

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880015

研究課題名(和文) エピゲノム形成における卵子特異的リンカーヒストンH1fooの分子作用機序の解明

研究課題名(英文) Role of oocyte-specific linker histone H1foo on establishment of epigenome

研究代表者

早川 晃司 (Hayakawa, Koji)

東京大学・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号：50636800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では卵子特異的なリンカーヒストンH1fooが領域特異的にゲノムDNAの利用を可能にする機能があることを明らかにした。細胞によって機能が異なるのは、設計図であるゲノムDNAによる違いではなくゲノムの利用の仕方が違うからである。これは、今の生物学では当たり前のこととなってきた。しかし、領域特異的にゲノム利用を変える仕組みについては不明な点が多い。本研究ではH1fooが多能性に関わる遺伝子や卵子の機能に必要な遺伝子が位置するゲノムDNA上に局在し、利用可能な状態に促すことを明らかにした。また、そのH1fooの役割はEsrrbタンパク質との共役によって達成されることも見出した。

研究成果の概要(英文)：Each cell types have different functions because its utilizations of genomic DNA, which is known as a blue print of organism, are difference. This is an obvious thing in basic biology. However, it is unclear that how cell-specific and locus-specific genome utilization are established. To resolve this issue, this study focused on role of linker histone, especially oocyte-type H1foo. H1foo was well located at the active epigenetic loci, marking H3K4-trimethylation and H3K9-acetylation. These results indicated that H1foo selectively bind to chromatin decondensed loci. Furthermore, H1foo was physiologically bound with Esrrb on the target genomic loci. Thus, this study suggests that H1foo has a function for selectively binding to chromatin decondensed genomic regions via the conjugation with Esrrb, and has an impact on the genome-wide, locus-specific genome utilization.

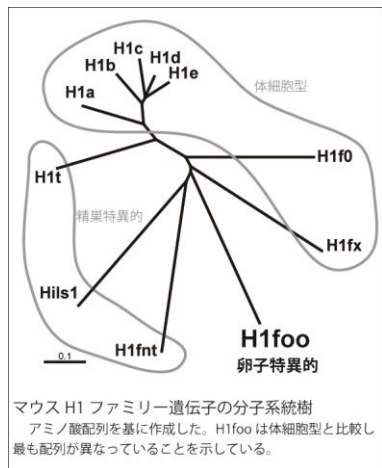
研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：リンカーヒストン 卵子特異的 クロマチン DNAメチル化 ヒストン修飾 エピゲノム

1. 研究開始当初の背景

ヒストンH1はクロマチンのリンカーDNA部分に結合し、クロマチン構造の凝縮を促す機能を持つと考えられている。哺乳類では11種のヒストンH1ファミリー遺伝子が存在し、7つは体細胞、3つは精巢特異的、1つは卵子特異的に発現している(Godde et al., Int J Dev Biol., 2009)。卵子特異的H1であるH1fooはDNAメチル化によって体細胞および雄生殖細胞では発現が抑えられていることが当研究室の解析により明らかとなっている(Maeda et al., Biol Reprod., 2008)。この報告は、H1fooは発現細胞で有利に働き、逆に非発現細胞では不利に働くためにDNAメチル化によって厳しく制御されていること示唆している。また、H1fooは体細胞型ヒストンH1とは配列保存性が低い(約50%)ことから、H1遺伝子ファミリーに属しているとはいえ必ずしもこれまで明らかとされているH1の機能と同じであるとは考えにくい。



申請者が行った先行研究の結果、卵子特異的ヒストンH1であるH1fooを胚性幹細胞(ES細胞)に異所的に発現させたところ、H1fooはES細胞の分化を著しく抑制した。また、これらの細胞を用いて未分化維持および分化に必須である数十遺伝子のDNAメチル化状態とクロマチン状態を調べたところ、分化多能性関連遺伝子群(例えばNanogやMyc)の分化に伴うDNAメチル化の充進とクロマチン凝縮が阻害されていた。つまり、H1fooはこれまでに言われてきたようなヒストンH1の機能とは逆でゲノム領域によってはクロマチンの脱凝縮を促すのである。この先行研究から、H1fooによってクロマチンの脱凝縮を誘導される特異的領域がゲノム上に多数存在していることが予想される。

2. 研究の目的

ゲノム全域におけるH1foo標的領域の同定とH1fooが引き起こすクロマチン変化の分子メカニズム解明に挑む。

3. 研究の方法

ChIP-SeqによるH1foo標的ゲノム領域の同定、およびHELP-tagging法で明らかとする

H1foo強制発現ES細胞におけるゲノムワイドのメチル化状態に応じて標的領域の分類・特徴付けを行う。さらにH1foo強制発現ES細胞で得られた結果がマウス卵子で実際反映されるかをChIP法で確かめる。以上を行い、ゲノムワイドにH1fooの標的領域が明らかになるとともに、H1fooを中心としたエピジェネティック制御の分子作用機序に迫る成果を得られる。

4. 研究成果

(1) H1foo標的ゲノム領域の同定およびその特徴

H1foo融合EGFPを恒常的に発現させたES細胞(以下、H1foo強制発現ES細胞)におけるChIP-SeqによるH1foo結合ゲノム領域の探索を行った。H1fooの標的領域はゲノム上に約3万カ所存在し、その多くは遺伝子プロモーター領域(24.7%)と遺伝子内領域(59.3%)に位置していた。また、体細胞型H1に対する抗体を用いてChIP-seq解析を行ない、H1fooの標的領域と比較したところ、H1foo標的と重複した領域の割合はH1foo全標的領域の内20.8%だった。つまり、H1fooは体細胞型とは異なった標的領域を有することが示された。

次にデータベース(他の研究グループのChIP-seqデータ)を利用しH1fooが結合する領域の特徴付けを行った。その結果、H1fooは体細胞型H1に比べ、活性型のエピジェネティック状態を示すゲノム領域に位置しており、特にH3K4モノおよびトリメチル化、H3K9アセチル化修飾とよく一致していた(図1A)。本来のH1foo発現細胞である卵子においても、H1foo強制発現ES細胞で同定されたゲノム領域にH1fooは結合していた(図1B)。

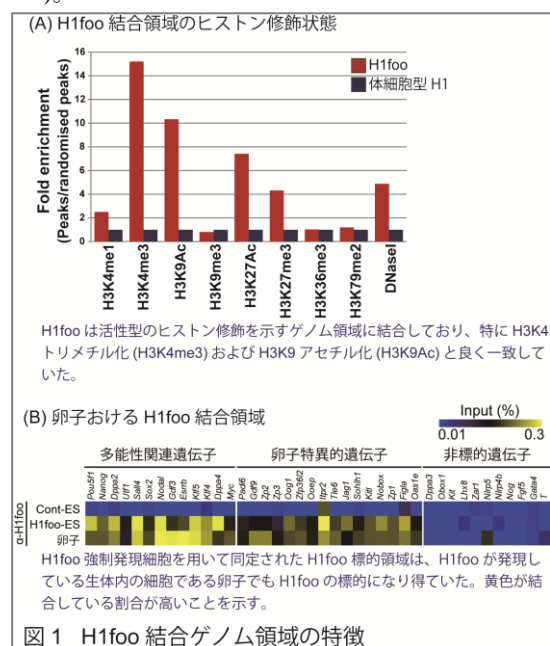


図1 H1foo結合ゲノム領域の特徴

このことから、H1fooは選択的に活性型のエピジェネティック状態を示す領域に結合していることが示唆された。また、H1fooの



標的となる遺伝子は初期胚発生に関わる遺伝子、生殖細胞で発現が高い遺伝子が有意であった。

さらに、H1foo 強制発現 ES 細胞と野生型 ES 細胞の DNA メチル化状態をゲノムワイド DNA メチル化解析法 HELP-tagging により決定し比較することで H1foo によりメチル化・脱メチル化される領域を同定した。

(2) H1foo の共役因子 Esrrb の発見

H1foo によって DNA が脱メチル化およびクロマチンが弛緩するメカニズムを明らかにすることを目的に次の解析を行った。上記の ChIP-seq と HELP-tagging のデータを基に、H1foo 強制発現によって DNA が脱メチル化される H1foo 標的配列に対してモチーフ解析を行った。その結果、ES 細胞マーカータンパク質である Esrrb の標的配列を有意に含んでいた (図 2A)。さらに、Re-ChIP 解析、共免疫沈降法および GST プルダウン解析によって、H1foo と Esrrb が直接結合していることが明らかとなった (図 2B)。H1foo と Esrrb の結合は卵核抱期卵においても確認された。

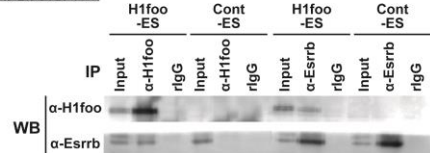
(A) H1foo 結合領域の配列モチーフ解析

配列	候補タンパク質
H1foo 脱メチル化領域 P=4.9E-55 	ESR1, Esrrb , ESR2 RORA, NR4A2
H1foo メチル化領域 P=1.4E-36 	Six3, Six1, IRF, Six6, SP1

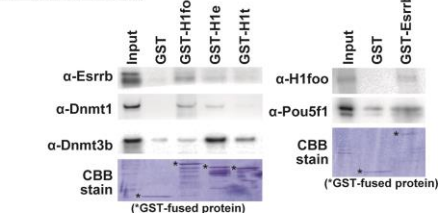
H1foo によって DNA が脱メチル化される領域とメチル化される領域に対してモチーフ解析を行った。それぞれ異なるモチーフを持ち、脱メチル化される領域では Esrrb が候補に入っていた。

(B) H1foo と Esrrb の結合解析

共免疫沈降法



GST プルダウン法

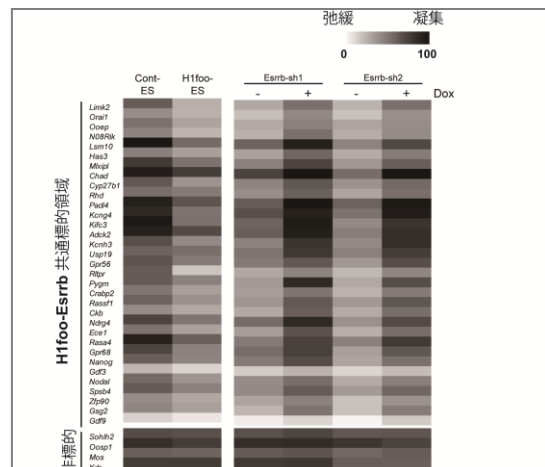


H1foo と Esrrb が結合している共免疫沈降法と GST プルダウン法によって解析した。その結果、どちらの実験系においても H1foo と Esrrb が結合していることが分かった。また、GST プルダウン法の結果から、H1foo 以外の H1 (H1e と H1t) は Esrrb と結合能がないことが分かった。

図 2 H1foo の共役タンパク質 Esrrb

また、H1foo と Esrrb が共局在しているゲノム領域は H1foo の強制発現によってクロマチンの弛緩が起こっている (図 3; Cont-ES vs H1foo-ES)。そこで、次にこの H1foo 依存的なクロマチンの弛緩への Esrrb の関与を明

らかにするため、H1foo 強制発現 ES 細胞において Esrrb の発現抑制(ノックダウン)を行った。その結果、H1foo が発現していても Esrrb の発現が抑制されている場合、H1foo によるクロマチンの弛緩は起こらなかった (図 3)。



H1foo と Esrrb の共通標的ゲノム領域のクロマチン状態を DNase I 感受性法で解析したところ、H1foo の強制発現によって弛緩していた。次に、Esrrb に対する shRNA を Dox で誘導し発現抑制を行ったところ、H1foo が発現しているにも関わらずクロマチンは凝集していた。このことから、H1foo によるクロマチンの弛緩には Esrrb が必要であることが分かった。

図 3 H1foo によるクロマチンの弛緩には Esrrb が必要である

以上、H1foo の結合タンパク質として Esrrb を同定することができた。H1foo は選択的にクロマチンが弛緩した領域に結合し、H1foo によるクロマチン弛緩は Esrrb との共役によって成されていることが示唆された。

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 2 件)

1. Hayakawa K, Ohgane J, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Oocyte-specific linker histone H1foo is an epigenomic modulator that decondenses chromatin and impairs pluripotency. *Epigenetics*. 2012 Sep;7(9):1029-36. (査読有)
2. Hayakawa K, Hirotsawa M, Shiota K. A Method for Obtaining Epigenomic Data. *The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy*. Pages 773-776. (英語総説、査読なし)

[学会発表] (計 4 件)

1. 早川 晃司 他. 卵子特異的リンカーヒストン H1foo のゲノム標的領域およびその特徴. 第 36 回日本分子生物学会年会. 2013 年 12 月 3-6 日. 神戸ポートアイランド, 兵庫
2. Koji Hayakawa et al. Histone H1foo, an oocyte-specific linker histone member, decondenses chromatin at unique targets loci in mouse genome. *EMBO Conference Series, Chromatin and Epigenetics*. 2013 年 5 月 8-12. ハイデルベルグ, ドイツ

3. 早川 晃司 他. 卵特異的リンカーヒストン H1foo はクロマチン脱凝縮を促すエピジェネティクス因子である. **第 36 回日本分子生物学会年会**. 2013 年 12 月 12-14 日. 福岡国際会議場・マリンメッセ福岡, 福岡
4. Koji Hayakawa. Oocyte-specific linker histone H1foo is an epigenomic modulator that decondenses chromatin and impairs pluripotency. **Seminar in University of British Columbia** (Host; Dr. Peter C.K. Leung). 2013 年 2 月 18 日. バンクーバー, カナダ. (招待講演)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

早川 晃司 (HAYAKAWA KOJI)

東京大学大学院・農学生命科学研究科・特任助教

研究者番号 : 50636800