

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16664

研究課題名（和文）ヒストンの選択が規定する骨格筋再生メカニズムの解明

研究課題名（英文）Functional analysis of histone H3.3 sub-variants in skeletal muscle regeneration

研究代表者

小松 哲郎（Komatsu, Tetsuro）

九州大学・生体防御医学研究所・特任助教

研究者番号：70614824

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）：ヒストンバリエントH3.3は初期発生、分化における選択的遺伝子発現制御に不可欠な役割を担っている。本研究では、H3.3にアミノ酸配列の酷似した「H3.3サブバリエント」のうち、骨格筋において発現するH3mm18の機能解析を行った。マウスや培養細胞を用いた解析から、H3mm18は分化誘導に伴う骨格筋関連遺伝子群の発現変動を制御することが明らかとなった。また、生化学的な解析から、H3mm18自身は安定的にクロマチンに取り込まれないものの競合的にH3.3のクロマチンへの取り込みを阻害することで筋分化を負に制御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

本研究は、クロマチン構造の最も基礎的な構成因子であるヒストンの多様性が組織の形成、維持に重要な役割を果たしている可能性を示した。特に、クロマチンに安定的に取り込まれないヒストンバリエントの詳細についてはほとんど報告されておらず、本研究におけるH3mm18の機能解析により新規のクロマチン構造制御の分子機構の存在が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Histone variant H3.3 plays a critical role in regulating gene expression during development and differentiation. In this study, we analyzed the role of H3mm18, one of the “H3.3 sub-variants” expressed in skeletal muscle. Transcriptome analysis using mouse samples as well as culture cells revealed that H3mm18 regulates expression levels of myogenic genes upon skeletal muscle regeneration and/or differentiation. Furthermore, biochemical experiments suggested that H3mm18 itself is not stably incorporated into chromatin but regulates myogenic chromatin structure by competing with H3.3 in histone deposition.

研究分野：エビジェネティクス

キーワード：ヒストンバリエント 骨格筋分化 エビジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

クロマチン構造の最小単位であるヌクレオソームはDNAとコアヒストンと呼ばれるタンパク質から構成される。このうち、ヒストンH3には数アミノ酸のみ異なるH3.1/H3.2、H3.3と呼ばれるバリエーションが存在する。初期発生、分化における選択的遺伝子発現制御は、特にH3.3が不可欠な役割を担っている。我々は、骨格筋分化において遺伝子発現制御のメカニズム解明を進めており、これまでにH3バリエーションの選択的なクロマチンへの取り込みにより骨格筋細胞の性質、運命が決定されることを報告してきた。特に、所属研究室は情報科学的アプローチによりH3.3のアミノ酸配列の酷似した「H3.3サブバリエーション」をマウスで13種同定し、この中の1つH3mm7が骨格筋組織形成に機能することを報告した。これら知見から、多数同定された新規H3.3サブバリエーションが各細胞分化において欠かせない特異的クロマチン構造形成へ関与していることが示唆されていた。

2. 研究の目的

所属研究室の先行研究においてマウス個体から単離した骨格筋細胞の3'RNA-seq解析を行い骨格筋におけるH3.3サブバリエーションの発現を検討した結果、骨格筋再生に不可欠なH3mm7以外にも骨格筋においていくつかのH3.3サブバリエーションが発現していることが明らかとなった。この中には、クロマチンへ安定的に取り込まれるH3mm11やH3mm13、クロマチンにほとんど取り込まれないH3mm18が含まれていた。したがって、これらバリエーションがH3mm7と同様に骨格筋特異的な機能を果たしていることが示唆された。そこで本研究では、骨格筋再生過程においてH3mm11、H3mm13、H3mm18が形成する特異的クロマチン構造を解析し、骨格筋分化遺伝子の発現制御を行っているかを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、骨格筋芽細胞株やマウスをモデルとして、骨格筋特異的に発現するH3.3サブバリエーションの機能解析を行うこととした。生理学的解析には、所属研究室において網羅的に作成した各H3.3サブバリエーションのノックアウト (KO) マウスを用いた。また、マウス骨格筋前駆細胞株C2C12細胞やMyoD 強制発現によるNIH3T3 線維芽細胞の骨格筋前駆細胞へのリプログラミング系を用いて、細胞生物学的解析や生化学的解析、そして次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析、エピゲノム解析を実施した。これら解析を通じて、個体レベルから分子レベルにおけるH3.3サブバリエーションの機能解明を試みた。

4. 研究成果

まずクロマチンに安定的に取り込まれるH3.3サブバリエーションであるH3mm13についてKOマウスによる解析を行った。結果、KOマウスに形態上異常は見られず、また蛇毒を用いた筋再生実験においても野生型と比較して筋横断面積や筋重量などの組織学的な差は認められなかった。また、H3mm11といった他のH3.3サブバリエーションのKOマウスも正常に出生することが明らかとなった。同様に、CRISPR/Cas9システムを用いて骨格筋芽細胞C2C12細胞においてH3mm13のKO株を樹立したが、筋分化能に明確な差は見られなかった。従って、これらH3.3サブバリエーションは正常な発生、分化には必須でない可能性が示唆された。

一方、クロマチンに取り込まれないH3mm18のKOマウスの筋再生実験においてトランスクリプトーム解析を行った結果、筋再生過程における一過的な遺伝子発現変動に野生型との差が検出された。さらに骨格筋芽細胞C2C12細胞を用いた筋分化実験、そしてNIH3T3線維芽細胞にMyoDを強制発現させ骨格筋形質転換を誘導する系において、H3mm18を強制発現させることにより筋分化が抑制さ

れた。トランスクリプトーム解析の結果、H3mm18は分化誘導に伴う骨格筋関連遺伝子群などの遺伝子発現変動を特異的に制御することが示唆された。また、ATAC-seq解析からH3mm18の発現により骨格筋関連遺伝子の転写開始点周辺のクロマチンアクセシビリティが抑制されることが示唆された。従って、H3mm18はクロマチン構造を介して遺伝子発現を制御していると考えられた。H3mm18によるクロマチン構造制御のメカニズムを明らかとするため生化学的解析を実施した。その結果、H3mm18はH3.3特異的シャペロンであるDaxxと相互作用することが示唆された。また、H3mm18が核内構造体の一つPML-nuclear bodyにおいてDaxxと共局在することが明らかとなった。以上の結果から、H3mm18は、自身は安定的にクロマチンに取り込まれないものの競合的にH3.3のクロマチンへの取り込みを阻害することで筋分化を負に制御する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小松 哲郎、近藤 友佳理、小山 昌子、原田 哲仁、前原 一満、竹本 龍3、木村 宏、胡桃坂 仁志、大川 恭行
2. 発表標題 ヒストンH3.3サブバリエントH13mm18は骨格筋分化を負に制御する
3. 学会等名 第13回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松 哲郎、原田 哲仁、前原 一満、小野 悠介、林 克彦、木村 宏、胡桃坂 仁志、大川 恭行
2. 発表標題 ヒストンH3.3サブバリエントH3mm13は骨格筋再生に必要である
3. 学会等名 第12回日本エピジェネティクス研究会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小松 哲郎、原田 哲仁、前原 一満、小野 悠介、田口 裕之、Yan Xie、佐藤 優子、林 克彦、竹本 龍也、木村 宏、胡桃坂 仁志、大川 恭行
2. 発表標題 ヒストンH3.3サブバリエントH3mm13は骨格筋再生を制御する
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔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
---------------------------	-----------------------	----