

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18457

研究課題名(和文) 骨格筋分化における新規ヒストンH3バリエーションH3mm7の遺伝子選択機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of novel histone H3 variant H3mm7 in skeletal muscle differentiation

研究代表者

原田 哲仁 (HARADA, AKIHITO)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：60596823

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：骨格筋分化では、ヒストンH3.3が分化前から分化特異的遺伝子を“マーキング”することで分化後の選択的な遺伝子発現をもたらす。H3mm7は、骨格筋で発現が高いことが明らかとなっているがその機能は不明である。そこで、本研究では、H3mm7の機能解析を行った。培養細胞を用いた解析から、H3mm7が遺伝子に取り込まれると転写規定レベルが変化することが明らかとなった。また、H3mm7を含むヌクレオソームの構造は、H3.3ヌクレオソームに比べ不安定であった。これらのことから、H3mm7はゲノム中に取り込まれることでヌクレオソームを不安定化し、遺伝子発現を促進していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：The histone H3 variant H3.3 marks skeletal muscle specific genes in the undifferentiated state to provide selective gene expression during differentiation. Although some of the newly discovered histone variants have been shown to be highly expressed in skeletal muscle, their functions are still unknown. In this study, we performed functional analysis on one of these variants, H3mm7, in skeletal muscle. Using cultured cells, it was revealed that a rate change in gene expression occurs when H3mm7 is incorporated into the gene. In addition, the structure of the nucleosome containing H3mm7 was found to be less stable than the H3.3 nucleosome. These results together suggest that H3mm7 facilitates the expression of skeletal muscle genes by destabilizing nucleosomes at these genes to promote skeletal muscle differentiation.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：ヒストンバリエーション 骨格筋分化 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

個体が様々な形質を獲得してゆくためには多様な細胞への分化が必須であるが、この過程にはゲノム上に存在する2-3万もの遺伝子から特定の遺伝子が選択される必要がある。これまで、クロマチンやエピジェネティクス研究の進展に伴い、細胞分化における特徴的な遺伝子発現や分化にかかわる遺伝子は、DNAのメチル化、クロマチン構造変換、ヒストン修飾に至るまで詳細に解析されてきたものの、すべて個々の因子についての解析である。よって、多分化能を有する幹細胞から分化に必要な一群の遺伝子を選択するという分化を理解する上でもっとも基本的な疑問に対する答えは未だ見出されていない。

2. 研究の目的

骨格筋分化では、ヒストン H3 バリエーションの一つであるヒストン H3.3 が、分化前から分化特異的な遺伝子を“マーキング”することで分化後の選択的な遺伝子発現をもたらす。つまり、ヒストンの選択的な取り込みは最も初期の遺伝子選択機構であると考えられる。申請者は、最近の研究で、マウスゲノムにおいて、未知のヒストン H3 バリエーション遺伝子を14種同定した。更に、これら新規 H3 バリエーション遺伝子のうち、H3mm7を含む複数のヒストンバリエーションが H3.3 と同様に選択的な遺伝子発現に関与することを明らかにした(論文投稿中)。そこで本研究では、骨格筋組織で強く発現していた H3mm7 の骨格筋分化における機能解析を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

H3mm7 の骨格筋分化における機能を解析するために、骨格筋芽細胞 C2C12 で H3mm7 遺伝子座を欠損させた細胞を作製し骨格筋分化に対する影響を mRNA-seq により評価する。H3mm7 の欠損が確認されている線維芽細胞に H3mm7 を発現させ、MyoD の強制発現による骨格筋前駆細胞へのダイレクトリプログラミングの系を用いる。ChIP-seq により、H3mm7 のゲノム上での分布と H3mm7 取り込み依存的なヒストン修飾状態を、骨格筋前駆細胞へと形質転換される段階を経時的に解析する。これにより、H3mm7 が、いつ、どの領域で骨格筋分化における遺伝子選択に関わるのか明らかにする。H3mm7 は、H3.3 と2アミノ酸のみが異なる。H3mm7 のアミノ酸置換体を用いて、これら2つの残基の機能を明らかにする。以上を計画していた。

4. 研究成果

H3mm7 遺伝子をノックアウト(KO)した骨格筋芽細胞 C2C12 を CRISPR-Cas9 システムを用いて作成した。mRNA-seq により骨格筋分化能を評価したところ、H3mm7 KO 細胞は野生型に比べ骨格筋分化が遅延していた。この分化遅延は、H3mm7 KO 細胞に GFP を融合させた H3mm7 を強制発現させることで回復していた。さらに、転写レベルでの変化を評価するために mRNA-seq を行った結果、骨格筋関連遺伝子に

限らず転写レベルが変化している遺伝子群があることが明らかとなった。次に、H3mm7 遺伝子を持たない NIH3T3 線維芽細胞に MyoD 依存的な骨格筋分化能を評価する系を用いて、H3mm7 がグローバルに転写の規定レベルを変化させるのか、骨格筋遺伝子特異的に転写レベルを変化させるのか評価した。その結果、H3mm7 を強制発現させた NIH3T3 は転写の規定レベルが変化しており、MyoD 依存的な骨格筋形質転換により野生型に比べ骨格筋分化が促進された。また、ChIP-seq 解析により、この転写規定レベルの変化が H3mm7 の取り込み依存であることを確認した。さらに、生化学的解析の結果、H3mm7 を含むヌクレオソームは H3mm7 のアミノ酸配列と異なる2つのアミノ酸を持つ H3.3 ヌクレオソームに比べて不安定であることが示された。また、結晶構造解析から、H3.3 のアミノ酸配列と異なる2つの H3mm7 に固有のアミノ酸のうち A57 が、ヌクレオソームにおける不安定性の要因となることが示唆された。これを確かめるために H3.3 に T32 もしくは S57 変異を加え NIH3T3 に強制発現させ、骨格筋分化能を評価した。その結果、H3.3 A57 を発現させた細胞で骨格筋分化が促進された。加えて、マウス組織における遺伝子発現解析の結果、H3mm7 は骨格筋幹細胞で発現が高かった。これらのことから、H3mm7 は、ゲノムに取り込まれることで、遺伝子の転写 rate を変化させ、特に分化時に骨格筋遺伝子に取り込まれることでヌクレオソームを不安定化し、遺伝子発現を促進し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8件)

1. Yokota K, Kobayakawa K, Saito T, Hara M, Kijima K, Ohkawa Y, Harada A, Okazaki K, Ishihara K, Yoshida S, Kudo A, Iwamoto Y, Okada S. Periostin Promotes Scar Formation through the Interaction between Pericytes and Infiltrating Monocytes/Macrophages after Spinal Cord Injury. *Am J Pathol*. 2017 Mar;187(3):639-653.
2. Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, Makino Y, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Okada Y, Kimura H, Ohkawa

- Y, Kurumizaka H, Yamagata K. Testis-Specific Histone Variant H3t Gene Is Essential for Entry into Spermatogenesis. *Cell Rep.* 2017 Jan 17;18(3):593-600.
3. Kuniyoshi Y, Maehara K, Iwasaki T, Hayashi M, Semba Y, Fujita M, Sato Y, Kimura H, Harada A, Ohkawa Y. Identification of Immunoglobulin Gene Sequences from a Small Read Number of mRNA-Seq Using Hybridomas. *PLoS One.* 2016 Oct 27;11(10):e0165473.
 4. Kaimori JY, Maehara K, Hayashi-Takanaka Y, Harada A, Fukuda M, Yamamoto S, Ichimaru N, Umehara T, Yokoyama S, Matsuda R, Ikura T, Nagao K, Obuse C, Nozaki N, Takahara S, Takao T, Ohkawa Y, Kimura H, Isaka Y. Histone H4 lysine 20 acetylation is associated with gene repression in human cells. *Sci Rep.* 2016 Apr 11;6:24318.
 5. Hayashi M, Maehara K, Harada A, Semba Y, Kudo K, Takahashi H, Oki S, Meno C, Ichianagi K, Akashi K, Ohkawa Y. Chd5 Regulates MuERV-L/MERVL Expression in Mouse Embryonic Stem Cells Via H3K27me3 Modification and Histone H3.1/H3.2. *J Cell Biochem* 2016 Mar;117(3):780-92.
 6. Urahama T, Harada A, Maehara K, Horikoshi N, Sato K, Sato Y, Shiraiishi K, Sugino N, Osakabe A, Tachiwana H, Kagawa W, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Histone H3.5 forms an unstable nucleosome and accumulates around transcription start sites in human testis. *Epigenetics & Chromatin.* 2016 Jan 15;9:2.
 7. Hayashi-Takanaka Y, Maehara K, Harada A, Umehara T, Yokoyama S, Obuse C, Ohkawa Y, Nozaki N, Kimura H. Distribution of histone H4 modifications as revealed by a panel of specific monoclonal antibodies. *Chromosome Res.* 2015 Dec;23(4):753-66.
 8. Maehara K, Harada A, Sato Y, Matsumoto M, Nakayama K, Kimura H, Ohkawa Y. Tissue-specific expression of histone H3 variants diversified after species separation. *Epigenetics & Chromatin* 2015 Sep 17;8:35.
- 〔学会発表〕(計7件)
1. 原田 哲仁, 岩崎 健, 横田 和也, 岡田 誠司, 大川 恭行
急性期の筋萎縮過程における遺伝子発現変動解析
日本農芸化学会 2017 年度大会、2017 年 3 月 18 日、京都女子大学、京都府・京都市
 2. 原田 哲仁
Functional switching of histone H3 variants in myogenesis
第 4 回ヒストンバリエーション研究会、2016 年 2 月 11 日、東北大学青葉山キャンパス 青葉山コモンズ、宮城県・仙台市
 3. 原田 哲仁, 岩崎 健, 横田 和也, 岡田 誠司, 大川 恭行
ヒストン H3 バリエーションの発現変動は筋萎縮過程の初期イベントである
第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 11 月 30 日、パシフィコ横浜、神奈川県・横浜市
 4. 原田 哲仁
骨格筋分化におけるクロマチン構造解析
-トランスクリプトミクスで理解する骨格筋形成-
日本農芸化学会中四国支部 支部創立 15 周年記念 第 24 回若手シンポジウム、2016 年 07 月 28 日、水産大学校 共同研究棟 4 階多目的ホール、山口県・下関市
 5. 原田 哲仁, 前原 一満, 田口 裕之, 佐藤 優子, 謝 炎, 木村 宏, 胡桃坂 仁志, 大川 恭行
新規ヒストン H3 バリエーション H3mm7 は骨格筋分化能を制御する
日本農芸化学会 2016 年度大会、2016 年 3 月 29 日、札幌コンベンションセンター、北海道・札幌市
 6. 原田 哲仁, 前原 一満, 田口 裕之, 佐藤 優子, 謝 炎, 木村 宏, 胡桃坂 仁志, 大川 恭行
新規ヒストン H3 バリエーション H3mm7 は骨格筋分化能を制御する
BMB2010(第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本生化学会大会合同大会)、2015 年 12 月 1 日、神戸ポートアイランド、兵庫県・神戸市
 7. 原田 哲仁, 前原 一満, 大川 恭行
ヒストンバリエーションが制御する骨格筋 Y,

分化能
NGS 現場の会、2015 年 7 月 1 日、つくば
国際会議場、茨城県・つくば市

〔図書〕(計 1 件)

1. 原田 哲仁. メディカルレビュー社
ヒストンバリエーションによるヒトゲノム
制御. 2015 年 6 月号 Vol. 22No. 2 : 59-62

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

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、国立大学法
人東京工業大学
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

取得状況 (計 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

原田哲仁 (HARADA AKIHITO)
九州大学・生体防御医学研究所・助教
研究者番号 : 60596823

(2) 研究分担者

()
研究者番号 :

(3) 連携研究者

()
研究者番号 :

(4) 研究協力者

()