

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460373

研究課題名(和文) 分化特異的な遺伝子発現を司るエンハンサーでのヒストンバリエントH3.3の機能評価

研究課題名(英文) Roles of the histone variant H3.3 on the distal enhancer of differentiation specific gene.

研究代表者

西山 晃 (NISHIYAMA, Akira)

横浜市立大学・医学研究科・准教授

研究者番号：80589664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：細胞分化に伴う遺伝子発現の制御には、系譜特異的な転写因子に加え、ヒストンバリエントなどのエピジェネティック制御が深く関ることが明らかとなってきた。ヒストンバリエントH3.3は転写の亢進した領域に取り込まれ、「転写の記憶」を担う一方、エンハンサー領域での役割は不明な点が多い。本研究では、細胞分化に伴い発現が誘導される遺伝子の遠位エンハンサーにおける、ヒストンH3.3の役割の解明を目指し解析を行った。その結果、H3.3はエンハンサー領域と遺伝子の双方に最も早く同時に取込まれる分子であることが判明し、H3.3が両領域の協調を促す機能を持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Gene expression during cell differentiation is regulated by the epigenetic mechanisms, including histone variants, as well as lineage specific transcription factors. Histone variant H3.3 is known to be deposited in transcribed genes and associated with possibly maintenance of transcriptional memory. However, the functions of H3.3 on the distal enhancer are still unclear. In this study, we analyzed the roles of H3.3 on the distal enhancer of differentiation specific gene. H3.3 was first molecule that was deposited on both the distal enhancer and the proximal promoter synchronously, suggesting that H3.3 promotes the cooperation between the distal enhancer and the proximal promoter.

研究分野：分子生物学

キーワード：細胞分化 エピジェネティクス 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

細胞分化は、細胞が組織特異的な機能を獲得する過程の一つである。また、その過程においては細胞の系譜決定を導く、然るべき遺伝子発現が必須である。この遺伝子発現の制御機構の破綻は、発生異常やがんなど様々な疾患を引き起こし得る。近年、遺伝子発現の制御には、転写因子に加え、ヒストン修飾などのエピジェネティック制御が深く関ることが明らかとなってきた。ヒストンバリエーション H3.3 は転写の亢進した領域に取り込まれ、「転写の記憶」を担う。さらに H3.3 は活性化したエンハンサー領域に加え、分化に伴い発現する遺伝子のエンハンサー領域に予備的に取り込まれる。しかしながら、エンハンサー領域での H3.3 の取り込み機構や機能については不明である。

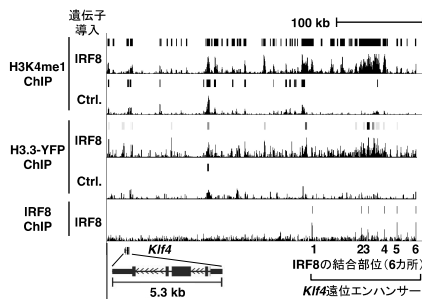
2. 研究の目的

本研究では、細胞分化に伴って誘導される遺伝子発現において、H3.3 がどのような役割を持つかの解明を目指した。特に、系譜特異的な転写因子による遠位エンハンサー形成から遺伝子発現に至る過程において、遠位ならびに近位の転写制御領域への取込み、ならびに転写制御領域への活性化機構についての検討をおこなった。

3. 研究の方法

細胞分化系として、転写因子 IRF8 が誘導する *in vitro* での単球・マクロファージ分化系を用いた。連携研究者の田村が転写因子 *Irf8* 欠損マウスから樹立したミエロイド前駆細胞株 Tot2 に、ドキシサイクリンによる IRF8 発現誘導系を組み込んだ IRF8 tet-on Tot2 細胞を作製した。この細胞は、ドキシサイクリン添加後に、IRF8 の発現が速やかに誘導すること、さらに成熟マクロファージへの最終分化を確認している。

解析対象となるモデル遺伝子として、IRF8 の標的遺伝子の一つであり、単球分化に伴い発現が誘導される *Klf4* を選択した。IRF8 は *Klf4* の 200 kb 上流に複数箇所結合し、100 kb 以上にわたる広大なエンハンサーを形成する。また、これまでのクロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP-seq) 解析によって、このエンハンサー領域には IRF8 が誘導する単球分化に伴い H3.3 が強く取込まれることが判明している (第 1 図)。

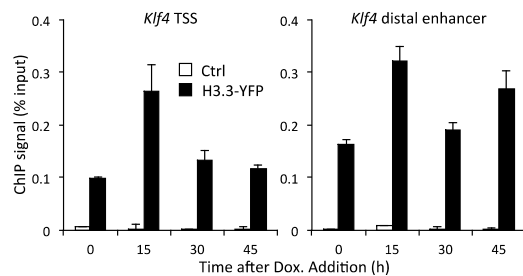


第 1 図 IRF8 によって形成される *Klf4* 遠位エンハンサー

H3.3 の転写制御領域への取込みは、ChIP-PCR によって評価した。H3.3 と YFP との融合遺伝子をレトロウイルスを用いて、IRF8 tet-on Tot2 細胞に導入し、抗 GFP 抗体を用いて ChIP を行った。

4. 研究成果

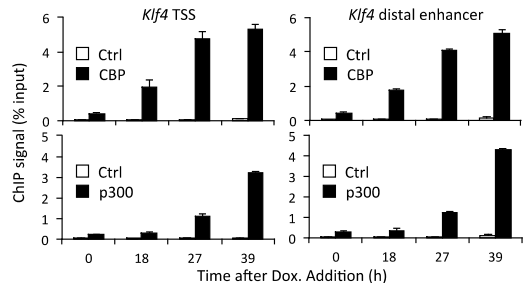
まず、IRF8 が誘導する単球分化において、*Klf4* の遠位エンハンサーならびに転写開始点 (TSS) 付近での H3.3 の取込みを評価した。ドキシサイクリンの添加後、IRF8 の発現は速やかに上昇し、遠位エンハンサー領域においては“poised”エンハンサーのマーカーであるヒストン H4 の 4 番目のリジンのモノメチル化の亢進が見られた。H3.3 の取込みを計測した結果、ドキシサイクリンの添加 15 時間後から H3.3 の ChIP シグナルは急激に増加し、蓄積は 24 時間後まで継続、その後急激に減少するという変動を示した。興味深いことに、この H3.3 の蓄積は、遠位エンハンサーと *Klf4* TSS 領域の双方で観察された (第 2 図)。



第 2 図 *Klf4* 遺伝子の転写制御領域における H3.3 の取込み

この H3.3 の取込みはエンハンサー RNA (eRNA) の転写に伴う可能性も考えられたが、ドキシサイクリン添加後 15 時間では eRNA の発現が認められなかった。また、IRF8 tet-on Tot2 細胞では、IRF8 の発現以前からエンハンサー領域と *Klf4* 遺伝子の両領域が近接していることが判明している。このため、両領域で H3.3 が同期して取込まれたと考えられる一方、H3.3 が両領域の協調を導く分子である事も考えられた。

さらに、*Klf4* エンハンサー領域と TSS 領域の両領域の協調を導く分子の探索を行った。この探索では、協調を導く分子として、H3.3 と同様に両領域で同調して取込まれる分子を探索した。その結果、ヒストンアセチルトランスフェラーゼである CBP/p300 を見出した (第 3 図)。



第 3 図 *Klf4* 遺伝子の転写制御領域における CBP/p300 の取込み

本研究では、細胞分化に伴い発現が誘導される遺伝子の発現制御において H3.3 がどのような役割を持つかの解明を目指して解析を行った。その結果、H3.3 が遠位エンハンサーと TSS 領域の両領域においてに、最も早く同調して取込まれる分子であることを見出した。さらに、H3.3 と同様に両領域に同調して取込まれる分子として、CBP/p300 を見出した。

現時点では、H3.3 の取込み機構と CBP/p300 の取込み機構がどのような連携を持つかは、不明である。しかしながら、CBP/p300 はエンハンサーならびに転写の活性化のマーカーであるヒストン H3 の 27 番目リジンのアセチル化 (H3K27ac) を担う酵素であるとともに、H3.3 は他のヒストン H3 バリエーションと比較して H3K27ac の頻度が高いことが既に知られている。以上のことから、H3.3 ならびに CBP/p300 の取込み機構が密接な関連を持つ可能性は否定できない。

本研究課題では、クロマチン上でのタンパク質複合体の解析を目指して、技術改良を行っていたが、ようやく実現の目処がついてきた。今後、この解析技術を用いて、H3.3 ならびに CBP/p300 の取込み機構を詳細に解析するとともに、分化に伴う遺伝子発現でのエンハンサーと遺伝子の協調を担う分子機構を明らかにしていきたい。

< 引用文献 >

Tamura T, Nagamura-Inoue T, Shmeltzer Z, Kuwata T, Ozato K. ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity* 13, 155-165, 2000.

Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T. Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* 121, 1839-1849, 2013

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8件)

Masuda T, Nishiyama A, Tamura T, Inoue K (他7名,5番目). Transcription factor IRF5 drives P2X4R(+)-reactive microglia gating neuropathic pain. *Nat Commun* 5, 3771, 2014. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms4771

Sharov AA, Nishiyama A, Ko MSH (他4名,2番目). Chromatin Properties of Regulatory DNA Probed by Manipulation

of Transcription Factors. *J Comput Biol* 21, 569-577, 2014. 査読有
DOI: 10.1089/cmb.2013.0126

Kurotaki D, Nishiyama A, Tamura T (他10名,3番目). IRF8 inhibits C/EBP activity to restrain mononuclear phagocyte progenitors from differentiating into neutrophils. *Nat Commun* 5, 4978, 2014. 査読有
DOI: 10.1038/ncomms5978

Sasaki H, Kurotaki D, Nishiyama A, Tamura T (他10名,9番目). Transcription factor IRF8 plays a critical role in the development of murine basophils and mast cells. *Blood* 125, 358-369, 2014. 査読有
DOI: 10.1182/blood-2014-02-557983

Yamamizu K, Nishiyama A, Ko MS (他6名,6番目). Generation and gene expression profiling of 48 transcription-factor-inducible mouse embryonic stem cell lines. *Sci Rep* 6, 25667, 2016. 査読有
DOI: 10.1038/srep25667.

Inamochi Y, Nishiyama A, Mochizuki K (他4名,3番目). Transcription elongation factor Brd4-P-TEFb accelerates intestinal differentiation-associated *SLC24A5* gene expression. *Biochem Biophys Rep* 7, 150-156, 2016. 査読有
DOI:10.1016/j.bbrep.2016.05.016

Ban T, Nishiyama A, Tamura T (他19名,3番目). Lyn Kinase Suppresses the transcriptional activity of IRF5 in the TLR-MyD88 pathway to restrain the development of autoimmunity. *Immunity*. 45, 319-332, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.immuni.2016.07.015

Miyake N, Nishiyama A, Tamura T, Matsumoto N (他29名,27番目). Biallelic *TBCD* mutations cause early-onset neurodegenerative encephalopathy. *Am J Hum Genet* 99, 950-961, 2016. 査読有
DOI: 10.1016/j.ajhg.2016.08.005

[学会発表](計36件)

西山 晃, 黒滝大翼, 田村智彦. 単球分化において転写因子 IRF8 が *Klf4* 遠位エンハンサーとプロモーターの段階的活性化を誘導する. 第76回日本血液学会学術集会, 2014年10月31日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

Nishiyama A, Ban T, Tamura T. Stepwise and bidirectional activation of the *Klf4* distal enhancer and the *Klf4* gene by the transcription factor IRF8 during monocyte differentiation. 第 37 回日本分子生物学会年会, 2014 年 11 月 25 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

西山 晃, 中林 潤, 岡部篤史, 堤 修一, 油谷浩幸, 田村智彦. 単球分化を促す転写因子 IRF8 により活性化される *Klf4* 遠位エンハンサーを起点とした染色体間クロマチンネットワークの解析. 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 2 日, 神戸国際展示場 (兵庫県神戸市)

Nishiyama A, Koizumi S, Sasaki H, Kaneko N, Harada I, Tamura T. BCR-ABL induces the formation of activate enhancers for immunosuppressive genes. 第 78 回日本血液学会学術集会, 2016 年 10 月 14 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

西山 晃, 中林 潤, 伏見健太郎, 田村智彦. 細胞分化特異的な遺伝子発現を導く遠位エンハンサーとプロモーターの相互活性化, 第 39 回日本分子生物学会, 2016 年 12 月 1 日, パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

Nishiyama A, Nakabayahi J, Fushimi K, Tamura T. Stepwise and mutual activation between distal enhancer and proximal promoter in the induction of cell differentiation-related genes. The 2017 Japan-NIH joint Symposium, 2017 年 2 月 16 日, 東北大学星陵オーデトリウム (宮城県仙台市)

〔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

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西山 晃 (NISHIYAMA, Akira)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 8 0 5 8 9 6 6 4

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

田村 智彦 (TAMURA, Tomohiko)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 5 9 2 8 5 1 4 4

黒滝 大翼 (KUROTAKI, Daisuke)
横浜市立大学・医学部・講師
研究者番号: 1 0 5 6 8 4 5 5

(4) 研究協力者

伏見 健太郎 (FUSHIMI, Kentaro)