

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年6月10日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659492

研究課題名（和文）遺伝子の転写記憶を担うヒストンバリエントH3.3と血球細胞分化

研究課題名（英文）Epigenetic marking by histone variant H3.3 during myeloid cell differentiation

研究代表者

田村 智彦（TAMURA TOMOHIKO）

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：50285144

研究成果の概要（和文）：多細胞生物の細胞分化では遺伝子発現の適切な制御が必須であり、その制御機構の破綻は疾患を引き起こしうる。本研究ではヒストンバリエント H3.3 による「転写の記憶」に着目し、マクロファージ分化における H3.3 のクロマチンへの取込み部位の全ゲノム規模解析や、H3.3 取込みの分子機構の解析を行った。その結果、H3.3 が伸長を含む転写の多段階で調節に関わっている可能性や、転写伸長の際メチル化を受ける H3.3 の 36 番目のアミノ酸リジン残基がクロマチンへの取込みに必須であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）：Cell differentiation in multicellular organisms is achieved by dynamic changes in gene expression pattern. Dysregulation of such processes can cause various diseases including cancers. Histone variant H3.3 plays an important role in epigenetic memory of active genes. In this study we mapped genome-wide distribution of H3.3 during macrophage differentiation. The results indicated that H3.3 may regulate several steps of transcription including elongation. We also identified H3.3K36 as an amino acid residue required for H3.3 incorporation into chromatin.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・血液内科学

キーワード：エピジェネティックメモリー

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物における細胞分化においては、各系譜に特異的な転写因子によってしかるべき下流遺伝子の転写が活性化あるいは抑制されることが必須であること、そしてその制御機構が破綻するとがん等の疾患を引き起こしうるということが知られている。本研究代表者もこれまで、IRF ファミリー転写因子について、特に血球特異的な IRF8 や IRF4 がミエロイド細胞や樹状細胞の分化に必要であることや、IRF8 が慢性骨髄性白血病（CML）病態に拮抗すること等を示して来た。このように細胞系譜特異的な分化機構はかなり解明

されてきた。しかし多細胞生物が効率的に多様な細胞系譜の分化を制御するためには、あらゆる系譜に普遍的な細胞分化の仕組みも存在し、各系譜特異的な因子もその仕組みと密接に関係して働いているのではないだろうか。その普遍的機構の候補としてエピジェネティックな転写制御機構が考えられる。

エピジェネティックな転写制御において近年、ヒストンや DNA の修飾に加えてヒストンバリエントが大きく注目されつつある。哺乳動物細胞のヒストン H3 には 3 つのバリエントが存在する。DNA 複製依存性にクロマチンに取り込まれる H3.1 と H3.2 に対し、H3.3

は DNA 複製非依存性に転写の亢進した部位に取り込まれることから「転写活性化のエピジェネティックメモリー（転写の記憶）」を担いうる。しかし H3 バリエントはその生化学的な解析が進んでいる一方、生物学的意義はほとんど明らかになっていない。

本研究代表者は最近、哺乳動物細胞におけるサイトカイン刺激による遺伝子の転写活性化時に、H3.3 は遺伝子の 3' 領域に取り込まれ、転写伸長関連修飾である K4 や K36 のトリメチル化を受けること、H3.3 による転写の記憶は細胞分裂しない場合長く保たれるが分裂すると急速に失われること、そして H3.3 が遺伝子の転写活性化に正の役割を持つことを示している。

2. 研究の目的

ヒストン H3.3 はエピジェネティックな「転写の記憶」を担う H3 バリエントである。本研究では血球分化における H3.3 の役割を、本研究代表者が得た新知見に基づく観点から解析する。新知見とは、遺伝子が転写されると H3.3 が 3' 領域に取り込まれ転写伸長関連修飾を伴い転写を促進すること、そしてこの H3.3 による標識は極めて安定で細胞分裂によってのみ希釈されることである。これを細胞分化に当てはめると、①「増殖」とは H3.3 による転写の記憶を消去して変化（分化）するために重要、②一方「増殖停止」は H3.3 による転写の記憶を保持し「最終」分化するために重要、という仮説が生まれる。本研究ではこの仮説のもと、血球系をモデルとして H3.3 の役割を解析することで、最終的にはあらゆる系譜に普遍的な「細胞分化の基本原則」の理解を目指す。

この目的のため、細胞分化のマクロファージ分化における H3.3 の取込み部位についてクロマチン免疫沈降 (ChIP)-seq 法により全ゲノムにわたる網羅的解析を行った。また、転写活性領域における H3.3 のクロマチンへの取込み機構を明らかにするために、インターフェロン (IFN) による遺伝子発現誘導系をモデルとして解析を行った。

3. 研究の方法

(1) マクロファージ分化におけるヒストン H3.3 の ChIP-seq 解析

Irf8 (Interferon regulatory factor 8) 欠損マウスより樹立したミエロイド前駆細胞株 Tot2 は転写因子 IRF8 の導入によりマクロファージへの分化が誘導される。H3.3-YFP を発現する Tot2 細胞に、IRF8 を導入しマクロファージ分化を誘導した。抗 GFP 抗体を用いた ChIP により、H3.3 に結合する DNA 断片を精製した。ChIP-seq は Genome Analyzer IIX によりシーケンスを行った。得られた配列はマッピングソフトウェアである Bowtie によ

りマウスゲノム上での部位を同定し、ピーク同定ソフトウェアである SICER により H3.3 の蓄積部位および蓄積量を算出した。

(2) 転写活性領域のクロマチンへの H3.3 取込みの K36 依存性の解析

転写伸長の際にトリメチル化されることが知られている、H3.3 の 36 番目のリジンがアルギニンに置換した変異体 (H3.3K36R) を作製した。組換えレトロウイルスベクターを用いて、マウス線維芽細胞株 NIH3T3 に H3.3-YFP、H3.3K36R-YFP 発現遺伝子を導入し、IFN β (100 U/ml) 処理を行った。抗 GFP 抗体を用いた ChIP により、H3.3 が結合する DNA 断片を精製し、リアルタイム PCR により、*Oas1a*、および *Gtf2b* 遺伝子座での H3.3 の蓄積量および局在を解析した。

4. 研究成果

(1) マクロファージ分化における H3.3 取込みの網羅的解析

マクロファージ分化における H3.3 のエピジェネティックメモリーとしての役割を明らかにするために、ChIP-seq 法を用い H3.3 の取込み部位をゲノムワイドに解析した。まず H3.3-YFP 発現 Tot2 細胞を作製し、これに IRF8 を導入し、マクロファージへの分化を誘導した。導入した H3.3-YFP の局在については、マクロファージ分化前と同様、分化後においても核内でユークロマチン領域に局在することが確認された (図 1)。

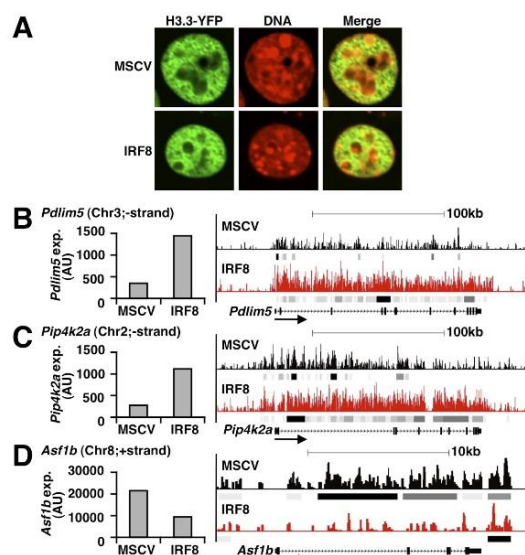


図 1. H3.3 の核局在、および IRF8 により発現が変動する遺伝子における H3.3 の蓄積部位

さらにマクロファージ分化に伴い発現が誘導される遺伝子、発現が抑制される遺伝子に注目して、H3.3 の分布および蓄積量を解析した (図 1)。PDZ and LIM domain 5 (*Pdlim5*)、および II 型ホスファチジルイノシトール 5-

リン酸 4-キナーゼ α (*Pip4k2a*) は IRF8 導入により発現が誘導され (それぞれ 4.2 倍、4.1 倍)、それらの遺伝子座においては H3.3 が主に 3' 領域に取り込まれた。一方、IRF8 により発現が抑制される ASF1 anti-Silencing Function 1 Homolog B (*Asf1b*) 遺伝子 (0.43 倍に減少) は、IRF8 非導入細胞で同様に 3' 領域での取り込みが見られる一方、IRF8 導入細胞ではその分布が著減していた。これに加え、H3.3 はプロモーター領域へも蓄積されることが明らかとなった (データ未掲載)。このことから、これまでに我々が指摘した転写伸長に加え、H3.3 がエンハンサー領域やプロモーター領域で転写調節に関わる可能性が示唆された。

(2) インターフェロン刺激による K36 依存的なヒストン H3.3 取込みの解析

我々は以前、H3.3 では H3.1 に比べて K36 のトリメチル化が亢進していることを明らかにしている。H3.3 のクロマチンへの取込みにおける K36 のトリメチル化の役割を検討するために、この K36 をアルギニンに置換した変異体 H3.3 を作製し、IFN β 刺激時発現が誘導される遺伝子領域への H3.3 の取込み量、および局在を解析した。

IFN stimulated gene (ISG) として知られる *Oas1a* は、IFN β 刺激後速やかに発現が誘導され、*Oas1a* 遺伝子の 3' 領域への H3.3 の取込みが認められる。取込まれた H3.3-YFP の蓄積は、*Oas1a* 遺伝子発現誘導後 48 時間においても認められた (図 2 A)。一方、K36R 変異体においては、IFN β 刺激以前より *Oas1a* 遺伝子座への取込み量が若干減少しているのに加え、IFN β 刺激後の蓄積量が著しく低下した (図 2 B)。

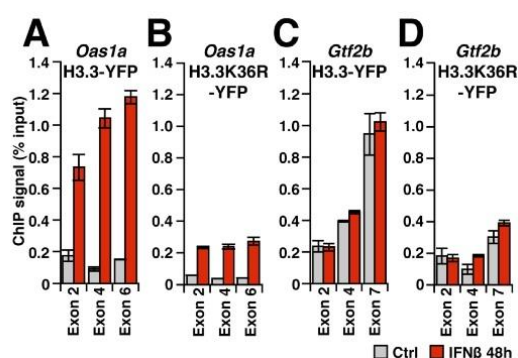


図 2. IFN β 処理における H3.3 および H3.3K36R の蓄積量の変化

また、恒常的発現を示し、IFN β 刺激においても発現量がほぼ変化しない遺伝子である *Gtf2b* について、H3.3-YFP 取込みの解析を行った。その結果、H3.3-YFP の取込みは、IFN β 刺激の有無で大きな変化は無かったが、遺伝子の 3' 領域への蓄積が認められた (図

2 C)。一方、H3.3K36R-YFP の取込みは、*Oas1a* 遺伝子座と同様に全体的に減少し、IFN β 処理の有無により変化は認められなかった (図 2 D)。これらのことから H3.3 の活性化された遺伝子座への取込みには K36、おそらくはそのメチル化が重要であることが示唆された。

(3) まとめ

本研究においては、マクロファージ分化における H3.3 の局在の解析、および H3.3 の転写活性領域へ取込みにおける K36 残基との関連について解析を行った。

これまでの H3.3 の局在を全ゲノム規模で解析した報告は、胚性幹細胞、*Drosophila* 由来細胞についての報告であり、哺乳類由来細胞での最終分化における H3.3 の局在の解析は、極めて少ない。細胞は、各細胞系譜の複数の段階を経て最終分化に至り、細胞が組織で持ちうるべき特化した機能を獲得する。H3.3 は活性化された遺伝子座へ取り込まれるが、これにより形成された転写の記憶は、細胞分裂しない限り長期にわたって保たれる。このことから H3.3 は、細胞が最終分化の際に、それまで積み重ねてきた「記憶を維持」する役割を持つと考えられる。ChIP-seq 法により、マクロファージ分化における H3.3 取込みの網羅的解析を行った結果、転写伸長に伴う活性化遺伝子の 3' 領域への取込みに加え、活性化遺伝子のプロモーター領域での蓄積が認められた。これらの蓄積は、マクロファージの機能獲得のための遺伝子発現に重要な役割を持つ可能性が高い。一方、H3.3 の活性化された遺伝子座への取込みには、K36 おそらくそのメチル化修飾が不可欠であることが明らかとなった。これらの知見を基盤にして、H3.3 の取込みや K36 メチル化の生物学的意義についてさらなる解析を行なうことが重要と考えられる。

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 5 件)

- (1) Iwasaki Y, Fujio K, Okamura T, Yanai A, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Yoshida H, Charnay P, Yamamoto K: Egr-2 transcription factor is required for Blimp-1 mediated IL-10 production in IL-27 stimulated CD4(+) T cells. Eur. J. Immunol. 43, 1-11, 2013. 査読有 DOI: 10.1002/eji.201242942.
- (2) Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Ban T, Sato H, Nakabayashi J, Umehara M, Miyake N, Matsumoto N, Nakazawa M, Ozato K, Tamura T:

Essential role of the IRF8-KLF4 transcription factor cascade in murine monocyte differentiation. *Blood* 121, 1839-1849, 2013. 査読有 DOI: 10.1182/blood-2012-06-437863.

- (3) Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Ozato K, Tamura T, Inoue K: IRF8 is a critical transcription factor for transforming microglia into a reactive phenotype. *Cell Reports* 1, 334-340, 2012. 査読有 DOI: 10.1016/j.celrep.2012.02.014.
- (4) Nishiyama A, Dey A, Tamura T, Ko M, Ozato K: Activation of JNK triggers release of Brd4 from mitotic chromosomes and mediates protection from drug-induced mitotic stress. *PLoS One* 7, e34719, 2012. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0034719.
- (5) Yamamoto M, Kato T, Hotta C, Nishiyama A, Kurotaki D, Yoshinari M, Takami M, Ichino M, Nakazawa M, Matsuyama T, Kamijo R, Kitagawa S, Ozato K, Tamura T: Shared and distinct functions of the transcription factors IRF4 and IRF8 in myeloid cell development. *PLoS ONE* 6, e25812, 2011. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0025812.

〔学会発表〕(計22件)

- (1) 黒滝大翼, 大里直樹, 西山 晃, 山本道雄, 佐藤英明, 中林 潤, 落 龍馬, 梅原 茉里奈, 三宅紀子, 松本直通, 中沢正年, Keiko Ozato, 田村智彦: ゲノム規模解析による単球分化に重要な IRF8-KLF4 転写因子カスケードの発見. 第35回分子生物学会年会 (2012年12月11日、福岡国際会議場 (福岡県))
- (2) Watanabe T, Hotta C, Kurotaki D, Sato RG, Yamamoto M, Nishiyama A, Tamura T: Impaired dendritic cell development in chronic myelogenous leukemia can be rescued by restoring expression of the transcription factor IRF8. 第41回日本免疫学会学術集会 (2012年12月7日、神戸国際会議場 (兵庫県))
- (3) Kurotaki D, Osato N, Nishiyama A, Yamamoto M, Sato H, Nakabayashi J, Ban T, Ozato K, Tamura T: Genome-wide analyses revealed the IRF8-KLF4 transcription factor cascade during monocyte differentiation. 第41回日本免疫学会学術集会 (2012年12月5日、神戸国際会議場 (兵庫県))
- (4) 田村智彦: ゲノム規模解析による転写因子 IRF8 を核とした単球分化制御プログラムの理解. 文部科学省イノベーション

システム整備事業 先端融合領域イノベーション創出拠点形成プログラム「翻訳後修飾プロテオミクス医療研究拠点の形成」第4回公開シンポジウム (2012年10月1日、横浜情報文化センター (神奈川県))

- (5) Tamura T: The transcription factor IRF8 in the pathogenesis and therapy of chronic myelogenous leukemia. 第71回日本癌学会学術総会 (2012年9月21日、ホテルロイトン札幌 (北海道))
- (6) Ozato K, Sarai N, Patel M, Debrosse M, Heightman T, Tamura T, Ura K: Chromatin exchange in interferon induced transcription. 10th Joint Meeting of International Cytokine Society and International Society for Interferon and Cytokine Research (2012年9月11日、ジュネーブ、スイス)
- (7) Shibata W, Yasuzaki H, Kubushiro Y, Hotta C, Tamura T, Maeda S: Loss of IRF signaling contributes to the development of Helicobacter associated gastric carcinogenesis *in vivo*. Digestive Disease Week (DDW) 2012 (2012年5月20日、サンディエゴ、アメリカ)
- (8) 加藤隆幸, 山本道雄, 堀田千絵, 西山 晃, 高見正道, 松山俊文, 上條竜太郎, 北川誠一, 尾里啓子, 田村智彦: 骨髄系細胞分化での IRF8 と IRF4 の機能. 第89回日本生理学会大会 (2012年3月31日、長野県松本文化会館 (長野県))
- (9) Yoshinaga R, Tsuda M, Masuda T, Nishimoto N, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Inoue K: Interferon regulatory factor-5 in spinal microglia is a crucial transcription factor for the development of neuropathic pain. 第85回日本薬理学会年会 (2012年3月15日、京都国際会議場 (京都府))
- (10) Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Nishimoto N, Iwamoto S, Tamura T, Inoue K: IRF family transcription factor axis governs gene expression program in microglia that drives neuropathic pain. 第85回日本薬理学会年会 (2012年3月15日、京都国際会議場 (京都府))
- (11) Nishiyama A, Dey A, Tamura T, Ozato K: Activation of JNK mediates protection from drug-induced mitotic stress by triggering release of Brd4 from mitotic chromosome. 第34回日本分子生物学会年会 (2011年12月15日、パシフィコ横浜 (神奈川県))

- (12) Tamura T, Yamamoto M, Osato N, Kurotaki D, Uno K, Nakazawa M, Nishiyama A, Ozato K: IRF8 physically interacts with C/EBP α to inhibit the generation of granulocyte-macrophage progenitors and neutrophils. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜 (神奈川県))
- (13) Watanabe T, Hotta C, Sato GR, Yamamoto M, Fujita H, Sakai R, Fujisawa S, Nishiyama A, Aihara M, Ishigatsubo Y, Tamura T: The transcription factor IRF8 rescues the dendritic cell development impaired by p210 Bcr/Abl. 第 34 回日本分子生物学会年会 (2011 年 12 月 14 日、パシフィコ横浜 (神奈川県))
- (14) Iwasaki Y, Yanai A, Okamura T, Sumitomo S, Shoda H, Tamura T, Fujio K, Yamamoto K: Transcription factor Egr-2 regulates IL-10 production induced by IL-27 in naïve T cells. 第 40 回日本免疫学会学術総会 (2011 年 11 月 29 日、幕張メッセ (千葉県))
- (15) Kurotaki D, Ichino M, Nishiyama A, Sato G, Yamamoto M, Ozato K, Tamura T: Regulation of the development of monocyte subsets by interferon regulatory factor 8. 第 40 回日本免疫学会学術総会 (2011 年 11 月 28 日、幕張メッセ (千葉県))
- (16) Ozato K, Sarai N, Patel M, Debrosse M, Tamura T, Ura K: Interferon stimulation causes diverse changes in chromatin to regulate transcription. 9th Joint Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR) and the International Cytokine Society (ICS) (2011 年 10 月 12 日、フィレンツェ、イタリア)
- (17) Kurotaki D, Ichino M, Nishiyama A, Sato G, Yamamoto M, Ozato K, Tamura T: Selective regulation of monocyte subsets by the transcription factor Interferon Regulatory Factor 8. 9th Joint Meeting of the International Society for Interferon and Cytokine Research (ISICR) and the International Cytokine Society (ICS) (2011 年 10 月 11 日、フィレンツェ、イタリア)
- (18) 増田隆博, 津田誠, 吉永遼平, 齋藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀: Interferon regulatory factor-8 は、神経損傷後に見られる脊髄ミクログリアの過活動状態への移行に重要な転写因子である. 第 54 回日本神経化学会大会 (2011 年 9 月 28 日、山代温泉瑠璃光 (石川県))
- (19) 吉永遼平, 津田誠, 増田隆博, 西本奈央, 齋藤秀俊, 田村智彦, 井上和秀: 脊髄ミクログリアの interferon regulatory factor-5 は神経障害性疼痛の発現に重要な転写因子である. 第 54 回日本神経化学会大会 (2011 年 9 月 26 日、山代温泉瑠璃光 (石川県))
- (20) Masuda T, Tsuda M, Yoshinaga R, Tozaki-Saitoh H, Tamura T, Inoue K: IRF8 transcription factor directs microglia to be a hyperactive phenotype driving neuropathic pain. 10th Euroglia Meeting on Glial Cells in Health and Diseases (2011 年 9 月 17 日、プラハ、チェコ)
- (21) 市野素英, 堀田千絵, 田村智彦: マラリアにおける樹状細胞分化の異常と転写因子 IRF ファミリー. 第 80 回日本寄生虫学会 (2011 年 7 月 18 日、東京慈恵会医科大学 (東京都))
- (22) 黒滝大翼, 田村智彦, 上出利光: 細菌感染時の生体防御反応におけるリンパ節 CD169 陽性髄質マクロファージの役割の解明. 第 22 回日本生体防御学会学術総会 (2011 年 7 月 1 日、那覇市ぶんかテンブス館 (沖縄県))

〔その他〕

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~immunol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田村 智彦 (TAMURA TOMOHIKO)
横浜市立大学・医学研究科・教授
研究者番号: 50285144

(2) 研究分担者

足立 典隆 (ADACHI NORITAKA)
横浜市立大学・生命ナノシステム科学研究科・教授
研究者番号: 30264675

(3) 連携研究者

西山 晃 (NISHIYAMA AKIRA)
横浜市立大学・医学研究科・准教授
研究者番号: 80589664