

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：17102

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2013～2017

課題番号：25116010

研究課題名(和文)細胞分化にともなうクロマチン変動メカニズムの解明

研究課題名(英文)Analysis of Chromatin Dynamics In Cell Differentiation

研究代表者

大川 恭行(Ohkawa, Yasuyuki)

九州大学・生体防御医学研究所・教授

研究者番号：80448430

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 78,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、我々が本領域研究開始当時に同定した新規ヒストンH3遺伝子を中心に細胞分化におけるゲノムワイドな遺伝子発現を制御するクロマチン構造変換機構の解明を目指した。まず、全貌が明らかでなかったヒストン遺伝子の網羅的同定を*in silico*において行い、H2A、H2B、H3について新規ヒストン遺伝子を同定した。新たに同定されたヒストン遺伝子は多くが組織特異的な発現を示した。代表的な解析事例として、骨格筋幹細胞に高発現しているH3mm7が骨格筋再生を転写レベル調整により制御することを報告した。本研究では、計57報以上の論文発表成果につながった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we analyzed chromatin dynamics upon cellular differentiation. Especially, we have focused on the functions of tissue-specific histone H3 variant genes which we identified in 2015 in this project. A representative study published this year reports that H3mm7, a skeletal muscle satellite dominant histone H3 variant, was required for normal skeletal muscle regeneration upon injury. H3mm7 was shown to be involved in the loosening of chromatin structure by forming "mobile" nucleosomes in which the absence of the interaction between H3.3S57 and H4R40 was observed. This project has led to more than 57 published papers based on the genome-wide study of chromatin dynamics.

研究分野：トランスクリプトミクス

キーワード：エピゲノム クロマチン構造 ヒストンバリエント

1. 研究開始当初の背景

生物個体が形成されるためには、異なる形質を発現する様々な細胞への分化が必須である。この細胞分化の過程で、ゲノム上に存在する 2-3 万もの遺伝子から特定遺伝子の発現が選択される。この選択的な遺伝子発現には、DNA のメチル化やヒストン修飾から、クロマチンの凝集と弛緩に至る幅広いクロマチン構造制御(“動的クロマチン”)が関与することが明らかとなってきた。分化における遺伝子選択の破たんは、がんなど疾病の原因ともなりうるが、近年、ヒストンそのものの変異と小児性脳腫瘍との関係が見出されている (Schwartzentruber et al 2012 Nature, Gang et al 2012 Nature Genetics)。この小児性脳腫瘍の原因と考えられる *h3f3a* 遺伝子によりコードされるヒストン H3.3 は、全ヒストン H3 のうちの 5%程度を占めるバリエーションであるが、転写活性化領域に選択的に取り込まれる。この H3.3 バリエーションは、主要な H3.1 ヒストンと比べてわずかに 5 アミノ酸が異なるだけであるが、このわずかな違いこそが機能的に重要であり、遺伝子発現制御の多様性を担っている。

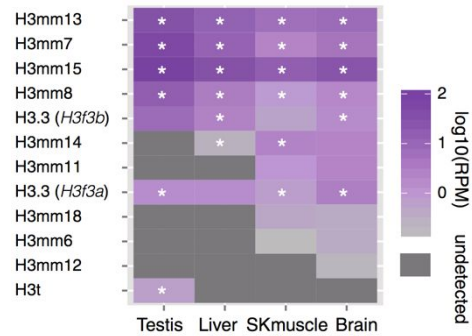
我々は、これまで次世代シーケンサーを用いた ChIP-seq (クロマチン免疫沈降と塩基配列解析)やトランスクリプトーム解析系を確立し、全ゲノムレベルでの転写因子やヒストン修飾の局在を明らかにしてきた。この特にエピゲノム解析技術を用いた共同研究や受託解析では国内屈指の実績を誇ってきた。これらゲノムワイドの手法により、ヒストン H3.3 バリエーションが骨格筋分化特異的に発現する遺伝子座に未分化段階で取り込まれ、分化後の転写活性化の制御に働くことを明らかにした (Harada et al 2012 EMBO J)。この知見は、特定のヒストンバリエーションのクロマチンへの取り込みがヒストン修飾による制御の前段階の“足場”の選択に働き、細胞分化におけるクロマチン変動メカニズムの基盤となることを示唆するものであった。

2. 研究の目的

本研究のきっかけとなったのはヒストン H3 のバリエーションはヒト及びマウスにおいてこれまで 5、6 種類存在することが確認されていたが、我々の先行解析の結果により、さらに多数存在することが明らかにしていたことであった。*in silico* でゲノムにコードされるヒストン様配列を検索した結果、マウスで新たに 14 種類、ヒトで少なくとも 3 種類の H3 バリエーションの存在が示唆された。マウスの 13 種類の H3 バリエーションは mRNA-seq により発現が確認された (図 1) のに加え、そのうちのいくつかについては質量分析によりタンパク質レベルでも検出された。そこで、新たに見つかったマウスヒストンバリエ

ーション 13 種を H3mm6 から H3mm18 と命名した。これら未知のヒストン遺伝子の網羅的同定は研究開始まもなく 2015 年に論文発表を行い (引用文献 20) 更に、国際データベースにおいても同様の名称にて登録を行っている。本研究では、これら未発表の新規バリエーション解析を中心に、細胞分化制御におけるクロマチン変動メカニズムの解明を展開した。

図 1 マウス全ヒストンバリエーションの組織発現分布



新規ヒストンバリエーションは、mRNA-seq により転写産物が検出され、且つ、組織特異的発現パターンを示す。

3. 研究の方法

細胞分化制御におけるクロマチン変動メカニズムの解明を目標として、ヒストン H3 バリエーションを軸にしたクロマチン変動機構の解析を行った。骨格筋分化ならびにマウス成体を用いた骨格筋再生をモデルを中心に、分化前後における各 H3 バリエーションのゲノム領域への取り込み位置を同定し、それらが取り込まれたゲノム領域で形成されるクロマチン構造について、ヒストン修飾、クロマチン弛緩を明らかにした。

4. 研究成果

骨格筋特異的なヒストン H3 である H3mm7 については、徳島大学酵素学研究所竹本龍也教授のグループとの共同研究により解析によりノックアウトマウスを樹立し、H3mm7 の取り込みによるクロマチン構造変化を ATACseq により評価し更に、遺伝子発現との関係を、mRNA-seq により得られるトランスクリプトームデータと比較することで明らかにした。その結果 H3mm7 は取り込み領域において弛緩したクロマチン構造を形成することを明らかにした。更に、ヌクレオソームレベルでの構造解析を胡桃坂班とともに解析を行い、H3mm7 が不安定なヌクレオソーム構造を形成することを明らかにし S57A のアミノ酸置換が特徴的な構造形成に必須であることを明らかにした (引用文献 1)。残り全ての未知ヒストンバリエーションについてノックアウトマウスの樹立を行い、現在も引き続き解析を行っている。不妊の表現型を示した H3t につ

いては近畿大学山縣一夫博士と共同で解析し、発表を行った。以上から、生体内での骨組織形成における未知ヒストンバリエーションの役割を明らかにした。

尚、本研究においては我々が、これまでやってきた次世代シーケンサー(NGS)を用いたエピゲノム解析、トランスクリプトーム解析を通じて、領域内のゲノムワイドな解析の共同研究を大規模に行い様々なクロマチン構造解析を推進することによりヒストンバリエーションにとどまらない包括的な解析研究を行った。胡桃坂班との連携ではオーバーラッピングヌクレオソーム(OLDN)のゲノム上に存在する位置をNGS解析により抽出を行い、転写活性化と相関していることを明らかにした。また、木村班との連携では、H3K27acのゲノム上の分布をChIPseq法により解析し、転写活性化との相関を明らかにした。斎藤班との連携では、当時国内では初となるTotal RNAseqを行い、新規 non-coding RNAであるエレノアの同定につながった。米田班との連携では核膜輸送タンパク質 Crm1、核膜孔を形成するNup98とHox遺伝子の融合タンパク質のゲノム上局在を同定し融合タンパク質による発がん機序の解明に繋がった。河野班とは、弛緩しやすいヌクレオソームに特徴的な核酸配列の抽出を行った(in press)。これら解析に加えて公募班とも多くの共同研究を行い、分子から個体レベルで、発生、分化、そしてその破綻である疾病にわたる様々な局面においてゲノムワイドなクロマチン解析を多角的に行い計71報の論文発表をおこなった。

また、これら大規模な情報解析は九州大学情報基盤センターとの連携によりスーパーコンピュータの大規模な活用により行われた。クロマチン解析データは国際的にも増大の一途とどったが、これらの情報処理技術により、最新のデータを迅速かつ直接的に領域内で行われる研究へフィードバックすることが可能となり、機動的な研究活動に貢献した。

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91件)

【2018年】

1. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration #Harada A(1番目), #Maehara K(1番目), (他14名), *Ohkawa Y. *Nat Commun.* 査読有, 9:1400. 2018
2. Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. Kondo Y, Maehara K(6番目), #Harada A(7番目), (他6名), *Ohkawa Y. *PLoS One.* 査読有, 13:e0191532. 2018

3. The Autism-Related Protein CHD8 Cooperates with C/EBP to Regulate Adipogenesis. Kita Y, (他5名), Ohkawa Y (7番目), (他4名), Nakayama KI. *Cell Rep.* 査読有, 23:1988-2000. 2018
他3報 (Open Biol., Front Cell Dev Biol., Genes Cells.)

【2017年】

4. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. #Ueda J, #Harada A(1番目), Maehara K(5番目), Ohkawa Y (22番目), (他17名), *Yamagata K. *Cell Rep.* 査読有, 18:593-600, 2017.
5. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. Semba Y, Harada A (2番目), Maehara K (3番目), (他9名), *Ohkawa Y. *Nucleic Acid Res.* 査読有, 45(15):8758-8772. 2017.
6. The requirement of Mettl3-promoted MyoD mRNA maintenance in proliferative myoblasts for skeletal muscle differentiation. Kudou K, Harada A(4番目), Maehara K (5番目), (他7名), *Ohkawa Y. *Open Biol.* 査読有, 7(9), 2017.
7. Crystal Structure and Characterization of Novel Human Histone H3 Variants, H3.6, H3.7, and H3.8. Taguchi H, Maehara K (4番目), Harada A (5番目), *Ohkawa Y (22番目), *Kurumizaka H. *Biochemistry.* 査読有, 56(16):2184-2196. 2017
8. Interaction of reactive astrocytes with type I collagen induces astrocytic scar formation through the integrin-N-cadherin pathway after spinal cord injury. Hara M, Ohkawa Y (3番目), (他8名), *Okada S. *Nat Med.* 査読有, 23(7):818-828. 2017.
9. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. Kato D, Maehara K(11番目), Ohkawa Y (12番目), (他14名), *Kurumizaka H. *Science.* 査読有, 356(6334):205-208, 2017.
10. Ser7 of RNAPII-CTD facilitates heterochromatin formation by linking ncRNA to RNAi. *Kajitani T, Ohkawa Y (6番目), (他7名), Murakami Y. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, 114(52):E11208-E11217. 2017
他14報(Am J Pathol., Sci Rep., PLoS One., Cancer Sci., Hum Mol Genet., 他) 全査読あり

【2016年】

11. Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem

- Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3.1/H3.2. Hayashi M, Harada A (2番目), Maehara K (3番目), (他9名), *Ohkawa Y. *J Cell Biochem.* 査読有, 117(3):780-92, 2016.
12. Exploration of nucleosome positioning patterns in transcription factor function. Maehara K, *Ohkawa Y. *Sci Rep.* 査読有, 6:19620, 2016
 13. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. #Kaimori JY, #Maehara K (1番目), Harada A (3番目), Ohkawa Y (16番目), Isaka Y. *Sci Rep.* 査読有, 6:24318. 2016
 14. CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. Katayama Y, *Nishiyama M, Ohkawa Y (6番目), (他5名), *Nakayama KI. *Nature.* 査読有, 2016.
 15. MRG15 is required for pre-mRNA splicing and spermatogenesis. *Iwamori N, (他4名), Ohkawa Y (6番目), Coarfa C, Ono E, Matzuk MM. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, 113(37):E5408-15, 2016.
 16. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. Kujirai T, (他5名), *Kimura H, Ohkawa Y (8番目), Kurumizaka H. *Nucleic Acids Res.* 査読有, 44(13):6127-41, 2016.
 17. Histone chaperone CAF-1 mediates repressive histone modifications to protect preimplantation mouse embryos from endogenous retrotransposons. Hatanaka Y, (他5名), Ohkawa Y (7番目), Tsukada Y, *Ogura A. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, 112(47):14641-6, 2015. **他 12 報** (Epigenetics Chromatin., Nucleic Acids Res., Elife., Sci Rep., Elife., 他) 全査読あり
- 【2015 年】
18. Incorporation of histone H3.1 suppresses the lineage potential of skeletal muscle. Harada A(1番目), Maehara K(2番目), (他4名), *Ohkawa Y. *Nucleic Acids Res.* 査読有, 43(2):775-86, 2015.
 19. Spatial re-organization of myogenic regulatory sequences temporally controls gene expression. Harada A, (他5名), *Ohkawa Y. *Imbalzano AN. *Nucleic Acids Res.* 査読有, 43(4):2008-21, 2015.
 20. Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation. Maehara K, (他5名), *Ohkawa Y. *Epigenetics Chromatin.* 査読有, 8:35, 2015.
 21. agplus: a rapid and flexible tool for aggregation plots. Maehara K, *Ohkawa Y. *Bioinformatics.* 査読有, 31(18):3046-7, 2015.
 22. foxl3 is a germ cell-intrinsic factor involved in sperm-egg fate decision in medaka. Nishimura T, Ohkawa Y (5番目), (他5名), *Tanaka M. *Science.* 査読有, 349(6245):328-31, 2015.
 23. Opposing calcium-dependent signalling pathways control skeletal muscle differentiation by regulating a chromatin remodelling enzyme. Nasipakb B, Ohkawa Y (9番目), (他7名), *Imbalzano AN. *Nat Commun.* 査読有, 6:7441, 2015.
 24. A cluster of noncoding RNAs activates the ESR1 locus during breast cancer adaptation. Tomita S, Maehara K (5番目), Ohkawa Y (6番目), (他4名), *Saitoh N, *Nakao M. *Nat Commun.* 査読有, 6:6966, 2015.
 25. SWI/SNF chromatin-remodeling complexes function in noncoding RNA-dependent assembly of nuclear bodies. Kawaguchi T, Ohkawa Y (4番目), (他3名), *Hirose T. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 査読有, 112(14):4304-9, 2015.
 26. Cdt1-binding protein GRWD1 is a novel histone-binding protein that facilitates MCM loading through its influence on chromatin architecture. Sugimoto N, Ohkawa Y (11番目), (他9名), *Fujita M. *Nucleic Acids Res.* 査読有, 43(12):5898-911, 2015.
 27. MED26 regulates the transcription of snRNA genes through the recruitment of little elongation complex. Takahashi H, (他11名), Ohkawa Y (13番目), (他2名), *Hatakeyama S. *Nat Commun.* 査読有, 6:5941, 2015. **他 10 報** (Nucleic Acids Res., J Immunol., Sci Rep., Stem Cell Reports., 他) 全査読あり
- 【2014 年】
28. Interleukin-10-producing plasmablasts exert regulatory function in autoimmune inflammation. Matsumoto M, Ohkawa Y (5番目), (他8名), *Kurosaki T, *Baba Y. *Immunity.* 査読有, 41(6):1040-51, 2014.
 29. Acute hyperglycemia impairs functional improvement after spinal cord injury in mice and humans. Kobayakawa K, Ohkawa Y (5番目), (他10名), *Okada S. *Sci Transl Med.* 査読有, 6(256):256ra137, 2014.
 30. Regulation of RNA polymerase II activation by histone acetylation in single living cells. *Stasevich TJ, Maehara K(4番目), Ohkawa Y (5番目),

- (他8名), *Kimura H. *Nature*. 査読有, 516(7530):272-5, 2014.
31. Glycolytic genes are targets of the nuclear receptor Ad4BP/SF-1. Baba T,(他14名), Ohkawa Y (16番目), (他2名) *Morohashi K. *Nat Commun*. 査読有, 5:3634, 2014.
 32. Heterochromatin dynamics during the differentiation process revealed by the DNA methylation reporter mouse, MethylRO. Ueda J, Maehara K(2番目), Ohkawa Y (9番目), (他7名), *Yamagata K. *Stem Cell Reports*. 査読有, 2(6):910-24, 2014.
他 15 報(J Biol Chem., PLoS One., Genes Cells., 他) 全査読あり

【2013 年】

33. A co-localization model of paired ChIP-seq data using a large ENCODE data set enables comparison of multiple samples. Maehara K(1番目), Harada A(2番目), (他7名), *Ohkawa Y. Nucleic Acids Res. 査読有, 41(1):54-62, 2013.
34. Human TREX component Thoc5 affects alternative polyadenylation site choice by recruiting mammalian cleavage factor I. *Katahira J, (他4名), Ohkawa Y. Nucleic Acids Res. 査読有, 41(14):7060-7072, 2013.
他 3 報(J Neurochem., Stem Cells., J Biol Chem.) 全査読あり

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Yasuyuki Ohkawa, ChILT-an Immunoprecipitation-free Epigenome Profiling Technology, Single Cell Omics (E3), 国際学会, 20170526-0531, 201705228, Clarion Hotel Sign, Stockholm, Sweden, スウェーデン
2. Yasuyuki Ohkawa, Myogenic Chromatin Structure Is Formed with the Histone H3 Variant H3mm7, Gordon Research Conference, カンファレンス, 20170611-0616, 20170615, "Renaissance Tuscany Il Ciocco Lucca (Barga), Italy Lucca (Barga), Italy Dates", イタリア
3. Yasuyuki Ohkawa, ChILT - an Immunoprecipitation-free Epigenome Profiling Technology., 1st München-Japan Mini Symposium "Chromatin Structure and Function", 国際シンポジウム, 20170904-0905, 20170904, Helmholtz Zentrum münchen, Auditorium
4. Yasuyuki Ohkawa, Myogenic chromatin structure is formed with the novel histone H3 variant., EMBO Workshop Histone Variants, 国際学会,

20170906-0908, 20170907, BioMedical Center (BMC), Germany

5. Yasuyuki Ohkawa, Tissue-specific Chromatin Structures According to Histone H3 Variants, 研究セミナー, 招聘セミナー, 20171017-1020, 20171018, Department of Microbiology Wonkwang University School of Medicine, 韓国
6. Yasuyuki Ohkawa, Histone variants and cell differentiation., Colorado Chromatin Meeting 2016, 国際学会, 2016.08.08-11, 2016.08.08, Colorado State University(COLORADO,USA), USA コロラド州
7. Yasuyuki Ohkawa, The baselines of transcription levels are determined by selective incorporation of histone H3 variants, Transcriptional and Epigenetic Control in Stem Cells (J1), 国際学会, 20170108-0113, 20170108-0113, Resort at Squaw Creek, California, USA
8. Yasuyuki Ohkawa, The Diversity of Mouse Histone H3 Variants, "International Symposium on Chromatin Structure, Dynamics, and Function", 国際シンポジウム, 2015.8.23-26, 2015.8.23, Awaji Yumebutai International Conference Center, 兵庫県(淡路)
10. Yasuyuki Ohkawa, Diversity of histone H3 variants on mouse genome, ENBO Workshop Histone variants, 国際学会, 2014.6.2-4, 2014.6.2-4, IGBMC in Strasbourg, France
11. Yasuyuki Ohkawa, Incorporation of Histone H3 Variants Dictates the Lineage Potential of Skeletal Muscle., Transcriptional and Epigenetic Influences on Stem Cell States (C9), 国際学会, 2015.3.23-28, , Sheraton Steamboat Resort, USA
12. Yasuyuki Ohkawa, The diversity of mouse histone H3 variants., Epigenomics (Z2), 国際学会, 2015.3.29-4.3., , Keystone Resort, USA

〔図書〕(計 5 件)

1. 大川 恭行, コアヒストンとしてのH2A. *Surgery Frontier*, 2015 年 6 月号, Vol.22No.2: 56-58, 査読無
2. 上田潤, 前原一満, 大川恭行, 山縣一夫, DNA メチル化レポーターマウス「メチロー」を用いたメチル化 DNA の動態解析法.

実験医学, 2015年2月号, Vol.33

No.3 : 481-489, 査読無

3. 大川 恭行, 原田哲仁, ヒストンバリアントによるエピゲノム制御. **実験医学** 2014年8月号, Vol.32 No.13:2064-2069, 査読無
4. 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** 2013年8月号, Vol.31 No.13: 2083-2088, 査読無
5. 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** 2013年3月号, Vol.31 No.4: 577-582, 査読無

〔産業財産権〕

【知的財産】

出願状況(計3件)

1. 名称: DNA 結合タンパク質の結合領域の近傍に所望の DNA 断片を挿入する方法
発明者: 大川恭行, 原田哲仁, 胡桃坂仁志, 木村宏, 半田哲也, 佐藤優子, 林陽子
権利者: 国立大学法人 九州大学
種類: 特許権
番号: 特願 2016-167967
出願年月日: 2016-08-30
国内外の別: 国内
2. 名称: 標的遺伝子の塩基配列を決定する方法
発明者: 大川恭行, 前原一満, 木村宏, 佐藤優子
権利者: 国立大学法人 九州大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2017/008320
出願年月日: 2017-03-02
国内外の別: 国外
3. 名称: DNA 結合タンパク質の結合領域の近傍に所望の DNA 断片を挿入する方法
発明者: 大川恭行, 原田哲仁, 胡桃坂仁志, 木村宏, 半田哲也, 佐藤優子, 林陽子
権利者: 国立大学法人 九州大学
種類: 特許権
番号: PCT/JP2017/019309
出願年月日: 2017-05-24
国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

名称:
発明者:

権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<http://tx.bioreg.kyushu-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大川 恭行 (Ohkawa Yasuyuki)

研究者番号: 80448430