様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　３１　日現在

機関番号：　８２４０１
研究種目：　基盤研究(B)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６２９１００６

研究課題名（和文）クロマチン高次構造と転写制御

研究課題名（英文）High-dimensional structure of chromatin and transcription regulation

研究代表者
石井　俊輔（Ishii, Shunsuke）

国立研究開発法人理化学研究所・石井分子遺伝学研究室・上席研究員

研究者番号：００１２４７８５

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　12,800,000円

研究成果の概要（和文）：　クロマチンの高次構造は、転写制御に重要な役割を果たしている。クロマチンはセントロメアやテロメア近傍のヘテロクロマチンとそれ以外のユークロマチンに大別できる。私達はATF2ファミリー転写因子の１つATF7が、ヒストンH3K9トリ及びジメチル化酵素を標的遺伝子に運ぶことにより、動物細胞のヘテロクロマチン形成に関与すること、ATF7がストレスよりp38でリン酸化されるとヘテロクロマチンが壊れ、転写が誘導されること、この影響は長期間持続することを見出した。このようにATF7は、ストレスによるクロマチンの高次構造の制御に重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の概要（英文）：High-dimensional structure of chromatin has an important role for transcription regulation. Chromatin consists of the heterochromatin, which is localized close to the centromere and telomere, and the euchromatin. We found that ATF7 contributes to heterochromatin formation by recruiting histone H3K9 methyltransferases, and that the stress-induced phosphorylation of ATF7 by p38 causes the disruption of heterochromatin and transcriptional induction. This effect was maintained for long period. Thus, it was shown that ATF7 plays an important role for regulation of the high-dimensional structure of chromatin.

研究分野：　分子生物学

キーワード：　ヘテロクロマチン　ATF7　ストレス　エピゲノム変化

１．研究開始当初の背景

ゲノムワイドな解析から、ヘテロクロマチンのように固く、転写が不活発なドメイン領域がユークロマチン領域にも存在することが示され、このようなクロマチン高次構造が遺伝子発現制御にどのような役割を果たすのかに興味が集まっている。私達はATF2 ファミリー転写因子がヘテロクロマチン形成に関与すること、そして様々なストレスにより ATF2 ファミリー転写因子がストレス応答性リン酸化酵素によりリン酸化されると、ヘテロクロマチン構造が壊れ、転写が誘導されることを、ショウジョウバエを用いて示すことができた。本研究では、この知見を基に「クロマチン高次構造と転写制御との関連」を明らかにしたい。

２．研究の目的

個々の転写制御因子による転写制御メカニズムについては、これまでにかなり詳細な解析が行われてきた。しかしクロマチン高次構造との関連については不明な点が多い。本研究では、私達が同定した ATF2 ファミリー転写因子がどのようにクロマチン高次構造を制御し、それが転写制御とどのように関連するかを解析する。具体的には、動物細胞の ATF2 ファミリー転写因子メンバーである ATF7 がヘテロクロマチン形成に関与するか、どのような遺伝子を制御して、どのような生理機能を有するか、またテロメア長の制御との関連について研究する。

３．研究の方法

ヘテロクロマチン形成における ATF7 の役割を明らかにするため、以前に私達が作製した ATF7 変異マウスから胎仔線維芽細胞を調製し、野生型細胞と比較した。ヘテロクロマチンの検出は、抗ヒストン H3K9me3 抗体や抗メチル化 DNA 抗体による免疫染色や qChIP を用いた。ATF7 の生理的役割を解析するために、ATF7 変異マウスの表現型を色々な角度から野生型マウスと比較した。マクロファージにおける ATF7 の役割を解析するため、野生型及び ATF7 変異マウスから腹腔マクロファージを分離し、FACS を用いた種々の活性化マーカーの定量、アレイを用いたトランスクリプトーム解析、種々の抗体を用いた qChIP 解析、培養系における Toll 様受容体リガンドによる活性化実験などを行った。テロメア長の制御における ATF7 の役割を解析するために、テロメアの長さを Q-FISH、Q-PCR、Southern 法により測定し、テロメア上の ATF7 やテロメラーゼの定量を、ChIP-Slot blot ハイブリダイゼーションにより行った。

４．研究成果

i）動物細胞ヘテロクロマチン形成におけるATF7の役割

クロマチン構造は、セントロメアやテロメア近傍のヘテロクロマチンとそれ以外のユークロマチンに大別できる。ヘテロクロマチンはDNAメチル化やヒストンH3K9トリメチル化に富み、転写が不活発であり、他方ユークロマチン領域の遺伝子は活発に転写される。しかしユークロマチン領域にもヘテロクロマチン領域が散在していることが知られている。ヘテロクロマチンの形成には、siRNAやpiRNAなどのsmall RNA 産生メカニズムが関与し、また分裂酵母やショウジョウバエではATF2ファミリー転写因子が関与するメカニズムが存在する。動物細胞のヘテロクロマチン形成におけるATF2ファミリー転写因子の役割と、その標的遺伝子について一連の解析を行った。ATF2ファミリー転写因子の１つであるATF７欠損マウスから胎仔線維芽細胞を調製し、ヘテロクロマチン構造を解析した。その結果、ATF7

欠損細胞では、ヘテロクロマチン構造が顕著に壊れていること、ATF7はH3K9トリメチル化酵素 Suv39h1、及びH3K9ジメチル化酵素G9aと直接結合すること、炎症性サイトカインTNF-αなどの刺激によりATF7がp38でリン酸化されると、ATF7がヘテロクロマチンからはずれ、ヘテロクロマチン構造が壊れることが示された。このように、ATF7は動物細胞のヘテロクロマチン形成に関与し、ストレスなどの環境因子によるヘテロクロマチン構造の制御に関与することが示された。さらにATF７欠損マウスの表現型解析から、ATF7が脂肪細胞分化や代謝系の遺伝子に直接結合し、これらの遺伝子をヘテロクロマチン化して転写を抑制すること、栄養条件などの様々な環境因子によりATF7がリン酸化されると、これらの遺伝子のヘテロクロマチンが壊れ、転写が誘導されることが示された。

ii）ヘテロクロマチン形成因子ATF7の生理的役割

ATF7 変異マウスではマクロファージがある程度活性化していることを見出し、自然免疫において重要な役割を果たすマクロファージのクロマチン構造と転写制御における ATF7 の役割ついて解析した。ATF2 ファミリー転写因子の１つである ATF７は、マクロファージにおいて多くの自然免疫系に直接結合すること、ヒストン H3K9 ジメチル化酵素 G9a を標的遺伝子にリクルートし、ヘテロクロマチン様の構造を形成し、転写抑制状態を維持することを明らかにした。さらに病原体感染により、マクロファージ表面の Toll 様受容体を介してストレス応答性リン酸化酵素 p38 が活性化されると、ATF7 がリン酸化され、クロマチンから遊離し、H3K9me2 レベルが低下し、転写が誘導されることを見出した。そして、その後長期間、H3K9me2 レベルは完全には元に戻らず、basal な発現レベルの高い状態が持続し、これにより病原体への抵抗性が上昇する。このように ATF7 はマクロファージでの、クロマチン構造形成を介した転写制御、自然免疫系の記憶に重要な役割を果たすことが示された。

また、ATF7 ノックアウトマウスは一見正常であるが、代謝系にいくつかの異常が認められた。ATF7 ノックアウトマウスは野生型に比べ、体が少し小さく、太りにくいことが示された。また、血清中のトリグリセリドや脂肪組織が野生型に比べ少なく、インスリン感受性が高かった。さらに高脂肪餌を与えると、エネルギー消費も高いことが示された。以上の結果から、ATF7 は脂肪組織の分化や機能に重要な役割を果たすことが示され、肥満やインスリン抵抗性の創薬ターゲットになりうることが示された。

iii）テロメアの長さ制御におけるATF7の役割

一連の研究からATF2ファミリー転写因子の１つであるATF7がテロメアの長さの制御に関与することを明らかにした。ATF7変異マウスの胎仔線維芽細胞（MEFs）のテロメアの長さは、野生型細胞に比べ有意に短いことが示された。ATF7はKu複合体及びトレメラーゼと複合体を形成し、Kuを介してテロメア上にテロメラーゼを運び、テロメアを伸長させる機能を持っていた。さらに精神ストレスにより誘導される炎症性サイトカインTNF-αをマウスに投与すると、ATF7がp38でリン酸化され、ATF7とテロメラーゼがテロメアから遊離し、テロメア短縮が誘導されることが分かった。このようにクロマチン高次構造に重要な役割を果たすテロメアの長さを制御するユニークなメカニズムを明らかにすることができた。

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　11　件）

1. Padavattan S, Thiruselvam V, Shinagawa T, Hasegawa K, Kumasaka T, Ishii S & Kumarevel T: Structural analyses of the nucleosome complexes with human testis-specific histone variants, hTh2a and hTh2b. ***Biophys Chem.*** 221, 41-48, 2017. doi: 10.1016/j.bpc.2016.11.013.査読有り
2. Liu Y, Maekawa T, Yoshida K, Furuse T, Kaneda H, Wakana S & Ishii S: ATF7 ablation prevents diet-induced obesity and insulin resistance. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 478, 696-702, 2016. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.009. 査読有り
3. Yoshida K, Maekawa T, Zhu Y, Renard-Guillet C, Chatton B, Inoue K, Uchiyama T, Ishibashi K, Yamada T, Ohno N, Shirahige K, Okada-Hatakeyama M & Ishii S: The transcription factor ATF7 mediates lipopolysaccharide-induced epigenetic changes in macrophages involved in innate immunological memory. ***Nat Immunol.*** 16, 1034-1043, 2015. doi: 10.1038/ni.3257. 査読有り
4. Padavattan S, Shinagawa T, Hasegawa K, Kumasaka T, Ishii S & Kumarevel T: Structural and functional analyses of nucleosome complexes with mouse histone variants TH2a and TH2b, involved in reprogramming. ***Biochem Biophys Res Commun.*** 464, 929-935, 2015. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.07.070. 査読有り
5. Choi JK, Zhu A, Jenkins BG, Hattori S, Kil KE, Takagi T, Ishii S, Miyakawa T & Brownell AL: Combined behavioral studies and in vivo imaging of inflammatory response and expression of mGlu5 receptors in schnurri-2 knockout mice. ***Neurosci Lett.*** 609, 159-164, 2015. doi: 10.1016/j.neulet.2015.10.037. 査読有り
6. Yoshida K, Renard-Guillet C, Inoue K, Shirahige K, Okada-Hatakeyama M & Ishii S: Microarray expression analysis of genes involved in innate immune memory in peritoneal macrophages. ***Genomics Data*** 7, 90-91, 2015. doi: 10.1016/j.gdata.2015.11.028. 査読有り
7. Liu B, Maekawa T & Ishii S: *In utero* TNF-α treatment induces telomere shortening in young adult mice in an ATF7-dependent manner. ***FEBS Open Bio.*** 6, 56-63, 2016. doi: 10.1002/2211-5463.12006. 査読有り
8. Huynh ML, Shinagawa T & Ishii S: Two histone variants TH2A and TH2B enhance human iPS cell generation. ***Stem Cells Dev.*** 25, 251-258, 2016. doi: 10.1089/scd.2015.0264. 査読有り
9. Makino S, Zhulyn O, Mo R, Puviindran V, Zhang X, Murata T, Fukumura R, Ishitsuka Y, Kotaki H, Matsumaru D, Ishii S, Hui CC, Gondo Y. T396I mutation of mouse Sufu reduces the stability and activity of Gli3 repressor. ***PLoS One.*** 10, e0119455, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.0119455. 査読有り
10. Shinagawa T, Huynh LM, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Kwak HG, Dohmae

N, Noguchi J, Ishii S. Disruption of Th2a and Th2b genes causes defects in spermatogenesis. ***Development.*** 142, 1287-92, 2015. doi: 10.1242/dev.121830. 査読有り

11. Shinagawa T, Takagi T, Tsukamoto D, Tomaru C, Huynh LM, Sivaraman P, Kumarevel T, Inoue K, Nakato R, Katou Y, Sado T, Takahashi S, Ogura A, Shirahige K & Ishii S: Histone variants enriched in oocytes enhance reprogramming to induced pluripotent stem cells. ***Cell Stem Cell*** 14, 217-227, 2014. doi: 10.1016/j.stem.2013.12.015. 査読有り

〔学会発表〕(計 10 件)

1. Ishii S: Innate immune memory in macrophages via ATF7-dependent epigenetic changes. Conference on Innate Immune Memory, Hinxton, Cambridge, UK, March 14-16, 2017.
2. Yoshida K, Ishii S: Analysis for trans-generational inheritance of epigenetic change induced by pathogen infection via ATF7. Conference on Innate Immune Memory, Hinxton, Cambridge, UK, March 14-16, 20172017.
3. 石井俊輔:精子を介したエピゲノム情報の伝達、ワークショップ「染色体研究の最前線」、大阪大学、大阪、1月17～18日、2017.
4. 石井俊輔:環境要因によるエピゲノム変化の世代を超えた遺伝、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、千里ライフサイエンスセンター、大阪、5月19～20日、2016.
5. 吉田圭介、石井俊輔:低タンパク質餌によるエピゲノム変化の世代を超えた遺伝、第10回日本エピジェネティクス研究会年会、千里ライフサイエンスセンター、大阪、5月19～20日、2016.
6. 石井俊輔:Epigenome changes induced by environmental factors and their memory.
第38回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、神戸、12月1～4日、2015.
7. Liu B, Maekawa T, Ishii S: TNF-α treatment in fathers programs telomere shortening in mouse offspring. 第 38 回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、神戸、12 月 1～4 日、2015.
8. 前川利男、Binbin Liu、吉田圭介、仲村賢一、田久保海誉、石井俊輔:転写因子 ATF-7 を介したストレスによるテロメアの長さの制御、第 37 回に本分子生物学会年会 2014/11/25～27、パシフィコ横浜、横浜、11 月 25～27 日、2014.
9. 成耆鉉、石井俊輔:父親への拘束ストレスによるエピゲノム変化と遺伝の解析、第 37 回に本分子生物学会年会 2014/11/25～27、パシフィコ横浜、横浜、11 月 25～27 日、2014.
10. 品川敏恵、Huynh Linh My、高木豪、塚本大輔、都丸千夏、野口純子、石井俊輔:精子形成におけるヒストンバリアント TH2A と TH2B の役割、第 37 回に本分子生物学会年会 2014/11/25～27、パシフィコ横浜、横浜、11 月 25～27 日、2014.

〔その他〕
ホームページ等
http://rtcweb.rtc.riken.jp/lab/mg/mg.html

６．研究組織
(1)研究代表者
石井　俊輔（ISHII SHUNSUKE）

国立研究開発法人 理化学研究所
石井分子遺伝学研究室・上席研究員
研究者番号：00124785