

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 13日現在

機関番号：34310

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23770213

研究課題名（和文） ヒストンメチル化により神経細胞の運命を決定するHAMLETの機能解析

研究課題名（英文） The epigenetic role of Hamlet in neurogenesis

研究代表者

谷口 浩章（TANIGUCHI HIROAKI）

同志社大学・生命医科学部・助教

研究者番号：50587441

研究成果の概要（和文）：

神経前駆細胞分化誘導機構におけるショウジョウバエ Prdm 転写因子 Hamlet の作用メカニズムを遺伝学的、生化学的、分子生物学的手法を用い調査している。Hamlet はショウジョウバエの感覚神経に発現し、感覚神経の運命決定因子として同定された転写因子であり、Hamlet を感覚神経にて過剰発現させると multidendritic (MD) neurons から nonbranched dendrite である外部感覚神経に変化する。現在までにこの Hamlet の作用がヒストンのメチル化を介したものであることを明らかにするとともに、Notch シグナルを抑制することにより感覚神経の運命を決定する可能性を示した。

研究成果の概要（英文）：

Hamlet is the evolutionarily conserved *Drosophila* Prdm transcription factor family member and it has been demonstrated that Hamlet controls non-neural versus neural cell fate in the *Drosophila melanogaster* External Sensory Organ lineage (**Moore et al. Science. 2002 297:1355-8**). By means of chromatin immunoprecipitation and proteomic approaches, I elucidated that Hamlet modifies histone density and histone methylation at Notch target gene loci. Hamlet contains two zinc finger clusters; a PR (PRDI-BF1 and RIZ homology) domain, a derivative of the SET domain; and a C-terminal Binding Protein (CtBP) transcriptional co-repressor binding site. All these domains are highly conserved in HAM homologues from *C. elegans* (Egl43) to mouse and humans (Prdm16). By using transgenic flies which lack these conserved Hamlet domains, we determined that both zinc finger clusters and CtBP domains are required for proper Hamlet function.

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	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学、分子生物学

キーワード：エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

細胞の運命譜となるゲノム情報を巧みに読み取り、生体はさまざまな細胞の運命決定を行っている。この過程には、クロマチンのエピジェネティックな制御や細胞特異的転写因子による複雑な遺伝子制御などが深く関与している。しかし、転写因子とクロマチンの制御が如何に組み合わさって1細胞の運命を決定するのかについては未だ多くの疑問が残されている。

Prdm ファミリーは神経、造血および生殖系の幹細胞の運命決定因子として同定された転写因子群であり (*Nat Cell Biol.* 2010 12:999-1006, *Nature.* 2005 436:207-13, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010 107:9783-8)、その役割からも作用機構解明が待たれている。興味深いことに、Prdm 転写因子群の多くがヒストンのメチル化を通じて、細胞周期および細胞分化などの恒常的な機能を制御することが明らかにされている (*BMC Evol Biol.* 2007 7:187)。よって、Prdm ファミリーはエピジェネティックな修飾を介してさまざまな標的遺伝子の発現を調節し、細胞の運命を決定している可能性が示唆されているが、1細胞単位での運命決定メカニズムの解明はなされていない。

Hamlet はショウジョウバエにおける Prdm ファミリー遺伝子の1つである。我々は世界に先駆けて Hamlet がショウジョウバエの外部感覚神経の運命決定を司る因子であることを明らかにした (*Moore et al. Science.* 2002 297:1355-8)。例えば、Hamlet を外部感覚器に過剰発現させると毛細胞およびソケット細胞が神経細胞に運命変換する (*Fig.1 ①*)。さらに、Hamlet の機能を外部感覚器に

において欠損させると逆に神経細胞が毛細胞およびソケット細胞に変換する (*Moore et al. Genes Dev.* 2004 18:623-8, *Fig.1 ②*)。外部感覚器神経発達時におけるその明確な機能にも関わらず、Hamlet の作用機構の解析は全く行われていなかった。

申請者は Hamlet の作用機構の分子メカニズムを研究し以下のような知見を得た。

1) Hamlet は標的遺伝子 (*E(spl) m3* など) のプロモーター領域に集積し、標的遺伝子の発現を負に制御する。(ショウジョウバエ細胞を用いた検討)

2) その遺伝子発現抑制作用はヒストン H3K9 および H3K27 のメチル化を介している。

3) Hamlet の作用には Zn フィンガー領域および CtBP 結合配列が重要であり、これらの配列は他の動物種においても保存されていることを検証した。

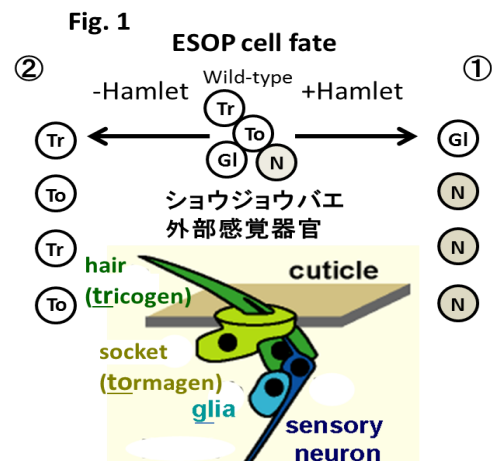
Hamlet はヒストンのメチル化活性を有する可能性が示唆されている PR ドメインを有するが、このドメインを欠損させても Hamlet の作用には変化がなかった。よって、申請者らは Hamlet が H3K9 および H3K27 のメチル化因子と直接結合することによりその作用を発揮するという仮説を立てた。

よって本研究においては以下の仮説に従い実験を行った。

1. Hamlet の作用はヒストン H3K9/27 メチル化因子と結合することにより発揮される
2. Hamlet に結合したヒストン H3K9/27 メチル化因子は Hamlet による感覚神経の細胞運命決定に重要な役割を果たす。

2. 研究の目的

本研究においては Notch シグナルと転写因子 Hamlet によるエピジェネティックなメカニ



ムを介した感覚神経の運命決定機構を明らかにすることを目的とした。

目的 1. Hamlet 結合型ヒストンメチル化因子の同定:過去の報告から Hamlet との結合が予想されるヒストン H3K9/27 メチル化因子（もしくは申請者が既に明らかにした因子）と Hamlet の遺伝学的相互作用について検討した。また、Hamlet に結合し作用する未知のヒストンメチル化因子を遺伝学および生化学的スクリーニングにより同定した。

目的 2. Hamlet 複合体は実際に標的プロモーターにおいてヒストンのメチル化を制御するのか?上記実験で同定した Hamlet の複合体が *E(spl) m3* プロモーター領域のヒストン H3K9/27 のメチル化を促し、*E(spl) m3* 遺伝子発現を抑制するかを検討する。また、Hamlet 複合体がヒストン H3K9/27 のメチル化活性を有することを確認した。

目的 3. 生体内で Hamlet とヒストンメチル化因子との結合を阻害した際に、Hamlet の作用は失われるのか?ヒストンメチル化因子には生命の維持に必須なものが多く、遺伝子を欠損させた場合、致死および複数の表現型が確認される可能性が考えられる。そこ

でまず、Hamlet のアミノ酸配列を一部改変することで、特定のヒストンメチル化因子との結合を阻害するドメインを同定する。その後、Hamlet ノックアウトショウジョウバエに、ヒストンメチル化因子との結合ドメインを欠損させた Hamlet を導入することで、その外部感覚器における表現型が変化するかどうかを検討する。その同定されたヒストンメチル化因子との結合ドメインが重要である場合、Hamlet ノックアウトショウジョウバエの表現型をレスキューできず、ソケット細胞および毛細胞のみが形成されることが考えられた。

1-1.生化学的解析

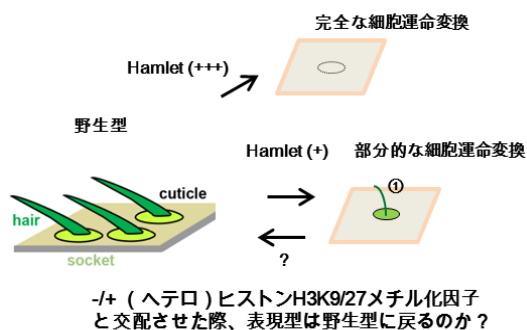
予備実験の結果より、Hamlet の作用はヒストン H3K9/27 メチル化因子と複合体を形成することにより発揮されることが考えられる。そこで本実験においてはまず現在までに明らかにされている H3K9/27 メチル化因子 (dG9a, Su(var)3-9, E(z), Trithorax 他)と、Hamlet の相互作用を免疫沈降および Pull-Down アッセイを用いて明らかにする。Hamlet の哺乳類におけるホモログである Prdm3(evi-1)がヒストン H3K9/27 メチル化因子である SUV39H1 および G9a と結合することが明らかにされていることから (FEBS Lett. 2008 582:2761-7)、これら因子のショウジョウバエホモログである Su(var)3-9 および dG9a と Hamlet の結合をまず最初に試験した。さらに、現在までに知られている H3K9/27 メチル化因子との相互作用についても合わせて検討した。

また Hamlet が他の因子との結合を介して H3K9/27 メチル化因子と結合している可能性も考えられる。よって、V5-His-Hamlet を安定的に発現させた S2 細胞を用いて Hamlet の複合体精製を行なう。V5 抗体をク

ロスリンクさせたビーズを用いて精製を行った。得られた精製物を液体状で消化後、マズスペックにより結合タンパクを同定した。Hamlet 複合体の精製には申請者自身の共同研究者である小川英知博士(Ogawa H et al. *Science*. 2002 296:1132-6)の協力を得ることで、実験を遂行した。本実験によって得られた結果をもとに免疫沈降および Pull-Down アッセイを行い、Hamlet とヒストン H3K9/27 メチル化因子との結合様式を明らかにした。また、我々はすでに CtBP が Hamlet に結合することを明らかにしており、CtBP がヒストン H3K9/27 メチル化因子をリクルートすることにより Hamlet の機能を調節している可能性も考えられるので、Hamlet と CtBP の機能解析を合わせて行った。

1-2.遺伝学的解析

Hamlet とヒストン H3K9/27 メチル化因子



との相互作用についてエンハンサー・サプレッサースクリーニングを用いて解析する。本スクリーニングはショウジョウバエのクロマチン制御メカニズムの解明に非常に有効な方法として多くの研究において用いられており、我々はこの方法を用いて CtBP およびヒストンシャペロン Asf-1 が Hamlet と遺伝的に相互作用することを明らかにした。我々はまず、感覚神経器において Hamlet を比較的低発現させることにより、50%の頻度で毛およびソケット細胞から神経およびグ

リア細胞への変換が起こる系を作成した。

この変換は胸背板の外部毛形成の減少を確認することで簡易に判別が可能である(横図1. 2)。この変異体に、種々のヒストン H3K9/27 メチル化因子をヘテロで欠損させた遺伝子改変ショウジョウバエを交配させることで Hamlet の作用が失われるかどうかを検討する。

4. 研究成果

Notch によって発現調節される遺伝子のクロマチン構造の状態を調べた。Prdm 転写因子である Hamlet が活性化すると、Notch が作用する遺伝子のクロマチン構造に収縮が起こり、その結果、遺伝子の発現制御領域に転写因子が結合できなくなり、Notch の活性化が抑制されることが分かった。また、ポリコーム因子を含む様々なタンパクが Hamlet の結合因子および遺伝的相互因子として同定された。さらに生体を用いた実験において、Hamlet の作用には Znfinger 領域と CtBP 結合領域が重要であることが明らかになった。

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1件)

1. Endo K, Taniguchi H*, Karim R*, Krejci A, Kinameri E, Seibert M, Ito K, Bray SJ, Moore AW. Chromatin modification of Notch targets in olfactory receptor neuron diversification. *Nature Neuroscience* 2011 15:224-33. *= equally contributed. 査読有

[学会発表] (計2件)

1. Taniguchi H, Karim MR, Delandre C, Kinameri E, Wada K, Moore AW. To be or Notch to be Epigenetic mechanism of *Drosophila* Hamlet function 7th Notch meeting (Mishima, Japan, 14-15 February 2013)

2. Taniguchi H, Hohenauer T, Karim R, Kinameri E, Krejci A, Bray SJ, Moore AW. *Drosophila* Hamlet controls neural cell-fate choices via histone methylation. Epigenetic Landscape in Development and Disease Riken CDB symposium (Kobe, Japan, 14-16 March 2011).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 浩章 (TANIGUCHI HIROAKI)
同志社大学・生命医科学部・助教
研究者番号 : 50587441

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :