

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850230

研究課題名(和文)リンカーヒストンの新たな機能～核小体形成と機能に対する役割～

研究課題名(英文)Role of linker histone in the formation and function of nucleolus.

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(農学部)・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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：リンカーヒストンH1はDNAに直接結合し、細胞種や組織特異的にクロマチン構造を制御、安定化する。本研究では、哺乳類において10種類存在するH1バリエーション内の一つであるH1TがrDNA領域を標的としその転写制御に寄与すること、核小体の形成に働くことを明らかとした。核小体はrRNA合成の場であることに加え、tRNAを含めたさまざまな非翻訳RNAを転写・加工してタンパク質と結合させRNA-タンパク質複合体を作るなど、いずれの細胞にとっても不可欠な大型装置として存在している。本研究結果によって、核小体の機能制御因子として新たにリンカーヒストンバリエーションH1Tを見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Linker histone H1 directly binds with DNA and thereby remodels and stabilizes the chromatin structure. Ten H1 variants in mammals are classified into somatic and germ cell-specific variants. H1T is one of the germ cell-specific H1s that is highly expressed in testis, but little more than this expression profile is known about H1T. Here, we describe the target loci and function of H1T. To elucidate the intracellular localization and target loci of H1T, fluorescent immunostaining and ChIP-seq were performed. H1T accumulated in nucleoli and predominantly targeted ribosomal DNA (rDNA) repeats, which differs from somatic H1s' targets. Furthermore, the function of H1T at rDNA repeats was analyzed. According to the results of DNase I sensitive assay and RT-qPCR, H1T repressed rDNA transcription by condensing the chromatin structure. Imaging analysis indicated that H1T expression affected nucleolar formation. Collectively, H1T plays a role in rDNA transcription by targeting rDNA repeats.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：リンカーヒストン 核小体 エビジェネティクス クロマチン

1. 研究開始当初の背景

顕微鏡で細胞の観察を行うと核内に黒い構造体を容易に見て取れ、これは核小体と呼ばれる。核小体研究の歴史は古く、顕微鏡が誕生して以来最も観察しやすい核内構造体であることから多くの研究者の研究対象となってきた。核小体は rRNA 合成の場であることに加え、近年の解析から tRNA を含めたさまざまな非翻訳 RNA を転写・加工してタンパク質と結合させ RNA-タンパク質複合体を作るなど、いずれの細胞にとっても不可欠な大型装置として存在している(Boisvert et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2007)。

我々ヒトを含め哺乳類の身体は、形や機能が様々な 200 種類以上の細胞から構成され、一部の例外はあるが、同一の遺伝子情報を保有している。しかし発生過程において、ある遺伝子(群)は活性化され、またある遺伝子(群)は不活性化され、細胞種ごとに固有な遺伝子発現セットが決定される。このゲノムスイッチとして働くエピジェネティクス制御系は遺伝子機能の記憶装置であり、その中心は DNA メチル化とヒストン修飾によるクロマチン構造変化である(Li, *Nat Rev Genet*, 2002; Shiota et al., *Cytogenet Genome Res*, 2004)。

rRNA をコードしている rDNA 領域も例外ではなくエピジェネティック制御下にある(Grummt, *Biochim. Biophys. Acta*, 2013)。非膜構造体である核小体は rRNA 遺伝子が数百連なった rDNA 領域、rRNA および rRNA 結合タンパク質などにより形作られている。よって、rDNA 領域のクロマチンおよびエピジェネティック状態が rRNA の転写調節のみならず核小体の構造自体にも寄与していることは容易に想像できる。

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 10 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、2 つは精巣特異的、1 つは卵子特異的に発現している(Godde et al., *Int J Dev Biol.*, 2009)。精巣特異的に発現するバリエーションの一つである HIT は上述の体細胞型ヒストン 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。

先行研究の中で、乳線上皮癌由来細胞と正常乳線上皮細胞において H1 遺伝子ファミリーの mRNA 発現を比較解析したところ、乳癌細胞で精巣でのみ発現すると考えられてきたバリエーション HIT が発現していることを見出した。さらに、HIT 特異抗体を作成し免疫染色を行った結果、HIT は特に核小体に局在していた。これらのことから、HIT が rDNA 領域のクロマチン構造変化に働くことで細胞種特異的な核小体構造および機能を決定する因子として働いていることが予想された。

2. 研究の目的

リンカーヒストンバリエーションの一つである HIT の核小体形成および機能に対する役割を明らかにする。

3. 研究の方法

AGS、MDA-MB-231、MCF-7 を含む 8 種類のヒトの癌細胞株、ヒト骨格筋など初代培養体細胞 5 種類、精巣、胃およびマウス胚性幹細胞(mESC)を用い mRNA 発現解析を行った。蛍光免疫染色法、クロマチン免疫沈降(ChIP)法を含む HIT タンパク質解析のために HIT 特異抗体を作製した。AGS、MDA-MB-231、MCF-7 については 3xFlag 融合 HIT の強制発現株の作製および HIT ノックダウン細胞を準備し、ChIP-qPCR、DNase I sensitive assay、pre-rRNA 発現解析、核小体のサイズ測定に供した。核小体のサイズは核小体マーカー-B23 で免疫染色後、画像解析ソフト CellProfiler で計測した。

4. 研究成果

リンカーヒストンバリエーション HIT の核小体における機能

まず初めに癌細胞など様々な細胞種で発現を調べたところ、HIT は解析に供した全癌細胞株、mESCs、および一部の正常体細胞でも発現していることを発見した。つまり HIT は生殖細胞のみならず多くの細胞種で機能していることが期待された。次に、HIT 特異抗体を用いて非生殖細胞における HIT の細胞内局在の観察したところ、HIT は全ての細胞種で核小体に強い局在を示し、その局在は細胞周期非依存的であった。

AGS、MDA-MB-231、MCF-7、mESC を用いて ChIP-seq 法によってゲノムワイドに標的領域を探索した結果、体細胞型 H1 とは異なり、主にリボソーム DNA(rDNA)領域に結合していた。rDNA 領域特異的なプライマーを用いた ChIP-qPCR 法によっても HIT の rDNA 領域への結合を確認でき、特に転写開始点付近に多く結合していた。rRNA をコードしている領域が数百コピー連なる rDNA 領域は核小体内に存在し、その領域のクロマチン構造変化は rRNA 転写量および核小体の形態に影響する。そこで、HIT のクロマチン構造に対する機能を明らかにするため、AGS、MDA-MB-231、MCF-7 の 3xFlag-HIT 強制発現細胞株を用いて DNase I sensitive assay を行った。その結果、HIT には rDNA 領域のクロマチンを凝集させる働きがあることが分かった。また同様の細胞種におけるノックダウン実験で pre-rRNA の発現量は増加し、強制発現株では減少していたことから HIT は rRNA の転写を抑制することが明らかになった。更にこれらの細胞における核小体のサイズを計測したところ、HIT には核小体を縮小させる機能も有していることが示された。

以上より、rDNA 領域を標的とする点が、体細胞型に比べて HIT で特徴的であることが

明らかとなった。また、HITが癌細胞およびmESCsで発現し、rDNA領域のクロマチン構造凝集によりrRNAの転写を抑制するという機能を有していた。これは癌細胞や多能性幹細胞の無限に増殖するという形質に矛盾するようであるが、増殖に向かう働きが過剰になり細胞が破綻するのを防ぐためにHITが働いていることが示唆された。また、rDNA領域はコピー数の減少に繋がる配列変異を起こしやすいことが知られており、クロマチンの弛緩はそれを加速させる。その為、本研究の結果から、HITはクロマチン凝縮を促すことでrDNA領域を配列変異から保護している可能性があると考えられた。

核小体外(核質)におけるHITの機能

HITは核小体に特に局在していたものの、核内のその他(核質)にも局在を示していたことからrDNA以外の領域でも機能していることが示唆された。そこで、核質におけるHITのゲノム標的領域およびその機能を明らかにすることを目的とし解析を行った。初めにChIP-seq法によって、ヒト癌細胞株、マウス胚性幹細胞およびマウス精細胞におけるHITの標的領域の探索を行った。ゲノム上の分布を調べたところ、核小体内に位置するゲノム領域以外では、遺伝子コード領域またはその近傍に多く結合していた。より詳細に遺伝子領域周辺における局在を調べた結果、いずれの細胞種においても、特に転写開始点付近によく局在しており、またそれらは高い発現を示す遺伝子であった。次にこれら標的領域におけるHITの機能を明らかにするため、癌細胞株においてHIT強制発現および発現抑制実験を行ったところ、標的遺伝子群に対してHITは発現促進に働くことが分かった。加えて、DNaseI sensitive assayの結果、HITは結合領域のクロマチンの弛緩を促していた。以上より、遺伝子領域においてHITは、rDNAリピート上とは逆に、標的領域のクロマチン弛緩を促し発現上昇に働くことが明らかとなった。

結論 (図)

HITは主にrDNA領域を標的とし、そのクロマチン構造を凝集させrRNAの転写を抑制する働きがあることに加え、核小体の形成にも関わる因子である。

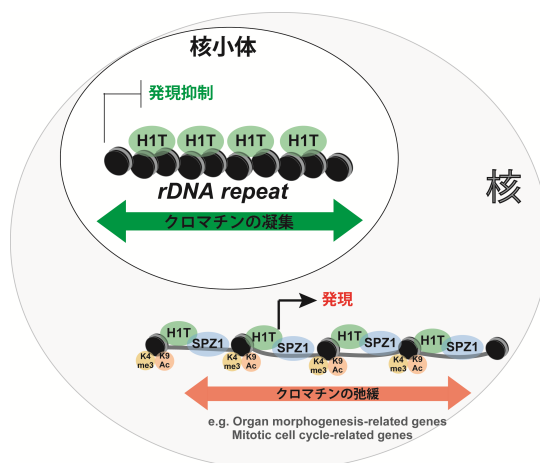


図 まとめ：本研究で明らかとなったHITの機能

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4件)

1. Ruiko Tani, Koji Hayakawa* et al. (*, equally contributed author). Linker histone variant HIT targets rDNA repeats. *Epigenetics*. 2016 Apr; 11(4): 288–302. 査読有
2. Koji Hayakawa et al. Analysis of DNA Methylation by Bisulfite Reaction in Neural Cells as an Example of Orexin Neurons. *Epigenetic Methods in Neuroscience Research*. 2016 Volume 105 of the series Neuromethods p 55-63. 査読無
3. Koji Hayakawa et al. Analysis of Histone Modifications in Neural Cells as an Example of Orexin Neurons. *Epigenetic Methods in Neuroscience Research*. 2016 Volume 105 of the series Neuromethods pp 139-147. 査読無
4. Koji Hayakawa et al. Isolation and manipulation of mouse trophoblast stem cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol*. 2015 Feb 2;32:1E.4.1-32. 査読無

[学会発表](計5件)

1. 早川 晃司 他. 遺伝子領域におけるリンカーヒストンバリエント HIT の標的および機能. **第10回 日本エピジェネティクス研究会年会**. 2016年5月19-20日. 千里ライフサイエンスセンター, 大阪
2. 谷 瑠依子, 早川 晃司 他. リンカーヒストンバリエントHITはrDNA領域を標的とし、rRNAの発現を抑制する. **第108回 日本繁殖生物学会大会**. 2015年9月16-20日. 宮崎大学木花キャンパス, 宮崎
3. Ruiko Tani, Koji Hayakawa et al., Linker histone variant HIT targets rDNA repeats. **The ASCB/IFCB meeting**. 2014年12月

- 6-10 日. フィラデルフィア, アメリカ
4. 谷 瑠依子, **早川 晃司** 他. リンカーヒストンバリエントH1TはrDNA領域のクロマチン構造を凝集させる. **第 87 回日本生化学会大会**. 2014年10月15-18日. 国立京都国際会館, 京都
 5. **早川 晃司** 他. (招待講演) 卵子特異的リンカーヒストンH1fooによる卵子特異的エピゲノム形成. **第 8 回 日本エピジェネティクス研究会年会**. 2014年5月25-27日. 伊藤国際学術研究センター, 東京

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