

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18479

研究課題名(和文)新規ヒストンバリエーション群の機能解析

研究課題名(英文)Analysis of biological functions of novel histone variants

研究代表者

前原 一満 (Maehara, Kazumitsu)

九州大学・生体防御医学研究所・助教

研究者番号：90726431

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)：本研究計画は、新規ヒストンバリエーションを軸にしたクロマチン動態の解析によって、細胞分化にともなう遺伝子選択機能の解明を目的とした。2015年にコンピュータを用いたヒストン様遺伝子の探索法を開発し、新規14種のマウス、およびヒトのヒストン亜種(バリエーション)遺伝子を報告していたが、これらの極めて配列の近いヒストンバリエーション群がもたらす分子メカニズムは不明のままであった。そのなかで、マウスにおける新規H3バリエーションであるH3mm7が、骨格筋組織の正常な再生に必要であることを示し、論文報告を行った。また、これ以外のヒト新規ヒストンバリエーションについては、共同研究の成果(論文発表3報)を得た。

研究成果の概要(英文)：This project aimed to recognize the function of the novel histone variants in cell differentiation. In the mouse genome, we previously identified fourteen hitherto unknown H3 genes of which thirteen are analogous to H3.3, and reported that some of these genes were expressed in skeletal muscle. We demonstrated that one such histone H3 variant H3mm7 is preferentially expressed in quiescent satellite cells and that it is essential for myogenesis. Further chromatin analysis unveiled that H3mm7 was incorporated into the promoter regions of active gene loci including myogenic genes and that it was required for open chromatin structure to facilitate transcription. These results were published as well as three reports on human histone variants in our joint research projects.

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 エピゲノム制御 ヒストンコード クロマチン

1. 研究開始当初の背景

申請者は、共同研究において、骨格筋分化に伴う遺伝子選択においては、ヒストンバリエーション H3.1/H3.3 の遺伝子プロモーターへの選択的取り込みが起点となり、その後の骨格筋分化に影響を与えることを明らかにしてきた。当初はヒト・マウス間で保存されたバリエーションである H3.3 および H3.1 を主な研究対象としていたが、ヒトゲノムプロジェクトが完了した現在においても、H3.X や H3.Y、H3.5、H3T などヒストンバリエーション同定の報告が相次いでいた。しかし、それらマイナーなヒストンバリエーションから構成されるヌクレオソームが果たす生体内での固有の機能や進化的な存在意義について、多くは解析が進んでいなかった。その理由としては、ヒストンバリエーションの発現が canonical なヒストンに対して極めて微量であること、また DNA 配列が極めて類似しており、遺伝子間であっても塩基配列レベルで 98%以上の保存性があるために、配列の特異性に依拠する生化学や細胞工学的アプローチでは、それらの分別が困難であったためである。

そこで申請者は、98%以上の保存性があるながらもわずかに違う遺伝子を全ゲノム配列を用いて網羅的に同定するソフトウェアを開発した (in silico hybridization 法)。本手法では、ヒストンがもつ 8 アミノ酸部分をコードする DNA 配列をゲノム上で網羅的に検索し、更に、その領域周辺でヒストン様配列を探索検証するというアプローチを行った。結果、多くの生物種で未報告のヒストンバリエーション遺伝子が多数存在することが明らかとなった (図 1)。

とりわけ、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。また、発見したバリエーションの多くは種特異的であり、H3 バリエーションの分子進化と種固有の形質獲得との関係が示唆された。マウスの 13 種類の H3 バリエーションは

mRNA の 3'-UTR を選択的に取得する 3'-seq、および公開された組織別 mRNA-seq データの解析により発現が確認されたことに加え、そのうちのいくつかについては質量分析や特異的抗体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~H3mm18 と命名した。全バリエーション遺伝子について、その GFP 融合タンパク質をテトラサイクリンにより発現誘導可能な株を作成し、ChIP-seq、mRNA-seq、FRAP 解析による網羅的解析を行った。結果、一部バリエーションの骨格筋分化前の取り込みが分化後の遺伝子発現パターンを変容させることを発見した。しかし、これら新規バリエーション群の取り込みによって、遺伝子発現パターンに影響を与える分子メカニズムは不明のままであった。

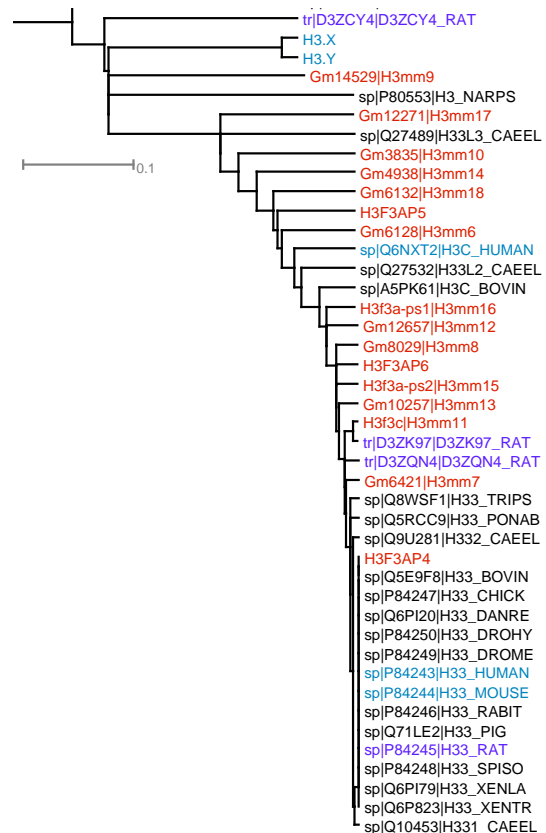


図 1: 新規バリエーションを含むヒストン H3 の分子進化系統樹 (H3.3 部分のみ抜粋)
未知の H3.3 様ヒストンバリエーションが、げっ歯類でとくに多く発見された (H3mm および RAT の配列)

2. 研究の目的

本研究計画では、新規ヒストンバリエーションを軸にしたクロマチン動態の解析によって、細胞分化にともなう遺伝子選択機能の解明を目的とする。これら新規バリエーションの分子機能解析を中心に、細胞分化における遺伝子選択機構の解明を行う。

3. 研究の方法

骨格筋分化をモデルとし、分化前後において、新規 H3 バリエーションの取り込まれたゲノム領域で特徴的に形成されるクロマチン構造について、ヒストン修飾、クロマチン弛緩およびクロマチン間相互作用を解析する。また、所属研究室の既存のデータ、および、公共データベースにて公開されているデータセットを用いた比較解析も行う。特定の H3 バリエーションの取り込みによるクロマチン構造変化と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する。

4. 研究成果

平成 28 年度は、ヒストンの新規バリエーションが果たす固有の機能を中心にして共同研究の成果を発表してきた。ヒストンバリエーションの選択性については、精巣特異的ヒストンバリエーション H3t (業績 9) および骨格筋特異的ヒストンバリエーション (H3mm7) に着目し解析を進めた。ヒストン修飾の面からは、新規ヒストン修飾を発見し論文報告した (業績 12)。一方、ヒストンバリエーションは種固有のものが多く、各動物種の解析が欠かせない。そこで、ヒト固有のバリエーションと考えられる H3.Y および新規の H3.6, H3.7, H3.8 について、これらを含むヌクレオソーム構造の安定性を評価し、ChIP-seq データの解析によってゲノム上の特徴的な局在のパターンを明らかとし、平成 28 年から 29 年度にかけて論文報告を行ってきた (業績 6, 11)。

平成 29 年度は、マウスにおける新規 H3 バ

リエーションのひとつである H3mm7 が、骨格筋組織の正常な再生に必要であることを示し、論文報告を行った (図 2, 業績 1)。解析結果から、H3mm7 を含むヌクレオソームが、弛緩したクロマチン構造を形成しやすいことが示された。

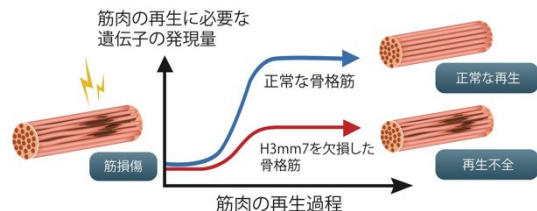


図 2: 骨格筋の再生に必要な遺伝子の発現を促進するヒストン H3mm7 の概念図

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 13 件)

†: 共同筆頭著者

- †Harada A, †Maehara K, Ono Y, Taguchi H, Yoshioka K, Kitajima Y, Xie Y, Sato Y, Iwasaki T, Nogami J, Okada S, Komatsu T, Semba Y, Takemoto T, Kimura H, Kurumizaka H, Ohkawa Y. Histone H3.3 sub-variant H3mm7 is required for normal skeletal muscle regeneration. *Nat Commun.* 2018 Apr 11;9(1):1400. 査読有.
- Takizawa Y, Tanaka H, Machida S, Koyama M, Maehara K, Ohkawa Y, Wade P. A, Wolf M, Kurumizaka H. Cryo-EM structure of the nucleosome containing the ALB1 enhancer DNA sequence. *Open Biol.* 2018 Mar;8(3).pii:170255. 査読有.
- Kondo Y, Higa S, Iwasaki T, Matsumoto T, Maehara K, Harada A, Baba Y, Fujita M, Ohkawa Y. Sensitive detection of fluorescence in western blotting by merging images. *PLoS One.* 2018 Jan 19;13(1):e0191532. 査読有.

4. Kudou K, Komatsu T, Nogami J, [Maehara K](#), Harada A, Saeki H, Oki E, Maehara Y, Ohkawa Y. The requirement of Mett13-promoted MyoD mRNA maintenance in proliferative myoblasts for skeletal muscle differentiation. *Open Biol.* 2017 Sep;7(9). 査読有.
5. Semba Y, Harada A, [Maehara K](#), Oki S; Meno C, Ueda J, Yamagata K, Suzuki A, Onimaru, M, Nogami J, Okada S, Akashi K, Ohkawa Y. Chd2 regulates chromatin for proper gene expression toward differentiation in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2017 Sep 6;45(15):8758-8772. 査読有.
6. Taguchi H, Xie Y, Horikoshi N, [Maehara K](#), Harada A, Nogami J, Sato K, Arimura Y, Osakabe A, Kujirai T, Iwasaki T, Semba Y, Tachibana T, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Crystal Structure and Characterization of Novel Human Histone H3 Variants, H3.6, H3.7, and H3.8. *Biochemistry.* 2017 Apr 25;56(16):2184-2196. 査読有.
7. Nakamura T, Murakami K, Tada H, Uehara Y, Nogami J, [Maehara K](#), Ohkawa Y, Saitoh H, Nishitani H, Ono T, Nishi R, Yokoi M, Sakai W, Sugawara K. Thymine DNA glycosylase modulates DNA damage response and gene expression by base excision repair-dependent and independent mechanisms. *Genes Cells.* 2017 Apr;22(4):392-405. 査読有.
8. Kato D, Osakabe A, Arimura Y, Mizukami Y, Horikoshi N, Saikusa K, Akashi S, Nishimura Y, Park SY, Nogami J, [Maehara K](#), Ohkawa Y, Matsumoto A, Kono H, Inoue R, Sugiyama M, Kurumizaka H. Crystal structure of the overlapping dinucleosome composed of hexasome and octasome. *Science.* 2017 Apr 14;356(6334):205-208. 査読有.
9. 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. 査読有.
10. [†]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. 査読有.
11. Kujirai T, Horikoshi N, Sato K, [Maehara K](#), Machida S, Osakabe A, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H. Structure and function of human histone H3.Y nucleosome. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jul 27;44(13):6127-41. 査読有.
12. [†]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. 査読有.
13. Kobayashi W, Takaku M, Machida S, Tachiwana H, [Maehara K](#), Ohkawa Y,

Kurumizaka H. Chromatin architecture may dictate the target site for DMC1, but not for RAD51, during homologous pairing. *Sci Rep.* 2016 Apr 7;6:24228.
査読有.

(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

()

〔学会発表〕(計3件)

1. Maehara K, Myogenic Chromatin Structure Is Formed with the Histone H3 Variant H3m7, Muscle Development, Regeneration and Disease 2018, 2018
2. 前原 一満, ヒストン H3.3 のサブバリエーション H3m7 は正常な骨格筋再生に必要とされる, 2017 年度生命科学系学会合同年次大会, 2017
3. 前原 一満, ホッジ分解による疑似ライブ・シングルセルプロファイル追跡法, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

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

番号：PCT/JP2017/008320

出願年月日：2017-03-02

国内外の別： 国外

〔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

前原 一満 (Maehara Kazumitsu)

研究者番号：90726431

所属研究機関名・部局・職名：国立大学法人九州大学・生体防御医学研究所・助教