

研究報告書

「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月

研究者: 山口 雄輝

1. 研究のねらい

ヒストンの翻訳後修飾の機能的意義を厳密に証明するには、修飾酵素の逆遺伝学的解析だけでなく、ヒストン自体の逆遺伝学的解析も行う必要がある。しかし、高等真核生物でヒストン遺伝子はマルチジーン化しており、通常のノックアウトやノックダウン法では発現抑制が困難であるため、そうした試みはこれまでほとんど行われてこなかった。(なお、ここで言うヒストンは、H1～H4 までのカノニカルヒストンであり、特殊化した機能をもつバリエーションヒストンは含まない。)私はこれら一群の内在ヒストン遺伝子の発現を一挙に抑制し、外来の変異型ヒストンによって「置き換える」新たな方法を立案した。そこで、計画を実行に移して、ヒストンの逆遺伝学的解析系を確立することを本研究の第一の目標とする。さらに研究の進み具合に応じて、確立された実験系を利用してヒストンのいくつかの修飾残基の点変異体を導入した細胞株を樹立し、それらの機能解析を実施する。

また、ヒストン H2B モノユビキチン化→H3K4 メチル化の所謂 trans-tail 制御についても平行して解析を行う。出芽酵母においては、H2B のモノユビキチン化を阻害すると H3K4 のメチル化が完全に阻害されることが示されている。つまり 2 つの翻訳後修飾の間には厳密な依存性が存在しており、trans-tail 制御の代表例として知られている。しかし私は以前、HeLa 細胞において、このような trans-tail 制御が成り立っていないことを見出した (Chen et al. Genes Dev. 2009)。そうであるならば、ほ乳動物細胞で H2B のモノユビキチン化はどのような役割を果たしているのだろうか。こうした問題意識から、ヒストンの逆遺伝学的解析を行う系を考案した。逆遺伝学的解析の実験系が確立されるまでの間、従来法によって H2B モノユビキチン化の機能解析を行ない、実験系が確立されたら、H2B の K120A 変異体を用いて逆遺伝学的解析を行う。

2. 研究成果

(1) 概要

1000字未満で記載してください。

メインテーマの「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」では、ヒストン mRNA に特異的な 3' プロセシング装置の 1 つである U7 snRNA を標的とすることで、すべてのカノニカルヒストンの発現を一挙にノックダウンして、外来ヒストンで相補することを目指した。まず transient transfection のレポーターアッセイ系で、提案した戦略の実現可能性を検討した。化学修飾したアンチセンスオリゴを用いて U7 snRNA の発現を効率よく抑制することができ、そのとき新規に合成されるヒストンのタンパク質量は予想どおり激減した。レスキュー用の外来ヒストンについては、U7 snRNA が結合する 3' エlement に変異を導入したヒストンの発現コンストラクトを作製した。これを、相補的な変異を持たせた U7 snRNA の発現コンストラクトと

共に cotransfection したところ、外来ヒストンタンパク質の発現を確認できた。以上の結果から、提案した戦略に実現可能性が十分あることが示唆された。

これらの結果を踏まえて次に、安定なノックダウンレスキュー系の確立を目指した。U7 snRNA の働きを安定的に阻害するのに shRNA は使えなかったため、代わりに zinc finger nuclease を用いて、U7 snRNA 遺伝子座への conditional allele のノックインを進めた。一方、外来ヒストン H1~H4 は内在ヒストンに匹敵するレベルで安定的に発現させる必要がある。当初、ヒストン遺伝子の native な配列をなるべく残した発現コンストラクトを用いたが、十分な発現量を得ることができなかつたので、様々なコンストラクトを比較検討した。発現量が最も良かったヒストンの発現コンストラクトを用いて、目的とする細胞株の樹立を進めている。

サブテーマの「哺乳類細胞における H2B モノユビキチン化の機能的役割の解析」では、モノユビキチン化型 H2B (H2Bub) に特異的に結合する因子を SILAC 法により網羅解析した。その結果、Pol II、DSIF、NELF、Integrator、SWI/SNF といった既知の転写・プロセシング関連タンパク質が見つかった。そのうちの一つである Integrator は snRNA の 3' 末端プロセシングを担う因子なので、これらの因子の snRNA 遺伝子上での働きを注目した。ノックダウン ChIP 解析の結果、H2Bub は Integrator を snRNA 遺伝子上にリクルートする働きを持っていることが示唆された。一方、NELF は Integrator とは独立のメカニズムで snRNA のプロセシングを促進していることが示唆された。まとめると、H2Bub の相互作用因子の同定をきっかけにして、H2Bub と転写伸長因子の予期しなかつた役割を明らかにすることができた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発: 第一段階」

ヒストン mRNA に特異的な 3' プロセシング装置の 1 つである U7 snRNA を標的とすることで、すべてのカノニカルヒストンの発現を一挙にノックダウンして、外来のヒストンで相補することを提案した (図 1)。この戦略は「内在 U7 snRNA を消して、内在ヒストンを間接的にノックダウンすること」と「レスキュー用の外来ヒストンを内在ヒストンと同レベルで発現させること」の 2 つに分けられる。まず、この戦略の実現可能性について、それぞれ transient transfection のレポーターアッセイ系で調べた。

化学修飾したアンチセンスオリゴ (ASO) と shRNA の二通りの方法でヒト HeLa 細胞の U7 snRNA をノックダウンしたところ、ASO では効率よくノックダウンできたが、shRNA ではまったくできなかった。後者は、U7 snRNA のような核局在 RNA に対して shRNA がほとんど効かないという過去の報告と一致する結果である。一方、ASO を用いて U7 をノックダウンしたところ、期待したとおり、ヒストン mRNA の 3' プロセシング異常が観察され、新規に合成されるヒストンのタンパク質量は激減した (図 2A)。

| H1 (8) | H2A (18) | H2B (18) | H3 (14) | H4 (15) |
|----------|------------|-----------|----------|----------|
| H1F0 | HIST1H2AA | HIST1H2BA | HIST1H3A | HIST1H4A |
| H1FX | HIST1H2AB | HIST1H2BB | HIST1H3B | HIST1H4B |
| HIST1H1A | HIST1H2AC | HIST1H2BC | HIST1H3C | HIST1H4C |
| HIST1H1B | HIST1H2AD | HIST1H2BD | HIST1H3D | HIST1H4D |
| HIST1H1C | HIST1H2AE | HIST1H2BE | HIST1H3E | HIST1H4E |
| HIST1H1D | HIST1H2AG | HIST1H2BF | HIST1H3F | HIST1H4F |
| HIST1H1E | HIST1H2AH | HIST1H2BG | HIST1H3G | HIST1H4G |
| HIST1H1T | HIST1H2AI | HIST1H2BH | HIST1H3H | HIST1H4H |
| | HIST1H2AJ | HIST1H2BI | HIST1H3I | HIST1H4I |
| | HIST1H2AK | HIST1H2BJ | HIST1H3J | HIST1H4J |
| | HIST1H2AL | HIST1H2BK | HIST2H3A | HIST1H4K |
| | HIST1H2AM | HIST1H2BL | HIST2H3C | HIST1H4L |
| | HIST2H2AA3 | HIST1H2BM | HIST2H3D | HIST2H4A |
| | HIST2H2AA4 | HIST1H2BN | HIST3H3 | HIST2H4B |
| | HIST2H2AB | HIST1H2BO | | HIST4H4 |
| | HIST2H2AC | HIST3H2BB | | |
| | HIST3H2A | HIST2H2BE | | |
| | H2AFJ | HIST2H2BF | | |

図 1. ヒトカノニカルヒストン遺伝子群

一方、レスキュー用の外来ヒストンの発現に関しては当初、native の配列をなるべくそのまま利用しようと考えた。カノニカルヒストンは S 期特異的に大量発現して（細胞周期 1 回あたり 10^7 分子のオーダー）、新規合成 DNA 鎖上に配置される必要があり、この要請を満たすためにヒストン遺伝子固有の 3' プロセシング機構が生まれたと考えられるからである。そこで、異なるエピトープタグを C 末端側に付加した H1~H4 (H1-GluGlu, H2A-VSV,

H2B-V5, H3-Flag, H4-Etag) を、各ヒストンの native プロモーターならびに 3' エLEMENTと連結した発現コンストラクトを作製した。ヒストンの 3' エLEMENTと U7 snRNA が相補的な塩基対を形成することで、ヒストン特異的な 3' プロセシングが進行すると考えられたので、その部分の配列を改変した所謂 altered specificity mutant pair を作製し、それが期待どおりに動くことを確認した。例えば、U7 snRNA(mt2) と H3-Flag(mt2) を cotransfection したときのみ H3-Flag タンパク質が発現することが分かった (図 2B)。

以上の結果から、transient transfection 系では各要素が期待どおりに動くことが分かり、提案した戦略が十分に実現可能なものであることが示唆された。一方、U7 snRNA に shRNA が効かなかったことから、内在 U7 snRNA の働きを安定的に阻害するには他の手法を用いる必要があることが分かった。

研究テーマ B 「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発: 第二段階」

先の結果を受けて、U7 snRNA の機能阻害には、最近普及しつつあるゲノムエンジニアリング法の 1 つである zinc finger nuclease (ZFN) を用いることにした。U7 snRNA 遺伝子は生存に必須と予想されるので、conditional allele のノックインをヒト 293 細胞で目指した。ZFN によって誘導される DNA 二本鎖切断と非相同性末端修復によるフレームシフト変異については容易に確認できたが、ノックインはなかなか成功しなかった。transfection 条件等の最適化を経て、効率は未だ低いものの、片アリの改変には成功した。現在、残るアリの改変を進めている。

レスキュー用外来ヒストンの安定的発現については、上述した「native の配列をなるべく活かしたタグ付きヒストン発現コンストラクト」を利用して、これを内在ヒストンと同様に H1~H4 をそれぞれ 10~20 コピー導入すれば、十分な発現量を確保できると考え、そのような細胞株を樹立した。しかし、この方法で得られた細胞株の外来ヒストン H1~H4 の発現レベルは、内在ヒストンの 1/100 に満たなかった。その理由は完全には明らかでないが、外来ヒストンがランダムに挿入された染色体上の位置のクロマチン状態が関係していると考えられる。ヘテロクロマチン化の影響をうけない EBV 由来のエピソーマルベクター系も試みているが、同ベクターが安定に保持できる DNA 長には制限があるようで、今のところうまくいっていない。

そこで当初の計画を変更して、プロモーターを native プロモーターから CMV プロモーターに変えたり、3' エLEMENTを native 配列からポリ(A)付加シグナルに変えた複数のコンストラクトを

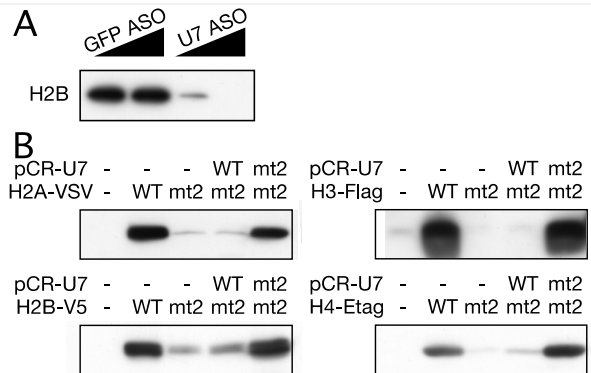


図 2. transient transfection によるヒストンのノックダウン (A) とレスキュー (B) の検討

作製した。transient transfection 系で発現量を比較をしたところ、CMV プロモーターとポリ(A) 付加シグナルを両方持ったコンストラクトが、オリジナルのコンストラクトよりも数十倍高い発現を与えることが分かった。ヒストン本来の発現パターンをなるべく維持した形で外来ヒストンを発現させる、という本来の狙いから逸れてしまうが、ともかく、これらのコンストラクトを用いて細胞株を取得したところ、内在ヒストンの 1/10 程度のレベルで外来ヒストン H1~H4 を安定的に発現する細胞株を樹立することができた。さらに、この細胞株において外来ヒストンがきちんとヌクレオソームに取り込まれていることが確認できた。この発現量でもまだ十分とは言えないが、内在ヒストンの発現をノックダウンしたとき、内在ヒストンと置き換わる形で外来ヒストンの発現量比が高まる可能性に期待している。

研究テーマ C 「哺乳類細胞における H2B モノユビキチン化の機能的役割の解析」

私は、出芽酵母で提唱された H2B モノユビキチン化→H3K4 メチル化の所謂 trans-tail 制御がヒトでは成り立たないことを示す結果を以前に得た。そこで私は、H2B モノユビキチン化の真の機能を明らかにすべく、モノユビキチン化型 H2B (H2Bub) に特異的に結合する因子を、SILAC 法を用いて網羅解析した (イスラエル Weizmann 研究所 Moshe Oren 先生ならびにドイツ Max Planck 研究所 Wolfgang Fischle 先生との共同研究)。H2Bub はネイティブ化学ライゲーション (NCL) 法によって調製し、これを他の組換えヒストンとともにビオチン化 DNA 上にクロマチンを形成させた。一方、light または heavy アミノ酸の存在下で培養した HeLa 細胞から核抽出液を調製し、未修飾クロマチンもしくは H2Bub 含有クロマチンを固定したビーズと混合して、ビーズに残ったタンパク質を質量分析により同定した。SILAC 解析の結果、Pol II、DSIF、NELF、Integrator、SWI/SNF といった既知の転写・プロセッシング関連タンパク質の構成サブユニットが、H2Bub 含有クロマチンと選択的に相互作用することが明らかとなった。

DSIF と NELF は転写伸長因子であり、Pol II の promoter-proximal pausing に関わっている。一方、Integrator は snRNA の 3' 末端プロセッシングを担う酵素複合体である。生化学的な解析から、確かにこれらの因子が H2Bub と相互作用することを確認した。さらに、DSIF、NELF、Integrator の間にもタンパク質間相互作用があることが分かった。

これらの因子と H2Bub の細胞内における機能的関係について snRNA 遺伝子を対象にして解析したところ、いくつか興味深い知見が得られた。まず、ユビキチンリガーゼ RNF20 をノックダウンして H2B のモノユビキチン化を阻害したところ、snRNA 遺伝子座上における Integrator の結合量が顕著に低下していることが ChIP 解析から分かった。同じ条件下で Pol II、DSIF、NELF の結合量はほとんど変化しなかったことから、H2Bub は Integrator をリクルートする働きを持つことが示唆された。一方、NELF をノックダウンしたところ、調べた限りにおいて他の因子の結合量はほとんど変化しなかったにも関わらず、snRNA のプロセッシング異常が顕著に (Integrator 自体のノックダウンに匹敵するレベルで) 誘導された。したがって、NELF は Integrator とは独立のメカニズムで snRNA のプロセッシングを促進していることが分かった。

以上のように、H2Bub の相互作用因子の同定をきっかけにして、H2Bub と転写伸長因子と RNA プロセッシング因子の snRNA 遺伝子上での役割を明らかにすることができた。

3. 今後の展開

メインテーマである「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」については、安定で高レベルの外來ヒストンの発現という点で課題が残るが、現在、目的とする細胞株の樹立に向けて取り組んでいる。U7 snRNA 遺伝子をダブルノックアウトしたときに、外來ヒストンの発現によって細胞増殖を相補できるかどうかポイントであり、それを確認した上で今後の展開を考えたい。

サブテーマである「哺乳類細胞における H2B モノユビキチン化の機能的役割の解析」については成果の一部を 2 つの論文として投稿中である。H2Bub の相互作用因子の一つが snRNA のプロセシング因子 Integrator であったため、これまで snRNA 遺伝子に対象を絞って研究してきたが、他の相互作用因子である DSIF や NELF はクラス II 遺伝子の転写開始点近傍に Pol II とともにユビキタスに結合することが知られている。そこで今後は、ゲノムワイドで DSIF、NELF、Integrator と H2Bub の関係について調べていきたい。

4. 評価

(1) 自己評価

メインテーマである「哺乳類細胞を用いたヒストンの逆遺伝学的解析技術の開発」は、第一段階、すなわち実現可能性を transient transfection のレポーターアッセイ系で調べる段階まではトントン拍子に進んだが、第二段階、すなわち安定なノックダウンレスキューを行う段階で、予期しなかった複数の問題が生じ、それらを一つ一つ解決するのに予想外の長い時間を費やしてしまった。

サブテーマの「哺乳類細胞における H2B モノユビキチン化の機能的役割の解析」については、H2Bub の相互作用因子を SILAC 法によりスクリーニングしたところ、驚いたことに私自身が長年研究してきた DSIF と NELF が H2Bub の相互作用因子として見つかった。相互作用因子としてさらに、snRNA の 3' 末端プロセシングを担う Integrator 複合体が見つかったことから、その方向に研究を展開し、H2B のモノユビキチン化や NELF の予期しなかった役割を明らかにすることができた。

(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)

ヒストン mRNA に特異的な 3' プロセシング装置の一つである U7 snRNA を標的とすることで、すべてのカノニカルヒストンの発現を一挙にノックダウンして、外來ヒストンで相補することをめざした。一過性のトランスフェクション実験では問題なかったが、内在性 U7 snRNA の働きを安定的に阻害する方法については構築中である。一方レスキュー用外來ヒストンの安定的発現については、発現レベルはまだ低いが発現する細胞株を樹立することができた。また、今回の課題を提案する契機になったサブテーマとして、ヒストン H2B モノユビキ

チン化の機能解析を行った。その結果ユビキチン化 H2B と選択的に相互作用する因子を複数同定した。さらに、それらの因子とユビキチン化 H2B が snRNA 遺伝子上で協働して、同遺伝子の転写とプロセッシングを制御していることを明らかにした。

メインテーマについては、内在性 U7 snRNA の働きを安定的に阻害する方法の確立、ならびに安定で高レベルの外來ヒストンの発現など努力は認めるが、多くの技術的な挑戦が残っており、まだ十分な進捗が得られたとはいえない。解決に向け様々な試行錯誤を重ねていると思うが、チャレンジングな課題として採択したので所期の目的を達成すべく引き続き努力されることを期待する。そして当初の予定通り、UbH2B の効果を逆遺伝学的解析により調べて欲しい。

5. 主な研究成果リスト

本研究課題に関連して研究者主導で得られた成果について、代表的なものを中心に**各項目5つ程度を目安**に記載してください。ただし、特許については、本課題の成果であれば全て記載してください。**公開項目**です。2014年6月時点での公開を希望しない成果は、その旨記載してください。

※論文は、2014年3月末までにアクセプトされたものであれば、in press(印刷中)でも構いません。

※特許の場合、通常、出願情報が公開されるのは出願日から1年半以降です。それ以前に公開する場合は出願人にご確認ください。

(1) 論文(原著論文)発表

| | |
|----|--|
| 1. | Kim, S., Yamamoto, J., Chen, Y., Aida, M., Wada, T., Handa, H., and <u>Yamaguchi, Y.</u> Evidence that cleavage factor Im is a heterotetrameric protein complex controlling alternative polyadenylation. <i>Genes Cells</i> . 2010 年, 15, 1003-1013. |
| 2. | Taneda, T., Zhu, W., Cao, Q., Watanabe, H., <u>Yamaguchi, Y.</u> , Handa, H., and Wada, T. Erythropoiesis is regulated by the transcription elongation factor Foggy/Spt5 through gata1 gene regulation. <i>Genes Cells</i> . 2011 年, 16, 231-242. |
| 3. | Kawano, A., Hayashi, Y., Noguchi, S., Handa, H., Horikoshi, M., and <u>Yamaguchi, Y.</u> Global analysis for functional residues of histone variant Htz1 using the comprehensive point mutant library. <i>Genes Cells</i> . 2011 年, 16, 590-607. |
| 4. | Diamant, G., Amir-Zilberstein, L., <u>Yamaguchi, Y.</u> , Handa, H., and Dikstein, R. DSIF restricts NF-kappa B signaling by coordinating elongation with mRNA Processing of negative feedback genes. <i>Cell Reports</i> . 2012 年, 2, 722-731. |
| 5. | Isobe, T., Song, S.-N. J., Tiwari, P., Ito, H., <u>Yamaguchi, Y.</u> , and Yoshizaki, K. Activation-induced cytidine deaminase auto-activates and triggers aberrant gene expression. <i>FEBS Letters</i> . 2013 年, 587, 2487-2492. |

(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)

【受賞】

2011年2月 手島記念研究賞 研究論文賞

2011年10月 東工大挑戦的研究賞

【プレスリリース】

2012年10月 過剰な炎症反応を抑える仕組みを解明

—関節リウマチなど自己免疫疾患の病態が明らかに—