

平成 25 年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書 〔追跡評価用〕

◆記入に当たっては、「平成 25 年度科学研究費助成事業（特別推進研究）自己評価書等記入要領」を参照してください。

平成 25 年 4 月 24 日現在

研究代表者 氏名	広瀬 進	所属研究機関・ 部局・職	国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・特任教授
研究課題名	細胞記憶を支えるクロマチンダイナミクス		
課題番号	17002018		
研究組織 (研究期間終了時)	研究代表者 広瀬 進（国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・特任教授） 研究分担者 西岡 憲一（国立遺伝学研究所・個体遺伝研究系・助教）		

【補助金交付額】

年度	直接経費
平成 17 年度	69,100 千円
平成 18 年度	59,700 千円
平成 19 年度	50,900 千円
総 計	179,700 千円

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか

特別推進研究によってなされた研究が、どのように発展しているか、次の(1)~(4)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究の概要

(研究期間終了後における研究の実施状況及び研究の発展過程がわかるような具体的内容を記述してください。)

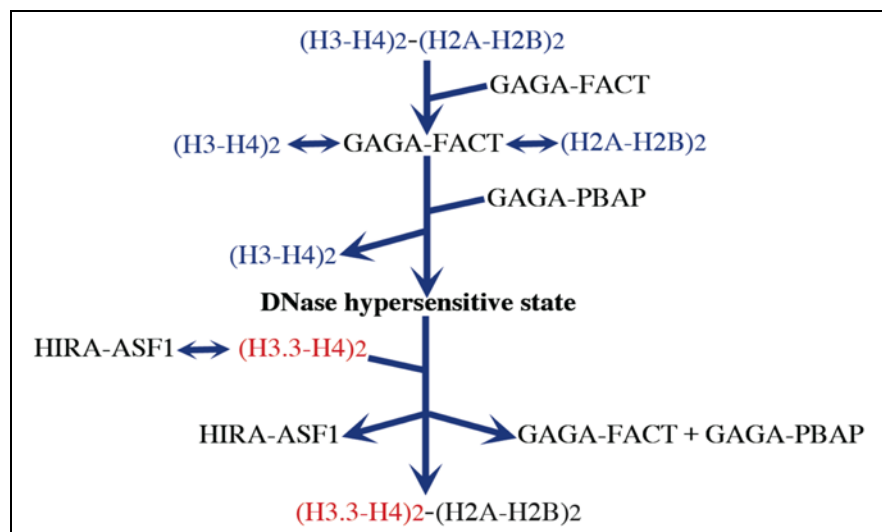
研究期間終了後もクロマチンダイナミクスに焦点を当てて細胞記憶の研究を展開している。以下にそれらの研究について記載する。

1. FACT の天然変性領域の解析とそれが細胞記憶に果たす役割

細胞記憶を支えるクロマチンダイナミクスに関わる FACT には、そのアミノ酸配列から天然変性状態にあると推定される領域が存在する。金沢大学の安藤教授のグループが開発した高速原子間力顕微鏡を用いて、FACT の天然変性領域を可視化することに成功した。この成果はタンパク質の天然変性領域を可視化した初めての例である。また、FACT の天然変性領域のリン酸化が FACT のヌクレオソームへの結合を阻害することを見出した。さらに、ショウジョウバエで母親から胚に供給される FACT はリン酸化された不活性型であり、受精後速やかに脱リン酸化され活性化されることを見出した。この発見は、FACT の天然変性領域の脱リン酸化が初期胚における速やかな細胞記憶の確立に関わることを示唆している。

2. クロマチンの境界におけるヒストン H3.3 置換に必要なクロマチンリモデリング因子の同定

ショウジョウバエを用いた遺伝学および、分子生物学的解析から、位置効果による斑入りに重要な役割を果たすクロマチンの境界におけるヒストン H3 から H3.3 への置換に、クロマチンリモデリング因子 PBAP 複合体が必要なことを明らかにした。



3. 超らせん化因子によるヒストン H1 の排除

ショウジョウバエで X 染色体の量的補正に関わる超らせん化因子のゲノムワイドな ChIP 解析を行ない、超らせん化因子が局在する領域でヒストン H1 のレベルが低いことを見出した。現在、超らせん化因子欠損変異株で、ヒストン H1 のレベルが回復しているか調べている。

4. マウス Ash11 の機能解析

Ash11 は、ショウジョウバエで細胞記憶に関わる Ash1 のマウスオルソログである。Ash11 の機能解析を行なうため、特別推進研究の実施期間中に Ash11SET ドメインの条件的欠失マウスを作製した。このマウス由来の ES 細胞を用いた解析から、Ash11 はヒストン H3K36 をメチル化し、Hox 遺伝子や Wnt 遺伝子などレチノイン酸レセプターに依存する遺伝子群の発現に重要な役割を果たすことを見出した。

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）

(2) 論文発表、国際会議等への招待講演における発表など（研究の発展過程でなされた研究成果の発表状況を記述してください。）

論文発表

代表的なものを以下に記載する。

Miyagi, A. et al., Visualization of intrinsically disordered region of proteins by high-speed atomic force microscopy.

ChemPhysChem. 9, 1859-1866 (2008).

Tsunaka, Y., et al., Phosphorylated intrinsically disordered region of FACT masks its nucleosomal DNA binding elements.

J. Biol. Chem. 284, 24610-24621 (2009).

Liu, Q.-X., et al., Midline governs axon pathfinding by coordinating expression of two major guidance systems.

Genes Dev. 23, 1165-1170 (2009).

Nakayama, T., et al., The PBAP remodeling complex is required for histone H3.3 replacement at chromatin boundaries and boundary functions. (2012). **Development** 139, 4582-4590 (2012).

Akagi, K., et al., The binding of multiple nuclear receptors to a single regulatory region is important for the proper expression of EDG84A in *Drosophila melanogaster*. **J. Mol. Biol.** 425, 71-81 (2013).

Kanesaki, T., et al., Heterotrimeric G protein signaling governs the cortical stability during apical constriction in *Drosophila* gastrulation. **Mech. Dev.** 130, 132-142 (2013).

Ash11 に関する研究については、revised version を再投稿中にある。

国際会議等への招待講演

代表的なものを以下に記載する。

Susumu Hirose: Chromatin dynamics in position effect variegation.

Symposium on “Dynamics of Chromatin Structure”

Morioka, Japan, May (2008)

Susumu Hirose: GAGA factor mediates association of PBAP chromatin remodeling complex with regulatory region of Hox genes.

Cold Spring Harbor Meeting on “Mechanisms of Eukaryotic Transcription”

Cold Spring Harbor, USA, August (2009)

Kenichi Nishioka: A role of histone methylation by Ash11 in the establishment of transcription memory.

Cold Spring Harbor Conference Asia on “Epigenetics, Chromatin & Transcription”

Shuzu, China, May (2009)

Kenichi Nishioka: Histone H3 Lys36 methylation by Ash11 triggers a regulatory cascade of the chromatin reprogramming that counteract Polycomb silencing.

Symposium on “Networks and Dynamics of Regulatory Chromatin” The 34th Annual Meeting of Molecular

Biology Society of Japan

Yokohama, Japan, December (2011)

Kenichi Nishioka: Ash11 methylates histone H3 Lys36 independent of transcriptional elongation to counteract the Polycomb silencing.

Cold Spring Harbor Conference Asia on “Epigenetics, Chromatin & Transcription”

Shuzu, China, April (2012)

1. 特別推進研究の研究期間終了後、研究代表者自身の研究がどのように発展したか（続き）**(3) 研究費の取得状況（研究代表者として取得したもののみ）**

平成 20-21 年（2008-2009 年）
文部科学省 都市エリア産官学連携促進事業（富士山麓エリア）
“ソラレン誘導体によるがん診断法の確立”（代表）
総額：3450 万円

(4) 特別推進研究の研究成果を背景に生み出された新たな発見・知見

1. タンパク質の天然変性領域の可視化
タンパク質の天然変性領域を初めて可視化し、物理化学的パラメーターを測定することにより、天然変性領域がランダムコイルとは異なる状態にあることを明らかにした。
2. ヒストン H3.3 置換に必要なクロマチンリモデリング因子の同定
ヒストン H3/H4 対はヌクレオソーム内部に存在するため、ヒストン H3 から H3.3 への置換には特別推進研究期間中に見出した FACT だけでなく、ATP 依存性クロマチンリモデリング因子が必要と予想されていた。終了後の研究から、クロマチンの境界におけるヒストン H3.3 置換に SWI/SNF タイプのリモデリング因子 PBAP 複合体が必要なことが明らかとなった。
3. 超らせん化因子による転写活性化機構
ゲノムワイドな ChIP 解析から、超らせん化因子はクロマチンからヒストン H1 を排除することにより、転写を活性化するというメカニズムが示唆された。
4. Ash11 によるヒストン H3 のメチル化
Ash1 やその哺乳類オルソログである Ash11 によるヒストン H3 メチル化のターゲットは *in vitro* の解析からは K36、*in vivo* の解析からは K4 であることが示唆され、混迷していた。Ash11SET ドメインの条件的欠失変異を用いた我々の研究は、*in vitro*、*in vivo* の実験結果共に K36 であることを明らかにし、長期間にわたる論争に終止符を打った。また、出芽酵母 SET1 やヒトの hSET1 の解析から、ヒストン H3K36 のメチル化は転写伸長に伴って起きることが定説となっていたが、我々は Ash11 によるヒストン H3K36 のメチル化が転写伸長の前、もしくは転写伸長と独立に起きることを明らかにし、上記の定説をくつがえした。

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況

特別推進研究の研究成果が他の研究者に活用された状況について、次の(1)、(2)の項目ごとに具体的かつ明確に記述してください。

(1) 学界への貢献の状況（学術研究へのインパクト及び関連領域のその後の動向、関連領域への関わり等）

学術研究へのインパクト

1. タンパク質天然変性領域研究のイノベーション

タンパク質の天然変性領域の実験的根拠に関しては、これまで NMR 解析で高次構造形成のシグナルが得られないなど、negative な検出方法しか無かった。今回、天然変性領域を高速原子間力顕微鏡を用いて可視化することにより、物理化学的パラメーターの測定が可能となった。この成果は今後の天然変性領域研究に新しいフレームワークを提供するものである。

2. 細胞記憶からがん研究へのインパクト

クロマチンの境界におけるヒストン H3.3 置換に必要なクロマチンリモデリング因子として PBAP 複合体が同定された。PBAP 複合体の哺乳類カウンターパートは PBAF 複合体であり、そのサブユニットである Brm/Brg1 や Polybromo の変異は、ヒトでがんとの深い関連が報告されている。このことは細胞記憶の破綻ががんの発症に至る可能性を示唆しており、注目に値する。

研究材料の分与

当該研究において、研究代表者らは、細胞記憶に関わる主要な分子のショウジョウバエ変異株や抗体、遺伝子発現プラスミドなどを作製した。これらは、国内外の多くの研究者の請求に答えて分与した。以下に代表的なものを記述する。これらの研究材料は、細胞記憶や発生の研究に用いられ、役立っている。

ショウジョウバエ変異株など

- FLAG-ヒストン H3 発現株
- FLAG-ヒストン H3.3 発現株
- FLAG-GAGA 因子発現株
- FLAG-SCF 発現株
- dRSF1 変異株
- midline 変異株
- UAS-midline 導入株
- Dspt16 欠損変異株
- scf 欠損変異株

抗体

- 抗 dSSRP1 抗体
- 抗 dSPT16 抗体
- 抗 MBF1 抗体
- 抗 Midline 抗体
- 抗 SCF 抗体
- 抗 dRSF1 抗体

DNA

- dSSRP1 発現プラスミド
- dSPT16 発現プラスミド

2. 特別推進研究の研究成果が他の研究者により活用された状況（続き）

(2) 論文引用状況（上位10報程度を記述してください。）

【研究期間中に発表した論文】

No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Transcription of <i>bxd</i> non-coding RNAs promoted by Trithorax represses <i>Ubx</i> in <i>cis</i> by transcriptional interference. <i>Cell</i> 127, 1209-1221 (2006).	Non-coding RNA の転写が下流の Hox 遺伝子に対して転写干渉を起しその発現を抑制する事を明らかにした。	108
2	Functional cooperation between FACT and the MCM helicase complex facilitates initiation of chromatin DNA replication. <i>EMBO J.</i> , 25, 3975-3985 (2006).	FACT が MCM 複合体と相互作用し、クロマチン上での MCM ヘリケース活性に必須な事を明らかにした。	57
3	Linker histone variants control chromatin dynamics during early embryogenesis. <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 102, 5697-5702 (2005).	初期胚に存在するリンカーヒストン B4 は体細胞のリンカーヒストン H1 と異なり、クロマチンリモデリング因子の働きを阻害せず、ダイナミックなクロマチンを構築する事を明らかにした。	47
4	<i>Drosophila</i> GAGA factor directs histone H3.3 replacement that prevents the heterochromatin spreading. <i>Genes Dev.</i> 21, 552-561 (2007).	クロマチンの境界でヒストン H3 から H3.3 への置換が起きる事により、ヘテロクロマチンの侵攻を阻止するというメカニズムを解明した。	41
5	DNA supercoiling factor contributes to dosage compensation in <i>Drosophila</i> . <i>Development</i> , 133, 4475-4483 (2006).	超らせん因子 SCF が X 染色体の量的補正に関わる事を明らかにした。	29
6	RSF governs silent chromatin formation via histone H2Av replacement. <i>PLoS Genetics</i> 4 (2), e1000011 (2008).	クロマチンリモデリング因子 RSF がヒストン H2A から H2V への置換を通してヘテロクロマチン形成に関わる事を明らかにした。	19
7	<i>Drosophila</i> Blimp-1 is a transient transcriptional repressor that controls timing of the ecdysone-induced developmental pathway. <i>Mol. Cell. Biol.</i> 27, 8739-8747 (2007).	ショウジョウバエ Blimp-1 が転写抑制を通してエクダイソンに依存した発生の制御に関わる事を示した。	13
8	Solution Structure of the HMG-box domain in the SSRP1 subunit of FACT. <i>J. Biomol. NMR</i> , 32, 83-88 (2005).	FACT サブユニットである SSRP1 に存在する HMG ドメインの立体構造を明らかにした。	6
9	Compensatory change of interacting amino acids in the coevolution of transcriptional coactivator MBF1 and TATA-box-binding protein. <i>Mol. Biol. Evol.</i> 24, 1458-1463 (2007)	コアクチベーター-MBF1 と TBP の共進化を実験的に実証した。	6
10	Crucial roles of chromatin dynamics in cellular memory. <i>J. Biochem.</i> 141, 615-619 (2007).	細胞記憶を支えるクロマチンダイナミクスに関する総説。	5

【研究期間終了後に発表した論文】			
No	論文名	日本語による簡潔な内容紹介	引用数
1	Phosphorylated intrinsically disordered region of FACT masks its nucleosomal DNA binding elements. J. Biol. Chem. 284, 24610-24621 (2009).	FACT サブユニットである SSRP1 の ID 領域のリン酸化が FACT のヌクレオソームへの結合を制御していることを明らかにした。	34
2	Visualization of intrinsically disordered region of proteins by high-speed atomic force microscopy. ChemPhysChem. 9, 1859-1866 (2008).	FACT の ID 領域を高速原子間力顕微鏡により可視化した。	22
3	Midline governs axon pathfinding by coordinating expression of two major guidance systems. Genes Dev. 23, 1165-1170 (2009).	ショウジョウバエ Midline がアクソン誘導システムの発現調節を通してアクソンの pathfinding を統括していることを明らかにした。	7
4	The PBAP remodeling complex is required for histone H3.3 replacement at chromatin boundaries and boundary functions. Development 139, 4582-4590 (2012).	PBAP リモデリング複合体がクロマチン境界におけるヒストン H3.3 置換に必要なことを明らかにした	0
5	The binding of multiple nuclear receptors to a single regulatory region is important for the proper expression of EDG84A in <i>Drosophila melanogaster</i> . J. Mol. Biol. 425, 71-81 (2013).	。ショウジョウバエ EDG84A の発現調節領域に複数の核内レセプターが結合して制御していることを明らかにした。	0
6	Heterotrimeric G protein signaling governs the cortical stability during apical constriction in <i>Drosophila</i> gastrulation. Mech. Dev. 130, 132-142 (2013).	ショウジョウバエの原腸陥入にヘテロ3量体 G タンパク質が関わることを示した	0
7			
8			
9			
10			

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報

次の(1)、(2)の項目ごとに、該当する内容について具体的かつ明確に記述してください。

(1) 研究成果の社会への還元状況（社会への還元の程度、内容、実用化の有無は問いません。）

研究成果の公開

発表論文のオープンアクセスサイト：ResearchGate への公開

Abstract のみ公開：27 報

Full text の公開：44 報

論文へのアクセス回数：1148 回/半年

インタビューの公開

細胞記憶研究の経緯を解説したインタビューを公開した。

<http://www.nig.ac.jp/section/ijin/ijin-2.html>

研究成果物の製品化

抗 dSSRP1 抗体（カタログ番号：NIG-L1-SHA1）

抗 dSPT16 抗体（カタログ番号：NIG-Li-SH2）

細胞内超らせん DNA 可視化試薬（カタログ番号：NIG-L1-R1）

以上の製品をコスモバイオから市販し、国内外の研究者が随時使用出来る様にした。

3. その他、効果・効用等の評価に関する情報（続き）**(2) 研究計画に関与した若手研究者の成長の状況（助教やポスドク等の研究終了後の動向を記述してください。）**

佐賀大学医学部助教
かずさDNA研究所 研究員
生命システム情報研究所 研究員
科学技術振興機構 さきがけ研究者
国立国際医療研究センター研究所 研究員
理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター 研究員
国際特許事務所 弁理士
東北大学大学院薬学研究科 助教
静岡県立大学食品栄養科学部 助教
近畿大学農学部 助教
チェコ共和国 Institute of Entomology 准教授
中国 山東農業大学 准教授
和光純薬株式会社 研究員
高砂香料工業株式会社 研究員
カールツァイスマイクロコピー株式会社 研究員
国際特許事務所 弁理士