorporation into chromatin and is defined by a quantitative balance among histone modifications.

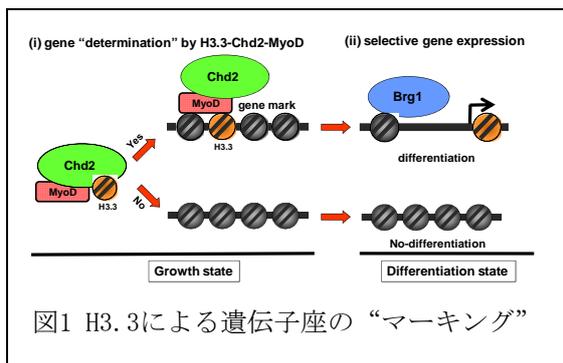
研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・ゲノム生物学

キーワード：クロマチン 骨格筋分化 次世代シーケンサー ジーンクラスタリング

1. 研究開始当初の背景

骨格筋分化での遺伝子発現制御解析は、1980年代に発見された骨格筋分化を誘導するマスター遺伝子 MyoD を起点として、組織特異的転写因子による下流の遺伝子発現制御解析により盛んに行われてきた。しかしながら、近年我々や他のグループにより、骨格筋分化マーカーとなる遺伝子の直接の転写活性化には、myogenin、Mef2s などの転写因子がかかわる一方で、MyoD そのものは関与しないことが明らかとなった。さらに、ゲノムワイドな解析 (ChIP-seq: 網羅的クロマチン免疫沈降産物の同定法) により、MyoD が未分化状態の骨格筋前駆細胞で転写活性化以外のゲノム上の領域に広範に結合していることが明らかとなった (Cao et al., 2010, *Cell*)。そこで我々は、MyoD の分化運命決定を行うメカニズムを解明するために、まず MyoD 結合因子の探索を行った。その結果、MyoD がクロマチンリモデリング因子の一つである Chd2 と結合していることを見出した。この Chd2 は当時遺伝子の全長すら決まっていなかった未知の遺伝子であり、その機能も不明であった。私たちは、MyoD/Chd2 複合体同定の過程で、この分子がヌクレオソームと高い親和性を示すこと、このヌクレオソームの中に H3.3 とよばれるヒストンバリエントが含まれていることを発見した。先行論文の結果から、この H3.3 は転写活性化される領域に選択的に取り込まれていることが明らかになってきたため、我々は H3.3 が MyoD/Chd2 複合体により選択的に骨格筋遺伝子座をマーキングしているのではと考え、骨格筋前駆細胞の分化前後におけるゲノム上の H3.3 の分布を ChIP-seq により解析した。その結果、従来知られていた分化前後で転写活性化される遺伝子座のみならず、H3.3 が分化前に、分化後に発現する遺伝子座にすでに取り込まれている知見を得た。Chd2 を発現抑制した骨格筋



前駆細胞を用いた解析により、骨格筋特異的遺伝子座のみ Chd2 依存的に H3.3 が分化前より取り込まれていることが明らかとなった。また MyoD の発現抑制解析により、H3.3 の取り込みと Chd2 のゲノム上へのリクルートが MyoD 依存的であることが明らかとなった。NIH3T3 細胞に MyoD を強制発現させると、分化誘導後 72 時間で骨格筋分化することが知られているが、MyoD と H3.3 の関連性を調べ

た結果、MyoD 導入直後に骨格筋特異的遺伝子座に H3.3 の取り込みが誘導されることが明らかとなった。以上のことから、この結果は骨格筋をモデル系とした解析だが、細胞分化の形質決定は H3.3 による選択的な遺伝子座の“マーキング”に依存していることが示唆された。これは、現在注目を浴びている iPS や他の転写因子による形質獲得系においても、ゲノムのマーキングが深く関わっていることを強く示唆していた。

2. 研究の目的

骨格筋分化マーカー遺伝子は、ゲノム上で H3.3 によりマーキングされた後、すみやかに各々の遺伝子座が空間的に近接する遺伝子集積現象がおこることを、我々は明らかにしている。さらにこのジーンクラスターリングと呼ばれる現象が、細胞が分化する前の段階で既に起こっていることを明らかにしている。つまり、骨格筋分化では、ゲノムマーキングされた後に空間的な制御を受けることで、その後の分化段階で秩序だった遺伝子発現制御が行われるのではないかと考えた。そこで本研究では、骨格筋分化時の“個”の遺伝子の発現を繋ぐ“群”の遺伝子発現制御としてジーンクラスターリングが機能しているのではないかと考え、高次クロマチン構造解析をゲノムワイドに高次構造、ヒストンバリエントの取り込み、転写の様々な角度から解析を試みた。

3. 研究の方法

“群”の遺伝子発現制御を行うため、骨格筋分化の幹細胞から前駆細胞、そして最終分化に至る各段階の組織を、転写因子の発現パターンに基づき分画した。これらの純化した分画した組織を H3.3、H3K4me3、H3K27me3、局所的な高次クロマチン構造を評価するクロマチンアクセシビリティを用いて、ゲノムワイドな網羅的な解析を行った。更に、ヒストンマーキングヒストによる群の遺伝子解析を詳細に行うため、複合体精製を試みた。その後、同定された因子群の導入による骨格筋遺伝子のジーンクラスターリング誘導能と、“群”の遺伝子発現誘導能を評価した。

4. 研究成果

分化に伴って発現するすべての遺伝子の発現制御、つまり、高次制御の全容解明を行うためには、発生胚を含めた生体組織を用いることが望ましい。なぜなら、できるだけ多くの種類の遺伝子発現が *in vivo* と同じでなければ、正常な遺伝子座の“選択的制御”を解析することが難しいためである。しかしながら、これまで筋組織は分化後に多核体を形成するという特徴故に、細胞表面マーカーによるセルソーター技術を用いることが困難であった。しかし一方で、転写制御研究が盛んなため、発生段階特異的な転写因子は詳細に同定されていた。そこで、我々は骨格筋前駆

組織を転写因子発現情報に基づき、E8.5からE14.5のマウス胚まで分画し、それぞれ骨格筋幹細胞 (Pax3+/MyoD-/Myf5-)、前駆細胞 (Pax3+/MyoD+, Pax3-/pax7-/MyoD+)、筋組織 (Myogenin+/Mef2+)としてサンプルを解析した。Pax3, Pax7, Myf5, MyoD, Myogenin, Mef2sなどのモノクローナル抗体は独自に大量取得した。これを元に詳細なマッピングをH3.3抗体によるChIP-seqにより行った。これまでに骨格筋前駆細胞としてC2C12細胞を用いてゲノムワーキング機構を明らかにしてきたが、C2C12は*in vivo*と同様の成熟した筋分化をせず、いくつかの遺伝子の発現が起こらないことが知られている。H3.3によるゲノムマーキングの領域と比較していくことで、個別の遺伝子ではなく、分類された分化に関わる遺伝子群が、極めて分化の初期にH3.3によりマーキングされ、発現制御を受けることが明らかとなった。更にH3.3の修飾領域ではH3K4me3とH3K27me3の双極性修飾が多く存在していることが明らかとなりこれら修飾は発生の過程とともにH3K4me3もしくはH3K27me3のいずれかに収束していることが明らかとなった。本研究においては3C-seq解析で得られたジーンクラスタリング情報は1Mbpの解像度に留まっており、遺伝子間情報の抽出は困難であった。また、理論計算の結果、マウスゲノムにおいて遺伝子レベルでのクラスタリングの抽出するためには10⁹細胞が必要であり、また、細胞毎に遷移する相互作用の検出には不向きであることが明らかとなった。(論文投稿準備中)そこで、Fluorescent in situ DNA hybridization(FISH)を行った。BACPACより購入したBACクローンからFISH用プローブの作成し、C2C12細胞株を用いた実験においてはckmやsk-alphaアクチンの遺伝子座について二つの遺伝子座をラベルし、顕微鏡下で可視化する相補的な解析を行った。以上の方法により、ゲノムワイド3Cの実験系を全く別の可視化の解析系から検証した。その結果、少なくとも分化に伴う相互作用は未分化段階で頻発し、分化に伴い減少することが明らかとなった。しかし、核の大きさそのものが大きく変動しており、有意な違いと決定できるデータは得られていない。一方で、これらの解析によりゲノムマーキングが核サイズの変動を含めたジーンクラスタリング形成誘導に関わっていること、骨格筋分化段階での遺伝子集積の情報のうち、最終骨格筋分化マーカー遺伝子座が含まれるカテゴリーがマーキングされる時期とクラスタリングが形成される時期がほぼ同一であることを明らかにした。本現象は脂肪細胞分化でも同様のことが確認された(発表論文3)次にゲノムマーキングの機能形成にかかわる因子をcandidate approachにより探索と同定を試みた。結果現在までに8種類の初期分化に関わる候補因子を同定し、解析を進めている。その中でもEZH2はH3.3上にH3K27me3を誘

導する因子として機能していることが示唆された。(論文投稿中)また、本研究において別の展開もあった。ChIPseq解析の結果、H3.3ではなくH3.1が相乗的に分化を制御している可能性を見出した。H3.1の過剰発現の結果、分化が抑制されジーンクラスタリングも形成されない。これらはヒストンバリエーションの量的変動による分化制御機構の存在を意味しており(論文投稿中)、引き続き研究を展開している。

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)

[雑誌論文](計 11件)

- ① Harada A, Hayashi M, Kuniyoshi Y, Semba Y, Sugahara S, Tachibana T, Ohkawa Y, Fujita M. Generation of a monoclonal antibody for INI1/hSNF5/BAF47. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2014 Feb;33(1):49-51. 査読有
doi: 10.1089/mab.2013.0065.
- ② Harada A, Okazaki E, Okada S, Tachibana T, Ohkawa Y. Production of a monoclonal antibody for C/EBP β : the subnuclear localization of C/EBP β in mouse L929 cells. *Monoclon Antib Immunodiagn Immunother.* 2014 Feb;33(1):34-7. 査読有
doi: 10.1089/mab.2013.0069.
- ③ LeBlanc SE, Wu Q, Barutcu AR, Xiao H, Ohkawa Y, Imbalzano AN. The PPAR γ locus makes long-range chromatin interactions with selected tissue-specific gene loci during adipocyte differentiation in a protein kinase A dependent manner. *PLoS One.* 2014 Jan 20;9(1):e86140. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0086140. eCollection 2014.
- ④ Katahira J, Okuzaki D, Inoue H, Yoneda Y, Maehara K, Ohkawa Y. Human TREX component Thoc5 affects alternative polyadenylation site choice by recruiting mammalian cleavage factor I. *Nucleic Acids Res.* 2013 Aug;41(14):7060-72. 査読有
doi: 10.1093/nar/gkt414.
- ⑤ Kumamaru H, Saiwai H, Kubota K, Kobayakawa K, Yokota K, Ohkawa Y,

- Shiba K, Iwamoto Y, Okada S.
Therapeutic activities of engrafted
neural stem/precursor cells are not
dormant in the chronically injured
spinal cord. *Stem Cells*. 2013
Aug;31(8):1535-47. 査読有
doi: 10.1002/stem.1404.
- ⑥ Maehara K, Odawara J, Harada A,
Yoshimi T, Nagao K, Obuse C, Akashi K,
Tachibana T, Sakata T, Ohkawa Y.
A co-localization model of paired
ChIP-seq data using a large ENCODE
data set enables comparison of
multiple samples.
Nucleic Acids Res. 2013 Jan
7;41(1):54-62. 査読有
doi: 10.1093/nar/gks1010.
- ⑦ Harada A, Okada S, Konno D, Odawara J,
Yoshimi T, Yoshimura S, Kumamaru H,
Saiwai H, Tsubota T, Kurumizaka H,
Akashi K, Tachibana T, Imbalzano AN,
Ohkawa Y.
Chd2 interacts with H3.3 to determine
myogenic cell fate.
EMBO J. 2012 Jun 29;31(13):2994-3007.
査読有
doi: 10.1038/emboj.2012.136.
- ⑧ Kumamaru H, Saiwai H, Ohkawa Y, Yamada
H, Iwamoto Y, Okada S.
Age-related differences in cellular
and molecular profiles of
inflammatory responses after spinal
cord injury.
J Cell Physiol. 2012
Apr;227(4):1335-46. 査読有
doi: 10.1002/jcp.22845.
- ⑨ Kumamaru H, Ohkawa Y, Saiwai H, Yamada
H, Kubota K, Kobayakawa K, Akashi K,
Okano H, Iwamoto Y, Okada S.
Direct isolation and RNA-seq reveal
environment-dependent properties of
engrafted neural stem/progenitor
cells.
Nat Commun. 2012;3:1140. 査読有
doi: 10.1038/ncomms2132.
- ⑩ Odawara J, Harada A, Yoshimi T,
Maehara K, Tachibana T, Okada S,
Akashi K, Ohkawa Y.
The classification of mRNA expression
levels by the phosphorylation state of
RNAPII CTD based on a combined
genome-wide approach.
BMC Genomics. 2011 Oct 20;12:516. 査
読有
doi: 10.1186/1471-2164-12-516.
- ⑪ Tanaka M, Shiota M, Okada S, Harada A,
Odawara J, Mun S, Iwao H, Ohkawa Y.
Generation of a rat monoclonal
antibody specific for hsp72.
Hybridoma. 2011 Aug;30(4):397-400.
査読有
doi: 10.1089/hyb.2011.0015.
- [学会発表] (計 23 件)
- ① Akihito Harada, Kazumitsu Maehara,
Yasuyuki Ohkawa.
The balance of histone H3 variants
around transcription start sites
dictates cell differential potential,
Keystone Symposia, 2014.02.06, Santa
Fe Community Convention Center (USA)
- ② Kazumitsu Maehara, Yasuyuki Ohkawa,
The formation of nucleosome
positioning patterns flanked by
transcription factor binding site,
Keystone Symposia,
2014.02.06, Santa Fe Community
Convention Center (USA)
- ③ 原田 哲仁, 前原 一満, 佐藤 優子, 今野
大治郎, 立花 太郎, 木村 宏, 大川 恭行,
ヒストン H3 バリエーションの選択的取り込
みは骨格筋分化能を支配する, 第 36 回
日本分子生物学会年会, 2013.12.5,
神戸ポートアイランド(兵庫)
- ④ 大川 恭行, 原田 哲仁, 前原 一満
ヒストン H3 バリエーションは骨格筋分化能
を決定する, 第 36 回日本分子生物学会
年会, 2013.12.5,
神戸ポートアイランド(兵庫)
- ⑤ 前原 一満, 大川 恭行
単一の ChIP-Seq データを使った細胞分
化におけるヌクレオソーム配置と転写
因子結合の一体的解析, 第 36 回日本分
子生物学会年会, 2013.12.5, 神戸ポ
ートアイランド(兵庫)
- ⑥ 林 正康, 小田原 淳, 原田 哲仁, 前原
一満, 吉見 智彦, 立花 太郎, 赤司 浩一,
大川 恭行
マウス胚性幹細胞において
Chromodomain Helicase DNA binding
protein (Chd5)は Oct3/4 と共役して未
分化性の維持に寄与する, 第 36 回日本
分子生物学会年会, 2013.12.4,
神戸ポートアイランド(兵庫)
- ⑦ 大川 恭行, Epigenomic approach
unveils cell fate decision, 日本遺伝
学会第 85 回大会, 2013.9.21,

慶応大学 日吉キャンパス (神奈川県)

- ⑧ Yasuyuki Ohkawa, Hitoshi Kurumizaka, Hiroshi Kimura, High order chromatin regulation in skeletal muscle differentiation, 第 86 回日本生化学会大会, 2013. 9. 12, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ⑨ 大川 恭行, Histone variants determine the lineage potential of skeletal muscle, Fukuoka International Symposium on Genomics & Epigenomics 2013, 2013. 9. 10, 九州大学 (福岡)
- ⑩ 大川 恭行, ヒストンバリエント H3.3 による細胞運命決定, 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013. 6. 20, ウィンクあいち (名古屋)
- ⑪ 前原 一満, 小田原 淳, 原田 哲仁, 大川 恭行, 共局在性を評価する回帰モデルと ENCODE データセットを用いた ChIP-seq データの複数サンプル比較解析法, 第 65 回日本細胞生物学会大会, 2013. 6. 19, ウィンクあいち (名古屋)
- ⑫ 大川 恭行, 原田 哲仁, ヒストンバリエントによる骨格筋運命決定, 第 7 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2013. 5. 31, 奈良県新公会堂
- ⑬ 大川 恭行, 次世代シーケンサーによる細胞分化運命決定メカニズムの解明, 第 56 回日本腎臓学会学術総会, 2013. 5. 11, 東京国際フォーラム
- ⑭ 前原 一満, 小田原 淳, 原田 哲仁, 吉見 智彦, 長尾 恒治, 小布施 力史, 立花 太郎, 坂田 年男, 大川 恭行, 共局在回帰モデルと ENCODE データセットを介した ChIP-seq データの多サンプル比較解析, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 14, 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡
- ⑮ 大川 恭行, 高次クロマチン構造制御による骨格筋分化制御, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 12, 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡
- ⑯ 原田 哲仁, 小田原 淳, 前原 一満, 立花 太郎, 木村 宏, 大川 恭行, Chd2 依存的な H3.3 マーキングが筋発生における骨格筋遺伝子の bivalent gene の形成に必要である, 第 35 回日本分子生物学会年会, 2012. 12. 11, 福岡国際会議場・マリノメッセ福岡
- ⑰ 大川 恭行, 高次クロマチン構造における細胞分化運命決定, 第 33 回日本炎症・再生医学会, 2012. 7. 5, ホテル日航福岡
- ⑱ 大川 恭行, ヒストンバリエント H3.3 取り込みによる骨格筋分化運命決定, 第 6 回日本エピジェネティクス研究会年会, 2012. 5. 14, 学術総合センター (東京)
- ⑲ Jun Odawara, Akihito Harada, Yasuyuki Ohkawa, Control of gene expression through the phosphorylation of Ser2 and Ser5 of RNAP II: A combined analysis for ChIPseq and RNAseq, KEYSTONE SYMPOSIA, 2012. 1. 19, Keystone Resort (USA)
- ⑳ Akihito Harada, Anthony N. Imbalzano, Yasuyuki Ohkawa, Chd-2 dependent deposition of H3.3 is required for myogenic cell fate, KEYSTONE SYMPOSIA, 2012. 1. 19, Keystone Resort (USA)
- ㉑ Yasuyuki Ohkawa, Jun Odawara, Akihito Harada, The deposition of histone variants is the basis of chromatin structural changes in cell fate decision, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011. 12. 16, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ㉒ Akihito Harada, Jun Odawara, Kazumitsu Maehara, Tomohiko Yoshimi, Saori Yoshimura, Taro Tachibana, Hitoshi Kurumizaka, Hiroshi Kimura, Yasuyuki Ohkawa, Chd-2 dependent deposition of H3.3 is crucial for Brg1 recruitment in myogenesis, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011. 12. 16, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- ㉓ Kazumitsu Maehara, Jun Odawara, Akihito Harada, Tomohiko Yoshimi, Taro Tachibana, Yasuyuki Ohkawa, Control of gene expression through the phosphorylation of Ser2 and Ser5 of RNAPII: A combined analysis for ChIPseq and RNAseq, 第 34 回日本分子生物学会年会, 2011. 12. 14, パシフィコ横浜 (神奈川県)
- [図書] (計 5 件)
- ① 大川 恭行, 原田 哲仁. エピジェネティクスで解く細胞運命制御、クロマチン構造から理解する細胞運命決定. 実験医学, 羊土社, 2013 (8 月号) Vol. 31 No. 13: 2083-2088
- ② 大川 恭行, 小田原 淳, 原田 哲仁.

ChIP-seq のためのクロマチン免疫沈降法.
実験医学, 羊土社, 2013 (3月号)
Vol.31 No.4: 577-582

- ③ 原田 哲仁, 大川 恭行.
骨格筋分化における高次クロマチン構造解析.
細胞工学, 学研メディカル秀潤社,
2012 (8月号) Vol.31 No.8: 877-881
- ④ Ohkawa Y, Mallappa C, Vallaster CS,
Imbalzano AN.
An improved restriction enzyme
accessibility assay for analyzing
changes in chromatin structure in
samples of limited cell number.
Springer, *Methods Mol Biol.*
2012;798:531-42.
- ⑤ Ohkawa Y, Mallappa C, Vallaster CS,
Imbalzano AN.
Isolation of nuclei from skeletal
muscle satellite cells and myofibers
for use in chromatin
immunoprecipitation assays.
Springer, *Methods Mol Biol.*
2012;798:517-30.

[その他]

ホームページ等

<http://chromatin.med.kyushu-u.ac.jp/>
九州大学 医学研究院 先端医療医学部門
エピジェネティクス分野/大川研究室

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大川 恭行 (OHKAWA, Yasuyuki)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 80448430

(2) 研究分担者

岡田 誠司 (OKADA, Seiji)
九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授
研究者番号: 30448435