

研究報告書

「ヒストン H3K36 メチル化酵素 Whsc1 による核構造体を介した新規転写制御機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 浦 聖恵

1. 研究のねらい

酵母からヒトに至るまで、すべての真核生物のゲノム DNA は、ヒストンタンパク質と結合してクロマチンを形成し、例えばヒトでは 1 細胞当たり 2m にもおよぶ DNA が直径約 10 μ m の核に折り畳まれて存在する。従ってクロマチンの修飾状態は、転写や DNA 修復など DNA 上で起こるあらゆる反応(DNA 代謝反応)の制御に密接に関わっている。近年、アセチル化やメチル化など様々なヒストン修飾酵素が同定され、さらにゲノムワイドに、ヒストン修飾状態が因子の結合や転写産物 RNA の情報とあわせて解析されるようになった。その結果、単純に遺伝子の転写活性化状態を正か負に 2 分する従来の転写制御モデルでは説明できない、転写開始から伸長・終結までを共役させながら進行する核構造体の存在が示唆される。エピジェネティクス制御を真に理解するためには、この既存の概念を越えた未知の転写制御機構の解明が欠かせない。そこで、種を越えて進行中の転写活性領域に分布を示すが、転写との直接の繋がりが未だに判然としないヒストン H3.36 番目リシン残基のメチル化(H3K36me)に着目した。ヒストン H3K36me は酵母では唯一 Set2 によって担われており、ヒトやマウスでは 5 つの Set2 類似タンパク質が同定されている。Whsc1 はその一つで、これまでに遺伝子欠損マウスを作製して、ヒト 4 番染色体片アレル欠損によって発症する発育不良、形態異常、精神遅滞そして免疫欠損を特徴とする 4p 症候群の主要な原因遺伝子であることを突き止めた(図 1)。本研究では、独自に同定した H3K36me 修飾酵素 Whsc1 の機能解析から、新しい転写制御機構の概念を導き出すことにある。



図1. Whsc1欠損マウス

2. 研究成果

(1) 概要

Whsc1 遺伝子のホモ欠損マウスは、胎性中期から様々な程度の成長遅延を示して出生直後に大半が死亡する。また、Whsc1 欠損 ES 細胞は、未分化状態では野性型に比べて細胞形態、増殖に何ら異常が認められないが、分化誘導に伴って増殖抑制が認められる。さらに Whsc1 欠損 MEF 細胞の解析からも Whsc1 が DNA 損傷応答に関与することが示唆され、DNA 二本鎖切断応答に関与する因子と複合体を形成することが明らかになった。しかし、通常の DNA 損傷応答因子と異なって、レーザー照射などによる外因性の DNA 二本鎖切断に対して、損傷部位への集積も、遺伝子欠損による DNA ストレス感受性の上昇も認められない(Hartlerode A. et al. 2012)。そこで Whsc1 が転写活性領域にプログラムされた DNA 損傷応答に特異的に関与し、転写と DNA 損傷応答を分子共役させる新規の転写制御仮説に至った。

この仮説を検証するために、プログラムされた DNA 切断・遺伝子再構成を伴って分化する

ユニークな組織であるリンパ球 B 細胞に着目して、Whsc1 の機能解析を試みた。まず造血幹細胞を含む胎仔の肝臓細胞の骨髄移植解析から、Whsc1 欠損によって、B 細胞分化が抑制されることが明らかになった。さらに造血幹細胞の ex vivo B 細胞分化系実験から、B 細胞分化が抑制は、細胞分化に伴う V(D)J 遺伝子再構成 (V(D)J recombination) と呼ばれるゲノム再編成の異常によることが判明した。

造血幹細胞をB細胞に分化させる過程で時間を追ってDNAの傷を調べた所、分化誘導後、一過性にDNA二本鎖切断の集積が認められた。以上結果から、Whsc1はランダムにゲノムに形成された損傷修復には関与しないが、Igh遺伝子座のように転写が活性化された特定の遺伝子座において形成されるプログラムされたDNA二本鎖切断修復に積極的に機能すると結論し、ヒストンメチル化酵素Whsc1を介した新規の“転写-DNA損傷修復共役”機構をここに提唱する。

(2) 詳細

2-1. Whsc1 欠損個体、欠損細胞観察から新規の転写制御仮説の樹立

Whsc1 遺伝子のホモ欠損マウスは、胎性中期から様々な程度の成長遅延を示して出生直後に大半が死亡する。しかも Whsc1 遺伝子はハプロ不全¹を示し、ヘテロ欠損マウスの1割ほどで、著しい成長遅延や骨形成異常、さらに感染症や脾臓細胞数の減少などのリンパ球系の異常が認められた。一方、Whsc1 欠損 ES 細胞は、未分化状態では野生型に比べて細胞形態、増殖に何ら異常が認められないが、分化誘導に伴って増殖抑制が認められる(図 2)。



図2. Whsc1欠損によるES細胞胚様態の成長阻害

さらに Whsc1 欠損 MEF 細胞の解析からも Whsc1 が DNA 損傷応答に関与することが示唆され、DNA 二本鎖切断応答に関与する因子と複合体を形成することが明らかになった。しかし、通常の DNA 損傷応答因子と異なって、薬剤やレーザー照射などによる外因性の DNA 二本鎖切断に対して、損傷

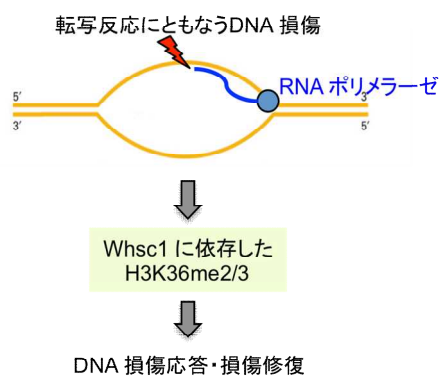


図3. ヒストンK3K36メチル化酵素による転写-DNA損傷応答の共役モデル

部位への集積も、遺伝子欠損による DNA スレス感受性の上昇も認められない(Hartlerode A. et al. 2012)。Whsc1 が担う H3K36me は転写活性領域に分布することから、Whsc1 が転写活性領域にプログラムされた DNA 損傷応答に特異的に関与し、転写と DNA 損傷応答を分子共役させる新規の転写制御仮説を構築するに至った(図 3)。

2-2. Whsc1 によるプログラムされた DNA 二本鎖

切断応答

図 3 のモデルを検証するために、プログラムされた DNA 切断・遺伝子再構成を伴って分化するユニークな組織であるリンパ球 B 細胞に着目して、Whsc1 の機能解析を試みた。まず、遺伝子欠損マウスは出生直後に致死のため、造血幹細胞を含む胎仔の肝臓細胞を野生型成体マウスの骨髄に移植して、4ヶ月経過したマウスの末梢血、骨髄、脾臓、胸腺の細胞解析を行っ

た。その結果、*Whsc1* 欠損細胞移植マウスでは特に B 細胞の比率が末梢血で低下し、骨髄では、分化段階を追って次第に B 細胞の数が減少して最終的に抗体発現が低下することが明らかになった。造血幹細胞からの B 細胞分化過程では、免疫グロブリン遺伝子座(重鎖: *Igh* 遺伝子座、軽鎖: *Igk* および *Igl* 遺伝子座)でプログラムされた DNA 二本鎖切断・連結反応が起こる。この V(D)J 遺伝子再構成(V(D)J recombination)と呼ばれるゲノム再編成によって、多様な抗体生産を可能にして生体を防御している。*Igh* 遺伝子座では遺伝子座が転写活性化されてから、V(D)J 遺伝子再構成が起こり、タンパクをコードした RNA が転写され免疫グロブリン重鎖タンパク質を合成する(図 4)。

Whsc1 が B 細胞分化に果たす機能を明らかにするために、胎仔の肝臓細胞から造血幹細胞を単離して *ex vivo* で B 細胞分化培養を行って、遺伝子発現および V(D)J 遺伝子再構成を詳細に調べた。その結果、*Whsc1* 欠損によって、*Igh* 遺伝子座の活性化や、B 細胞分化を誘導する因子の発現はほとんど影響を受けないが、V(D)J 遺伝子再構成が滞ってアポトーシスが誘導されることが判明した。そこで、V(D)J 遺伝子再構成がすでに完了した免疫グロブリン遺伝子座を *Whsc1* 欠損マウスに導入したマウスを作製したところ、*Whsc1* 欠損による B 細胞分化異常が野生型と同じレベルにまで回復した。

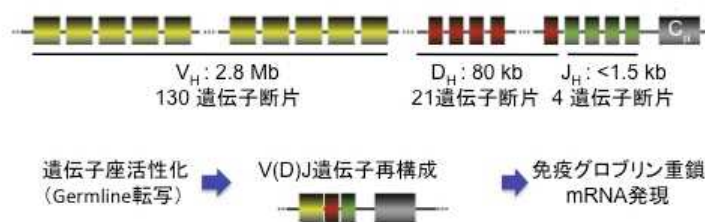


図4. マウス *Igh* 遺伝子座における転写と遺伝子再構成

以上の結果から、*Whsc1* が V(D)J 遺伝子再構成における DNA 切断や修復など、直接 DNA 代謝反応に関与するか、あるいは DNA 切断応答に関与すると考えられる。造血幹細胞を B 細胞に分化させる過程で時間を追って DNA の傷を調べた所、分化誘導後、一過性に DNA 二本鎖切断の集積が認められた。従って、*Whsc1* はランダムにゲノムに形成された損傷修復には関与しないが、*Igh* 遺伝子座のように転写が活性化された特定の遺伝子座において形成されるプログラムされた DNA 二本鎖切断修復に積極的に機能すると結論した。

転写活性化に伴って DNA 二重鎖はほどけて DNA 損傷の危険は高まる。高等真核生物ではこのような転写反応によって導かれる内在性の DNA 損傷を通常のランダムに生じる DNA 二重鎖機構と異なる機構で H3K36メチル化酵素 *Whsc1* を介して修復する新規の“転写-DNA 損傷修復共役”機構をここに提唱する(図5)。

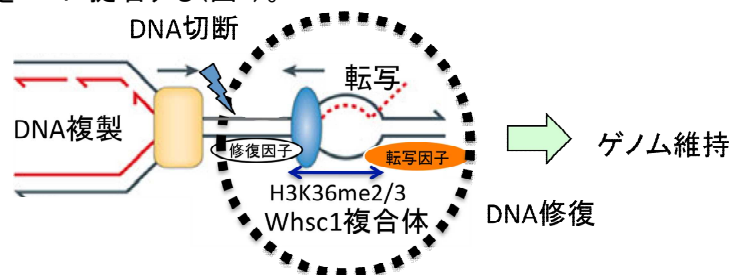


図5. ヒストンメチル化酵素 *Whsc1* を介した転写-DNA 損傷修復共役モデル
 転写活性化に伴う内在性の DNA 損傷修復に *Whsc1* は機能する。転写ファクターはゲノム維持ファクターでもあるのかもしれない。

3. 今後の展開

本研究により、ヒストンH3K36メチル化酵素によって転写とDNA修復を分子共役させて、遺伝子コード領域のゲノム維持を保証する新規のDNA代謝機構の存在が示唆された(図5)。ヒストンメチル化の機能など、具体的な分子機構を明らかにするためには複合体の解析など、まだ行うべき多くの研究が残されている。しかし、転写活性領域をマークするように分布するヒストン修飾酵素が、DNA修復を担うことを示す本知見は、古くから転写ファクトリーとよばれてきた転写活性化領域の核構造体の概念に変化をもたらすものである。それは、転写とゲノム維持の両機能を備えた高次複合体なのではないだろうか。ゲノム進化の視点からも今後、転写制御をDNA損傷修復、更にはDNA複製を含めたあらゆるDNA代謝反応を考慮して研究を進める必要がある。

これまで転写の制御因子とDNA修復因子を分離して研究が進められて来た。そしてDNA損傷・修復の分野では強い放射線照射や薬剤処理によって生じる外因性のDNAの傷に対する細胞応答の研究が盛んに行われて来た。私達のゲノムDNAはこのような強いDNAストレスを外から与えなくても、細胞の内在的な営みで絶えず傷つき、修復してゲノムを維持している。Whsc1はB細胞以外に広く発現していることから、様々な細胞の内在性のDNA損傷修復を担うことが予想される。高齢化に伴って、癌や、老化に対する社会の関心が高まっているが、ヒストンH3K36メチル化酵素の研究は、その根底にあるゲノム維持機構の解明に向けた突破口に発展することが期待される。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

当初、Whsc1の機能解析を、心臓特異的な転写因子Nkx2.5との協調的な転写制御に着目し、ES細胞の心筋細胞への分化系で解析する予定で研究をスタートした。Whsc1欠損ES細胞では、野生型に比べて分化誘導後の増殖異常や拍動心筋細胞の出現の遅れなど、異常は認められたが、心筋細胞への分化効率の低さ、さらに個体レベルでの異常の複雑さの問題から、Whsc1の分子機能の探究には不適切であると判断し、着目すべき分化異常を再検討した。これまでのヒストン修飾酵素の機能解析を越えて、転写制御に新しい概念を導く研究を目指して、核構造への関与を意識して様々なex vivo培養系を摸索した。例えばES細胞におけるWhsc1複合体に含まれるhnRNPが網膜細胞のヘテロクロマチン形成に関与することに着目してex vivo網膜細胞分化系でWhsc1の関与を検討した。が、なかなか期待に応える明確な分化異常を示す実験系が見出せずにいた。その問題の第一は、個体および細胞レベルでWhsc1欠損による分化異常のばらつきが大きい点にあった。その問題点から遺伝子欠損によって細胞運命が変換するよりむしろ、ストレス応答によって間接的に個体差の大きな分化異常を示すのではないかと考えるに至り、転写とDNA損傷修復の分子共役を意識したB細胞分化に着目した研究に軌道修正することになった。この軌道修正に長い時間を費やした点は反省される。が、これまで数多くなされたヒストン修飾酵素欠損による個体発生・分化の異常を、安易に数個の遺伝子発現変動をピックアップして、曖昧に議論して来た現状を打破するためには、重要な研究過程であったと考える。新規の転写制御機構の解明を目指し、再構成クロマチン系を用いた実証には本

研究期間内に到達できなかったが、転写制御の枠を越えたDNA代謝制御に研究に広げることができた点を高く自己評価する。世界に先駆けて、エピゲノム制御あるいは核構造体を介した転写制御の根底に、DNA複製やDNA損傷修復などのゲノム維持機構が存在することを示しつつあることに、達成感を感じている。今後、見出した新領域から確固たる成果を継続して積上げるように励みたい。現代社会が直面している老化や発癌のエピゲノム研究をリードして行きたい。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

Whsc1が転写活性領域に分布し、転写活性領域にプログラムされたDNA損傷応答に特異的に関与し、転写とDNA損傷応答を共役させるという新規のDNA代謝制御仮説を提唱した。仮説の検証のために、リンパ球B細胞に着目してWhsc1の機能解析を試み、その結果、Whsc1の欠損によりB細胞分化が抑制され、抑制の原因は細胞分化に伴う組換え修復異常によることが明らかになった。また、Whsc1ノックアウトによる増殖阻害がp53ノックアウトで解除されることを見出し、Whsc1が内在性のDNA損傷に対処するための分子であることを示した。当初研究の方向性に関し紆余曲折はあったが、焦点が絞られてその機能に迫りつつあるのは評価できる。しかしまだおさえるべき点が多々ある。転写制御に伴う内在性のDNA損傷修復に関して、ゲノム損傷への影響が間接的なものである可能性が排除できないこと、B細胞以外での機序が未解明なこと、ヒストンメチル化の機能など、具体的な分子機構を明らかにするためには複合体の解析が必要なことなど、もう少し抑える重要なポイントがあるような印象を持っている。提案に新規性があるので今後の発展に期待したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Kashiwagi K., Nimura K., Ura K. and Kaneda Y. DNA methyltransferase 3b preferentially associates with condensed chromatin. *Nucleic Acids Res.*, 39, 874–888, 2011
2. Hartlerode A., Guan Y., Rajendran A., Ura K., Schotta G., Xie A., Shah J. and Scully R. Impact of histone H4 lysine 20 methylation on 53BP1 responses to chromosomal double strand breaks, *PLoS ONE*, 7, e49211, 2012
3. Shirakawa T., Yaman-Deveci R., Tomizawa S., Kamizato Y., Nakajima K., Sone H., Sato Y., Sharif J., Yamashita A., Takada-Horisawa Y., Yoshida S., Ura K., Muto M., Koseki H., Suda T., Ohbo K. An epigenetic switch is crucial for spermatogonia to transition from an undifferentiated Kit-negative to a differentiating Kit-positive identity. *Development*, 140, 3565–3576, 2013.
4. Sarai N., Nimura K., Tamura T., Kanno T., Patel M.C., Heightman T. D., Ura K. and Ozata K. WHSC1 links transcription elongation to HIRA-mediated histone H3.3 deposition in activated genes. *EMBO J.*, 32, 2392–2406, 2013

5. Machida S., Takaku M., Ikura M., Sun J., Suzuki H., Kobayashi W., Kinomura A., Osakabe A., Tachiwana H., Horikoshi Y., Fukuto A., Matsuda R., Ura K., Tashiro S., Ikura T., Kurumizak H. Nap1 stimulates homologous recombination by RAD51 and RAD54 in higher-ordered chromatin containing histone H1. *Sci. Rep.* 4, 4863, 2014

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

主要な学会発表

- ・ 浦 聖恵“ヒストン H3K36 メチル化酵素による転写制御と疾患”日本分子生物学会第10回春期シンポジウム, 松島, 2010, 6. (招待講演)
- ・ 浦 聖恵 “再構成クロマチンから疾患モデルマウスを用いたヒストン多種多様性の生物学的意義の探求” 構造エピジェゲノム研究会第3回ワークショップ, 横浜, 2011,4. (招待講演)
- ・ Ura K. “A histone H3 lysine 36 methyltransferase links developmental transcription factors to Wolf-Hirschhorn syndrome.” International Symposium on the Physicochemical Field for Genetic Activities, 淡路島, 2011, 1. (招待講演)
- ・ Ura K. “Role of histone methylation and histone variants in developmental gene regulation.” CDB Symposium 2011, 神戸, 2011, 3. (招待講演)
- ・ 浦 聖恵 “再構成クロマチンから疾患モデルマウスを用いたヒストン多種多様性の生物学的意義の探求” 構造エピジェゲノム研究会第3回ワークショップ, 横浜, 2011, 4. (招待講演)
- ・ 浦 聖恵 “ヒストンの多種多様性を介したエピジェネティック制御” 第5回日本エピジェネティクス研究会年会シンポジウム, 熊本, 2011, 5. (招待講演)
- ・ Ura K. “Regulation and Function of Histone Diversity in Development and Disease.”第11回日本蛋白質科学会年会ワークショップ, 大阪, 2011, 6. (招待講演およびオーガナイザー)
- ・ Ura K. Regulation and Function of Histone Diversity in Development Gene Regulation. 第35回日本分子生物学会, 横浜 2011, 12.
- ・ Ura K. Yokota T, Kajio M, Iwama A and Kaneda Y. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 controls the programmed DNA-damage response during V(D)J recombination” The 8th 3R Symposium, Awaji 2012, 11. (口頭発表選出)
- ・ Ura K. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 controls the programmed DNA-damage response.”第65回日本細胞生物学会、シンポジウム, 2013, 6.
- ・ Ura K. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase Whsc1 links transcription and DNA damage repair.” International Conference, Replication, Repair and Transcription, Kyoto 2014, 2.
- ・ Ura K. Histone H3 lysine 36 methyltransferase controls the programmed DNA-damage respons. 第5回日米DNA修復会議, 鳴門 2014, 10.
- ・ Ura K. “Histone H3 lysine 36 methyltransferase controls the programmed DNA-damage

response.” the 5th meeting of the Asian Forum of Chromosome and Chromatin Biology,
India. 2015