

機関番号：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21770247

研究課題名（和文）アセチル化ヒストン依存的に細胞運命維持を行う仕組みの解析

研究課題名（英文）Analyses of the mechanism that maintains cell fates in an acetylated histone-dependent manner

研究代表者

柴田 幸政 (Shibata Yukimasa)

独立行政法人理化学研究所・細胞運命研究チーム・研究員

研究者番号：80314053

研究成果の概要（和文）：

細胞運命の維持におけるヒストンアセチル化の関与はわかっていなかったが、最近私は *C. elegans* アセチル化ヒストン結合蛋白質 BET-1 が細胞運命の維持に必要である事を見いだした。本研究では、BET-1 がデターミナントを介して働いており、その発現調節に、BET-1 経路で働くヒストンバリエント H2A. z と *bet-1* 変異体の表現型を抑制する、ヒストン脱メチル化酵素 UTX-1 が関与する事を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

The requirement of histone acetylation in the maintenance of cell fates had not been clear. However, recently, I showed that *C. elegans* acetylate histone binding protein, BET-1, is required for the maintenance of cell fates. In this research project, I found that BET-1 functions through developmental determinants. In addition, their expressions appear to be regulated by histone variant, H2A. z, and histone demethylase, UTX-1.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：クロマチン、アセチル化ヒストン、運命の維持、*C. elegans*

1. 研究開始当初の背景

正常な発生及び恒常性において、細胞運命の維持は、全ての種類の細胞で必要である。例えば、細胞の運命を維持する事で、癌化が抑制されている。細胞運命の維持には、メチル化ヒストンを介した仕組みがよく知られていたが、ヒストンアセチル化の関与は

わかっていなかった。しかし、最近私は *C. elegans* ヒストンアセチル化酵素 MYS-1, MYS-2 とアセチル化ヒストン結合蛋白質 BET-1 が細胞運命の維持に必要である事を見いだした。これは、アセチル化ヒストン依存的に細胞運命の維持を行う初めての例である。これらの、分子はショウジョウバエ、ヒ

ト等他の生き物でも保存されており、同様の仕組みが働いている可能性は非常に高い。そのため、BET-1 依存的な分子機構を調べる事で、アセチル化ヒストン依存的に細胞運命の維持を行う分子機構を明らかにする、先駆的なモデル系として確立する事ができるであろう。

2. 研究の目的

本研究では、この BET-1, MYS-1, MYS-2 の作用機序を調べる事で、アセチル化ヒストン依存的にクロマチン状態及び遺伝子の転写状態を安定化する仕組みを明らかにする事を目的とする。具体的にはアセチル化ヒストン結合蛋白質 BET-1 のターゲット領域及びターゲット遺伝子を同定する。これにより、将来ターゲット領域の核内での挙動を直接観察する事ができる様になる。

また、ターゲット領域のクロマチン状態が BET-1 依存的にどう変化するのかを明らかにする。そのためにまず、BET-1 と相互作用する遺伝子を単離し、その解析を行う。

3. 研究の方法

BET-1 ターゲットの同定には当初 ChIP assay を試みた。しかし、よい BET-1 抗体がない事、BET-1, ヒストン、DNA の三つをクロするリンクさせる事が困難な事等が、原因でうまく行かなかった。そこで、DamID という手法をとる事にした。DamID では BET-1 と DNA メチル化酵素の融合蛋白質を使い、BET-1 結合領域周辺の DNA をメチル化させ、そのメチル化を検出する事で BET-1 結合領域を明らかにする。検出には genomic tiling array を用い、genome-wide に BET-1 のターゲットを同定する。

それと同時に、*bet-1* 変異体の表現型から、特定の細胞分化に必要な不可欠なデターミナントがターゲットであると推測されたので、その可能性も検討する。*bet-1* 変異体では機械受容神経 AVM が過剰に形成される。(この際、複数の AVM マーカーの発現を確認している。) さらに、*bet-1* が AVM のデターミナント *mec-3* を介して働く事も既に明らかにしている。

bet-1 変異体では AVM 以外に、生殖巣の形態形成に必要な細胞 DTC も過剰に形成される。そこで、DTC の場合もデターミナントを介して働く事を調べる。DTC のデターミナントは知られていないので、まずそれを明らかにした上で、*bet-1* 変異体における DTC デターミナントの発現を観察する。

また、ターゲット領域のクロマチン状態の変化に必要な遺伝子を同定するために、まず、BET-1 と遺伝学的に相互作用する遺伝子を RNAi スクリーニングで単離して、

それを解析する。具体的には、野生型で遺伝子を抑制した場合には、*bet-1* 変異体と同じ表現型を示すものと、*bet-1* 変異体で遺伝子を抑制したときに *bet-1* 変異体の表現型を抑制するものを単離する。

このうち、*bet-1* 遺伝子と同じ遺伝学的経路で働く遺伝子を以下の方法で同定する。RNAi で *bet-1* 変異体と同じ表現型を示す遺伝子のうち、弱い *bet-1 allele* の表現型を増強するが、*bet-1 null allele* の表現型には影響がないものを検索する事で、*bet-1* 経路で働く遺伝子を同定する事ができる。

また、候補遺伝子がデターミナントを介して働く事を確認するために、候補遺伝子の RNAi によってデターミナントの発現が変化する事を確認する。野生型で遺伝子を抑制した場合には、*bet-1* 変異体と同じ表現型を示すものの場合には、デターミナントの異所発現が予想される。これに対し、*bet-1* 変異体で遺伝子を抑制したときに *bet-1* 変異体の表現型を抑制するものについては、*bet-1* 変異体で見られるデターミナントの異所発現を抑制すると予想される。

4. 研究成果

BET-1 ターゲットの同定のために、現在、DamID に必要な株を作った。この株は、AVM の祖先細胞 Q 細胞を含む十数個の細胞で BET-1::Dam 融合蛋白質を発現する。この株で BET-1::Dam を発現する外来遺伝子をは、*bet-1* 変異体の過剰な AVM の形成をレスキューするので、本来の *bet-1* ターゲットと結合しているであろうと考えられる。この株から得られた、ゲノム DNA のうち、メチル化している部分を PCR で増幅し、genomic tiling array に結合させ、その結合部位を明らかにしている。

それと同時に、デターミナントを介して働く事を明らかにするために、DTC の系で解析を行った。まず、DTC のデターミナントが *ceh-22* である事を確認した。具体的には、野生株では DTC で *ceh-22* の強い発現が見られる事、*ceh-22* の異所発現で DTC の過剰形成が起こる事を確認した。次に、*bet-1* 変異体で *ceh-22* の過剰発現が起こっている事も確認している。これらの結果は *bet-1* が *ceh-22* を介して働いている事を強く示唆している。これを確認するために、*bet-1* 変異体での過剰な DTC の形成が *ceh-22* RNAi によって、抑制される事を確認する。以上は、*bet-1* が複数の細胞種において、デターミナントを介して働いている事を強く示唆している。

RNAi スクリーニングによって、*bet-1* 変異体と同じ表現型を示す遺伝子として *ssl-1*, *ekl-4* 等が得られた。*ekl-4* RNAi は

弱い *bet-1* allele の表現型を増強するが、*bet-1* null allele の表現型には影響がない事から、*bet-1* と同じ遺伝学的経路で働く事がわかった。*ssl-1*, *ekl-4* はヒストンバリエント H2A.z/HTZ-1 のゲノム上の配置に必要な事が知られている。そのため、この *htz-1* 遺伝子についても詳しい解析を行ったところ、*ekl-4* 遺伝子と同様に、*bet-1* と同じ遺伝学的経路で働いている事がわかった。

HTZ-1 のゲノム上の配置に付いては既に報告があり、発生と関連する遺伝子上に多く存在する事がわかっている。この事は、BET-1 がデターミナントを介して働いている事と矛盾しない。また、HTZ-1 は RNA ポリメラーゼ II とにた局在を示すが、転写活性との相関はあまりない。この状態は、RNA ポリメラーゼ II がプロモーター上に有りながら活性化はされていないという状態であると考えられている。これは、転写抑制状態の一種である Poised と呼ばれる状態であろうと考えられている。この事から、*bet-1* は poised の状態を維持する事で、デターミナントの異所発現を抑制し、DTC や AVM 等の過剰形成を抑制しているのであろうと考えられる。

このほか、*bet-1* 変異体の複数の表現型を抑制するものとして、ヒストン脱メチル化酵素 UTX-1 を単離している。UTX-1 は転写抑制に必要な H3K27 のメチル化を取り除く働きを持つ。この、UTX-1 は DTC の表現型を抑制すると共に、DTC のデターミナントである *ceh-22* の *bet-1* 変異体での異所発現も抑制する事を明らかにしている。この事から、UTX-1 も BET-1 と同じ様にデターミナントを介して働いていると考えられる。

bet-1 変異体では、細胞運命の維持が異常になった結果、様々な細胞種の過剰形成が起こる。もし、UTX-1 が DTC 以外の細胞の過剰形成も抑制するならば、BET-1 と UTX-1 の関係は複数の種類の細胞種で保たれている事になる。*bet-1* 変異体の表現型の一つに尾部の seam cell という表皮細胞の過剰形成があり、*utx-1RNAi* はこの表現型も抑制する。この事から、UTX-1 と BET-1 は複数の種類の細胞で逆の働きをしている事が明らかとなった。

これらの事から、現在、BET-1 ターゲット領域は最初 H3K27 のメチル化によって抑制されているが、その抑制が UTX-1 によって解除されると、BET-1、H2A.z 依存的抑制に切り替わり、Poised の状態を維持する事で抑制の維持が行われるというモデルを考えている。*bet-1* 変異体では、UTX-1 のよってメチル化依存的な抑制が解除されると、その後は抑制を維持する事ができず、デターミナントの異所発現が起こり、細胞の運命が変わってしまう。しかし、*bet-1* と *utx-1* の両方が破壊された場合には、メチル化依存的な抑

制が解除されずに、そのまま残るために、BET-1 依存的な抑制が行われていなくても、デターミナント遺伝子の抑制を維持する事ができると考えている。

今回の結果から、BET-1 のターゲットがデターミナントであり、その抑制の維持に必要であろう事が強く示唆された。また、そのクロマチン状態がどのように変化するかについて、遺伝学的な解析から詳細なモデルをたてる事ができる様になった。これにより、アセチル化依存的に細胞運命の維持を行う分子機構の一端を理解する事ができる様になった。

今回の結果をうけて、将来は、デターミナント遺伝子座の、*in vivo* でのヒストン修飾の状態を直接観察し、その生体内での変化を明らかにする事ができる様になった。さらに、BET-1 ターゲット遺伝子座を同定した事で、その核内での位置や、凝集の度合い等も経時的に観察できる様になった。これにより、アセチル化依存的な機構が染色体の立体構造にどの様な影響を与えうるかも、調べる事ができる様になった。この様に、今回の結果は、アセチル化依存的な機構を研究する上で、非常に重要な基礎を築く結果となった。

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1件)

柴田幸政, 竹下久子, 笹川典子, 澤齊, Double bromodomain protein BET-1 and MYST HATs establish and maintain stable cell fates in *C. elegans*, *Development*, v.137, p.1045~1053, 2010、査読有り

[学会発表] (計3件)

柴田幸政, 澤齊 The histone acetylation, methylation, H2A.z, and a linker histone H1 are involved in the maintenance of cell fates in *C. elegans*, 4th East Asia *C. elegans* Meeting, 7月11日, 2010年 東京 国立オリンピック記念青少年総合センター

柴田幸政, 澤齊, ヒストンアセチル化、メチル化及び H1、H2A.z は *C. elegans* の細胞運命の維持に関与する, 第43回日本発生物学会大会. 6月20日, 2010, 京都京都大学

芝蘭会館

柴田幸政、細胞運命の維持と高次クロマチン
構造制御機構の関わりについて、発生秋期シ
ンポジウム 11 月 28 日 2009 年 三島, 東レ
総合研修センター

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 幸政 (Shibata Yukimasa)

独立行政法人理化学研究所・細胞運命研究チ
ーム・研究員

研究者番号 : 80314053