

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06186

研究課題名(和文)ゲノム改変細胞を用いたコアヒストンの生理機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of core histones using genome-modified cells

研究代表者

高見 恭成 (Takami, Yasunari)

宮崎大学・医学部・准教授

研究者番号：80236356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、クロマチンの形成およびエピジェネティクスを制御する分子メカニズムの解明およびヒストンの新規機能の解明を目指し、(1) Cre-loxpシステムを用いて条件的にコアヒストン遺伝子領域を一括して除去可能な改変細胞株の樹立の試み、(2) 全ヒストンH1欠損変異細胞を用いて、リンカーヒストンH1の新たな生理機能解析を中心に研究を行なった。

(1)改変細胞の樹立は現在も条件を変え検討中である。(2)全ヒストンH1欠損変異細胞の解析から、ヒストンH1は、アポトーシスを誘発した細胞でもクロマチンの凝集性を増強し、さらには細胞の柔軟性などの機械的特性にも関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クロマチン制御の研究のほとんどは、ヒストンにトランスに働きかけるタンパク質群の解析に偏っていた。ヒストン分子を遺伝学的に機能解析する研究は変異株樹立の困難さからほとんど行われていない。本研究で得られたヒストンH1の新規生理機能に関する知見は将来的に、エピジェネティクスの制御を対象とした新規薬剤開発研究への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Using histone H1-null mutant cells, we found that the apoptotic chromatin condensation was decreased in the null mutant cells and that the chromatin in the nuclei prepared from the live null mutant cells had the high accessibility of DNases and transposase, suggesting that linker histone H1 is the apoptotic chromatin condensation factor and that the loss of histone H1 generates open chromatin in live cells. Furthermore, using the deterministic lateral displacement microfluidic device that can separate cells according to cell stiffness, we found that the null mutant cells are more flexible than DT40 cells, suggesting that the cell stiffness is also determined by histone H1.

研究分野：分子細胞生物学

キーワード：ヒストン クロマチン エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

コアヒストン(H2A, H2B, H3, H4)はクロマチン構造の根幹をなす分子であり、部位特異的なアセチル化、メチル化等の修飾が様々なDNA介在反応(複製、転写、組換え)に与える影響は遺伝子置換の容易な酵母の遺伝学的解析から明らかではあるが、動物細胞でのこれらの知見は主としてヒストン修飾酵素のノックアウトやノックダウン実験から得られた間接的なものである。これは高等動物では、コアヒストン分子やその化学修飾の有する生理機能を遺伝学的に *in vivo* で直接検証できる実験系が存在しないためである。動物種にもよるが、一般に個々のヒストン遺伝子は数十~数百コピーからなる多重遺伝子であり、複数の染色体に局在しているため、個々の全コアヒストン遺伝子を任意の変異ヒストンと置換することは極めて困難であると考えられてきた。しかしながら、近年我々は、ニワトリB細胞白血病株 DT40 を用いて、条件的に全リンカーヒストン H1 遺伝子を除去できる細胞システムの構築が可能であることを示し、全リンカーヒストン H1 欠損動物細胞が生存可能であることを明らかにした。本課題では、これまで動物細胞では作製が困難とされてきた内在性のコアヒストン遺伝子領域を一括除去して任意の変異コアヒストンと置換可能な DT40 細胞システムの作製に取り組んだ。

2. 研究の目的

クロマチン制御の研究のほとんどは、ヒストンにトランスに働きかけるタンパク質群の解析に偏っていた。一方、クロマチンの主要構成因子であるヒストンは、あまりにも普遍的な存在すぎて、ヒストン自身を詳細に機能解析するという発想自体がクロマチンの研究分野に存在せず、動物細胞株を用いた遺伝学的なヒストン分子の研究は変異株樹立の困難さからほとんど行われていない。本研究の目的は DT40 細胞を用いて容易に細胞内コアヒストンの特定残基の置換を可能にする遺伝学的システムを構築することである。本システムを使用することでコアヒストンの特定領域もしくは化学修飾の *in vivo* での影響を直接検討でき、コアヒストン・リンカーヒストン・ヒストン修飾の生理的意義を明らかにできる。

3. 研究の方法

我々には、これまで染色体工学技術により、動物細胞内で条件的にクロマチン制御因子を欠損する細胞株の取得に成功し、さらに全リンカーヒストン H1 遺伝子を除去可能な細胞システムの構築に成功している。本研究では、クロマチンの形成およびエピジェネティクスを制御する分子メカニズムの解明およびヒストンの新規機能の解明を目指し、(1) Cre-loxp システムを用いて conditional にコアヒストン遺伝子領域を一括して除去可能な改変細胞株の樹立の試み、(2) 全ヒストン H1 欠損変異細胞を用いて、リンカーヒストン H1 の新たな生理機能解析を中心に研究を行なった。

4. 研究成果

ヒストン遺伝子領域除去システムの構築

ニワトリ DT40 細胞の全 Canonical ヒストン遺伝子群(各 H1, H2A, H2B, H3, H4 遺伝子が 5-10 コピー/haploid)が、一番染色体上の一カ所(約 100kb 内)に存在する利点を生かし、Cre-loxp システムを用いて conditional に本ローカスを一括して除去可能な改変細胞株の樹立を試みた。片側アレルのヒストンローカスの両端に loxp を導入した株の樹立は成功し、コアヒストン遺伝子を条件的に半数にする系はできた。しかし、さらにもう一方のアレルのヒストンローカスの両端に loxp を導入する株の作製はできていない。現在条件を変え、作製中である。今後、この変異株樹立後、各ヒストン遺伝子(内因性の制御領域を含む)を 1 コピーずつ含む発現コンストラクトを作製し、細胞の特定ゲノム部位に挿入可能なシステムを構築する予定である。

全ヒストン H1 欠損変異株を用いたリンカーヒストンの機能解析

我々は DT40 から樹立した全ヒストン H1 欠損変異細胞を用いて、リンカーヒストン H1 の新たな生理機能解析に取り組んだ。クロマチン凝縮は、アポトーシスの特徴としてよく知られているが、その発生メカニズムはまだ明らかになっていない。我々は、アポトーシスを誘発した H1 欠損変異細胞ではアポトーシスによるクロマチン凝縮が減少していること、核内の

クロマチンは DNase やトランスポザーゼのアクセス性が高いことを発見し、リンカーヒストン H1 がアポトーシスのクロマチン凝縮因子であり、ヒストン H1 の欠損によって生きている細胞でオープンクロマチンが生成されることを示唆した。さらに、細胞の柔軟性に応じて細胞を分離可能なマイクロ流体デバイスを用いて、全 H1 欠損変異体の細胞が DT40 細胞よりも柔軟性に富むことを明らかにし、細胞の柔軟性もヒストン H1 によって決定されることが示唆された。したがって、ヒストン H1 は、アポトーシスを誘発した細胞でも生きている細胞でもクロマチンの凝集性を増強し、細胞の生化学的および機械的特性を決定している可能性がある。本知見は将来的に、エピジェネティクスの制御を対象とした新規薬剤開発研究への応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Marie Kijima, Hiroyuki Yamagishi, Yasushi Hara, Mai Kasai, Yasunari Takami, Hiroshi Takemura, Yusuke Miyanari, Yoichi Shinkai, Ryushin Mizuta	4. 巻 512
2. 論文標題 Histone H1 quantity determines the efficiency of chromatin condensation in both apoptotic and live cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem. Biophys. Res. Commun.	6. 最初と最後の頁 202-207
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2019.03.030.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------