

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23770257

研究課題名(和文)細胞運命維持におけるヒストンアセチル化を介した転写抑制維持機構の研究

研究課題名(英文) Research of transcriptional repression mechanism by histone acetylation in the maintenance of cell fate

研究代表者

柴田 幸政 (Shibata, Yukimasa)

関西学院大学・理工学研究科・博士研究員

研究者番号：80314053

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：アセチル化ヒストンは細胞運命の維持に必要なだがそこに関わる分子機構は不明な部分が多い。本研究では運命維持機構が必要とするクロマチン状態の変化を明らかにする。その結果、アセチル化は転写因子をコードする遺伝子座にヒストンバリエントHTZ-1/H2A.zをリクルートし転写を抑制する事、このリクルートがH3K27meに阻害される事を明らかにした。また、ヒストンの配置を調節するCeBAF複合体も必要であった。

研究成果の概要(英文)：Histone acetylation is required for the maintenance of cell fates. But, its molecular mechanism is largely unknown. In this study, we investigate the dynamics of chromatin status that regulate cell-fate maintenance. As a results, we found that acetylated histone recruit histone variant HTZ-1/H2A.z on the loci that encodes transcription factor, and repress the locus. The recruitment of HTZ-1 is inhibited by H3K27me. We also found that the CeBAF complex that control histone deposition is required for the maintenance of cell fates.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学 発生生物学

キーワード：クロマチン BET 細胞運命維持 UTX H2A.z

1. 研究開始当初の背景

細胞が獲得した運命を維持する事は、正常な発生に不可欠である。運命の維持にはヒストンメチル化依存的に働く Polycomb 蛋白質群が必要な事がよく知られており、その変異体では Hox 遺伝子の抑制を維持できず、ある体節が別の体節に変化する。これに対し、私は、*C. elegans* で single cell level の観察を行う事で、アセチル化ヒストン結合蛋白質 BET-1 とヒストンアセチル化酵素 MYST HAT が、転写抑制の維持を通して、運命の維持に関わっている事を見つけていた。しかし、BET-1 及び MYST HAT 以外に、どのような分子がアセチル化依存的細胞運命維持機構に必要とされるのかはわかっておらず、また、この機構がターゲット遺伝子の挙動に及ぼす影響もわかっていなかった。

変異体の解析から、BET-1 は転写因子をコードする遺伝子の抑制を維持していると考えられた。BET-1 は生殖巣のリーダー細胞 distal tip cell (DTC) の抑制に必要な事を既に報告しており、この DTC の誘導に必要な遺伝子を抑制する事で DTC の過剰形成を防いでいると考えられた。しかし、DTC の誘導に必要な転写因子は報告されておらず、その様な転写因子を見だし、それに対する BET-1 の役割を明らかにする事がまず始めに必要であった。

2. 研究の目的

本研究では、運命の維持に必要な新規な分子機構の作用機序を知るために、BET-1 と他のクロマチン蛋白質との関係を調べ、それが BET-1 のターゲット遺伝子座の挙動にどう関わるかを明らかにすることを目的とした。

具体的には、DTC の抑制に関わる BET-1 のターゲット遺伝子を同定する事。BET-1 と共に細胞運命の維持に関わる遺伝子を同定し、その BET-1 との関係を明らかにする事。BET-1 及びその関連遺伝子同士の関係をゲノムワイドなレベルで明らかにする事、を目標とする。

3. 研究の方法

(1) BET-1 および HTZ-1 ターゲット遺伝子の同定

BET-1 は生殖巣の形態形成に必要なリーダー細胞 DTC の異所的な誘導を抑制する。ホメオボックス蛋白質をコードする *ceh-22* 遺伝子が *bet-1* 変異体で異所発現する事、*bet-1* 変異体で *ceh-22* を抑制すると DTC の過剰発現が抑制される事、野生型で *ceh-22* の異所発現を行うと DTC の異所的な形成が引き起こされる事などから、*ceh-22* 遺伝子が BET-1 の直接のターゲットである可能性が考えられる。しかし、*ceh-22* 遺伝子座が BET-1 及びその関連因子の直接のターゲットであるという証拠はまだ得られていなかった。一つの方法として、BET-1 関連遺伝子の *ceh-22* 遺伝子座への局在を確認する方法

が考えられる。これまでに、BET-1 はヒストン H2A のバリエーション HTZ-1/H2A.z と共に働いているという遺伝学的な証拠を得ており、HTZ-1 のゲノム上の配置に関わると考えられ、BET-1 はターゲット遺伝子座に HTZ-1 をリクルートすると考えられる。そこで、*ceh-22* 遺伝子座が BET-1 及び HTZ-1 のターゲット遺伝子座である事を確認するために、HTZ-1 のゲノム上の配置及び核内局在を調べる。

(2) HTZ-1 ターゲット遺伝子のクロマチン状態の制御機構の解析

HTZ-1 ターゲット遺伝子の候補である *ceh-22* への HTZ-1 のリクルートがどのような分子機構によって制御されているかを、以下の様な方法で明らかにする。私はこれまでに、*bet-1* 変異体及び *htz-1 mys-1* 二重変異体の DTC の過剰形成の表現型を抑制する因子のスクリーニングを、RNAi ライブラリーを用いて行っており、その結果ヒストン H3K27 脱メチル化酵素である UTX-1 を得ている。*utx-1* RNAi は DTC の過剰形成だけでなく、*bet-1* 変異体及び *htz-1 mys-1* 二重変異体でみられる *ceh-22* の異所発現も抑制する事から、BET-1 や HTZ-1 の標的遺伝子であると予想している *ceh-22* を直接のターゲットにしている可能性が考えられた。その場合、HTZ-1 の *ceh-22* 遺伝子座に対する局在に UTX-1 が何らかの影響を及ぼす可能性があると考え、ヒストン H3K27 脱メチル化酵素である UTX-1 の抑制が、HTZ-1 の局在に及ぼす影響を調べた。具体的には *ceh-22* 遺伝子座を Nuclear spot 法によって可視化し、そこへの HTZ-1::YFP の局在を観察する。Nuclear spot 法とは、目的の遺伝子の近傍に lacO 配列を導入し、これに lacI::CFP などを結合させる事で、目的の遺伝子付近を可視化する方法である。今回は、*C. elegans* に *ceh-22* 遺伝子と lacO 配列を外来の遺伝子として導入し、これらにミニ染色体様の染色体外アレイと呼ばれる構造をとらせ、この *ceh-22* 遺伝子をもった染色体外アレイを可視化した。

(3) BET-1 経路と相互作用する遺伝子の同定とその解析

bet-1 経路で働く遺伝子に MYST ファミリーヒストンアセチル化酵素をコードする遺伝子 *mys-1* がある。そこで、*bet-1* 遺伝子と相互作用する遺伝子を同定するために、*mys-1* 変異体バックグラウンドで、RNAi スクリーニングを行った。また、スクリーニングで得た遺伝子 *ham-3* が、ヒストンのゲノム上の配置を制御する CeBAF 複合体の調節因子をコードしている事から、CeBAF 複合体の構成因子が *ceh-22* 遺伝子の発現に及ぼす影響を調べた。具体的には CeBAF 複合体に含まれると考えられている、SWSN-6 の変異体があり、その変異体でも DTC の過剰形成

がみられるので、*swsn-6* 遺伝子と *bet-1* の関係について調べた。

4. 研究成果

(1) BET-1 および HTZ-1 ターゲット遺伝子の同定

ceh-22 遺伝子座への HTZ-1 の局在を調べるために、modENCODE プロジェクトで公開されている、HTZ-1 のゲノム上の局在データを解析した。*ceh-22* 遺伝子の発現が BET-1 及び HTZ-1 によって制御されているのは生殖巣の体細胞由来の細胞のみであり、約 1000 個ある体細胞の 10% 以下の細胞のみである。そのため、*ceh-22* 遺伝子座に大きな HTZ-1 のピークは期待できない。そこで小さなものも含めピークの有無を確認したところ、*ceh-22* 遺伝子座の転写開始点付近にピークがみられた。この結果は、HTZ-1 が少数の細胞で *ceh-22* で遺伝子座に結合しているという予想と一致する。

そこで、実際に生殖巣において HTZ-1 が *ceh-22* 遺伝子座に局在する事を確認した。具体的には、数百コピーの *ceh-22* 遺伝子を持つ染色体外アレイに *lacO* を介して *lacI::CFP* を局在させる事で *ceh-22* 遺伝子座を可視化し、そこへの YFP::HTZ-1 の局在を観察した。その結果、染色体外アレイが *ceh-22* 遺伝子を持っている場合に HTZ-1 の局在がより頻繁にみられる事が明らかとなった。HTZ-1 及び BET-1 は生殖巣において *ceh-22* 遺伝子の発現を抑制している事は既に確認しており、これと合わせると、*ceh-22* 遺伝子が HTZ-1 及び BET-1 のターゲット遺伝子であり、生殖巣では *ceh-22* 遺伝子の転写を、BET-1 と HTZ-1 が抑制していると考えられる。HTZ-1/H2A.z 及び BET-1 が結合するヒストン H4 のアセチル化はこれまで転写の活性化に関わる例が多く報告されていたが、この結果はこれらの因子が転写の抑制に関わる事を示すものである。

(2) BET-1 ターゲット遺伝子のクロマチン状態の解析

次に、BET-1 及び HTZ-1 のターゲット遺伝子である *ceh-22* のクロマチン状態が、HTZ-1 の局在にどのような影響を及ぼすかを調べた。これまで *bet-1* 変異体及び *htz-1 mys-1* 二重変異体の表現型が *utx-1* RNAi で抑制される事から、H3K27 のメチル化が *ceh-22* 遺伝子から取り除かれた場合に、HTZ-1 が転写抑制を行うというモデルを考えていた。そのため、H3K27 のメチル化が、*ceh-22* 遺伝子座への HTZ-1 の局在を抑制している可能性が考えられた。そこで、*utx-1* RNAi が *ceh-22* 遺伝子座への HTZ-1 の局在に及ぼす影響を調べたところ、*utx-1* を抑制すると HTZ-1 の *ceh-22* 遺伝子座への局在が低下する事がわかった。このことから、H3K27 のメチル化が HTZ-1 の *ceh-22* 遺伝子座への局在を阻害する事がわかった。

更に、HTZ-1 と H3K27me のゲノムワイドな局在を比較してみたところ、その局在には負の相関がある事が明らかとなった。前述の結果と合わせて考えると、H3K27 のメチル化がみられるゲノム領域では HTZ-1 の局在レベルが低下するといえる。このような傾向は、性染色体では比較的強く、常染色体でより顕著であった。また、HTZ-1 と他の抑制性のヒストンマークである H3K9me の局在を比較したところ、負の相関はあるものの、HTZ-1 と H3K27me を比較したとき程顕著ではないという結果になった。遺伝的解析の結果も合わせて考えると、H3K27me と HTZ-1 の間に何らかの相互作用があると考えるのが妥当である。この結果は、*ceh-22* 遺伝子座のみではなく、多くの遺伝子座で H3K27me によって HTZ-1 の局在が抑制されているであろう事を示している。

(3) BET-1 経路と相互作用する遺伝子の同定とその解析

mys-1 変異体バックグラウンドで、RNAi スクリーニングを行ったところ、CeBAF 複合体の調節因子をコードする *ham-3* 遺伝子が *mys-1* と相互作用する事がわかった。具体的には、*ham-3* 遺伝子を抑制すると、*mys-1* 表現型を増強する事が明らかになった。この *ham-3* を *bet-1* 変異体で抑制した場合にも同様に *bet-1* 変異体の DTC の過剰形成の表現型を増強した。この結果は *ham-3* が *bet-1* や *mys-1* とは異なる遺伝学的経路で働いている事を示している。

このことから、BET-1 及び HTZ-1 と共に CeBAF 複合体も細胞運命の維持に関与している可能性が考えられた。そこで、CeBAF 複合体の別の調節因子 SWSN-6 の変異体が遺伝学研究所の澤 斉教授の研究室で既に得られており、DTC の過剰形成の表現型を示す事がわかっていたので、これについても詳しく表現型の解析を行った。その結果、*swsn-6* 変異体で DTC の過剰形成を示す変異体の割合は発生ステージと共に多くなっていく事が明らかになった。この結果は、*swsn-6* 遺伝子が *bet-1* や *htz-1* 遺伝子と同じく細胞運命の維持に関わっている事を示している。

そこで、*swsn-6* 変異体で *ceh-22* 遺伝子の発現を観察したところ、*bet-1* 変異体と同様に *ceh-22* 遺伝子の異所発現がみられた。この事から、BET-1 や HTZ-1 の場合と同様に、CeBAF 複合体も SWSN-6 を介して、*ceh-22* 遺伝子の転写抑制を制御している事が示唆された。

また、*bet-1* 変異体では DTC の過剰形成以外に、産卵口の誘導に必要な細胞 Anchor cell (AC) の過剰形成も引き起こされる。そこで、*ham-3* 及び *swsn-6* が AC の形成の抑制に関与している可能性も検討した。その結果、*swsn-6* 変異体では、AC の過剰形成がみられた。これに対し、*ham-3* は単独の変異では

AC の過剰形成を引き起こさなかった。しかし、DTC の系で *ham-3* は *bet-1* 変異体の表現型を増強する事から、AC の系でも二つの遺伝子とその様な関係にある可能性を検討した。その結果、*ham-3* 変異を *bet-1* 変異と 2 重変異体にした場合には、*bet-1* の AC の過剰形成の表現型を増強した。これらの結果は、*bet-1* と *hem-3* 及び *swn-6* の関係について、DTC の系と同様の関係が、AC の系でも保たれている事を示している。AC の形成には二つの AC/VU 細胞間の LIN-12/Notch を介した側方抑制が関与しており、*bet-1*、*hem-3* 及び *swn-6* と LIN-12/Notch シグナル伝達系との間に何らかの相互作用がある可能性も考えられる。

さらに、*swn-6* と *bet-1* の遺伝学的な関係を明らかにするために、*swn-6 bet-1* 二重変異体の表現型を解析した。その結果、*swn-6 bet-1* 二重変異体で AC の過剰形成の表現型を示す個体の割合は、*swn-6* 変異体のそれと有意差がなかった事から、*swn-6* と *bet-1* は同一の遺伝的経路で働いている事が明らかとなった。この事から、*ham-3* と *swn-6* は共に CeBAF 複合体の調節因子をコードしながら、*swn-6* は *bet-1* と同一の遺伝的経路で、*ham-3* は異なる遺伝的経路で働いている事が明らかとなった。

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 3 件)

Yukimasa Shibata, Hitoshi Sawa and Kiyoji Nishiwaki, HTZ-1/H2A.z and MYS-1/MYST HAT act redundantly to maintain cell fates in somatic gonadal cells through repression of *ceh-22* in *Caenorhabditis elegans*, *Development*, 査読あり, 141 巻. 2014, 209-218, doi: 10.1242/dev.090746.

Hon-Song Kim, Yuko Kitano, Masataka Mori, Tomomi Takano, Thomas Edward Harbaugh, Kae Mizutani, Haruka Yanagimoto, Sayaka Miwa, Shinji Ihara, Yukihiko Kubota, Yukimasa Shibata, Kohji Ikenishi, Gian Garriga, and Kiyoji Nishiwaki, The Novel Secreted Factor MIG-18 Acts with MIG-17/ADAMTS To Control Cell Migration in *Caenorhabditis elegans*, *Genetics*, 査読あり, 196 巻. 2014, 471-479, doi: 10.1534/genetics.113.157685.

Yukimasa Shibata, Masahiro Uchida, Hisako Takeshita, Kiyoji Nishiwaki, Hitoshi Sawa, Multiple functions of PBRM-1/Polybromo- and LET-526/Osa-containing chromatin remodeling complexes in *C. elegans* development,

Developmental Biology, 査読あり, 361 巻, 2012, 349-357, 10.1016/j.ydbio.2011.10.035

[学会発表](計 7 件)

Yukimasa Shibata, Hitoshi Sawa, Kiyoji Nishiwaki, HTZ-1/H2A.z maintains cell fates through transcriptional repression in an H3K27me-independent manner, 19th International C. elegans Meeting, 2013 年 6 月 27 日, University of California (Los Angeles)

Yukimasa Shibata, Hitoshi Sawa, Kiyoji Nishiwaki, HTZ-1/H2A.z maintains cell fates through transcriptional repression in an H3K27me-independent manner, 第 35 回日本分子生物学会, 2012 年 12 月 13 日, 福岡国際会議場、福岡県

Yukimasa Shibata, Hitoshi Sawa, Kiyoji Nishiwaki, HTZ-1/H2A.z maintains the fates of somatic gonadal cells through the repression of *ceh-22/Hox* in an H3K27me-independent manner, 5th East Asia C. elegans Meeting, 2012 年 06 月 29 日, Chientan Youth Activity Center、台湾

Yukimasa Shibata, Hitoshi Sawa, Kiyoji Nishiwaki, HTZ-1/H2A.z maintains the fates of somatic gonadal cells through the repression of *ceh-22/Hox* in an H3K27me-independent manner, Joint meeting of JSDB 45th and JSCB 64th, 2012 年 05 月 31 日, 神戸国際会議場、神戸市

柴田 幸政、澤 斉、西脇 清二、*C. elegans* H2A.z はホメオボックス遺伝子 *ceh-22* の発現抑制を介して生殖巣リーダー細胞運命を抑制する、第 3 4 回分子生物学会、2011 年 12 月 15 日、パシフィコ横浜(横浜)

Yukimasa Shibata, Hitoshi Sawa, Kiyoji Nishiwaki, The histone acetylation, methylation, and H2A.z are involved in the maintenance of cell fates in *C. elegans*, 18th International C. elegans Meeting, 2011 年 6 月 24 日, University of California (Los Angeles)

柴田 幸政、澤 斉、西脇 清二、細胞運命の維持における、アセチル化ヒストン結合蛋白 BET-1 とヒストンバリエント H2A, .z による転写調節、第 4 4 回発生生物学会、2011 年 5 月 20 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

柴田 幸政 (SHIBSATA, Yukimasa)

関西学院大学・理工学研究科・博士研究員
研究者番号：80314053