

論文の内容の要旨

論文題目 Genome-wide analysis for chromatin composition of histone H2A and H3 variants in mouse embryonic stem cells

(マウス ES 細胞におけるヒストン H2A, H3 変異体のゲノムワイド解析)

氏 名

湯川 将之

[序論]

ヌクレオソームは DNA とコアヒストンから成る構造体であり、クロマチンの基本単位と考えられている。コアヒストンには、H2A, H2B, H3, H4 の 4 種類が存在する。ヌクレオソームは H2A-H2B および H3-H4 のヘテロダイマーがそれぞれ 2 分子ずつ会合したヒストンオクタマーに 146bp 長の DNA が 1.7 周巻き付いた構造をしている。コアヒストンの N 末端 tail はヌクレオソーム外に出ており、リジンなどの特異的なアミノ酸残基にアセチル化やメチル化などの化学的修飾がなされることで、それに結合するタンパク質を介してクロマチン状態をユークロマチンとヘテロクロマチンにダイナミックに変化させることが知られている。

ヒストン H2A および H3 にはそれぞれ複数の変異体が存在し、それらは遺伝子発現の調節などに重要な役割を果たしていることが近年明らかになってきた。例えば、クロマチン内の H2AZ や H3.3 の量は転写活性とよく相関しているという報告がある。しかし、それらの研究では単一もしくは数個のヒストン変異体を独立に解析しただけであり、それぞれの変異体の関係を総合的に解析したものはこれまでほとんどなかった。

そこで本研究ではマウス ES 細胞で発現する主要なヒストン変異体 (H2A 変異体: H2A, H2AX, H2AZ, MacroH2A (mH2A); H3 変異体: H3.1, H3.2, H3.3) のゲノム上における局在を、**Chromatin Immunoprecipitation** (ChIP) 法と次世代 sequencer を組み合わせた ChIPseq を行うことで同時に網羅的に解析し、ヒストン変異体の構成と遺伝子発現調節およびゲノム上の各領域との関係などを明らかにすることを目的とした。

[方法]

ヒストン H3 変異体である H3.1, H3.2, H3.3 はアミノ酸配列が非常によく似ている。そのため、これらのヒストン変異体を区別して反応するすぐれた抗体がない。そこで本研究ではまず、解析を行った全ての H2A および H3 ヒストン変異体に関して、Flag-ヒストン変異体をコードする恒常発現用ベクターをそれぞれ作成した。そして、これらの Flag-ヒストン変異体ベクターをそれぞれマウス ES 細胞に導入し、Flag-ヒストン変異体を恒常発現する細胞株を樹立した。その後、それらの細胞をサンプルとして Flag 抗体を用いた ChIPseq を行った。そしてスーパーコンピューターを用いて、次世代シーケンサーによって得られた大量のデータからヒストン変異体のゲノム上の局在を解析した。また、ヒストン修飾抗体 (H3K4me3, H3K27me3, H3K36me3) を用いた ChIPseq および RNAseq も同時に行った。

[結果と考察]

1. 各染色体におけるヒストン変異体の分布

まず、マウス ES 細胞において各ヒストン変異体の分布が染色体によって異なっているどうかを調べることにした。そこで、ヒストン変異体の ChIPseq から得られた各染色体の read 数と全染色体の

read 数の割合を解析した。その結果、他の H2A 変異体、H3 変異体に比べて mH2A と H3.1 のミトコンドリアゲノムにおける read 数の割合が非常に高いことが分かった (図1)。このことから、ミトコンドリア内では mH2A と H3.1 がヌクレオソームまたはヌクレオソーム様構造を形成し DNA をコンパクトにまとめていることが予想される。また Y 染色体において H3.3 の read 数の割合が低かった。このことから、ユークロマチン化に関わる H3.3 は高度にヘテロクロマチン化されている Y 染色体から排除されるのではないかと考えられる。

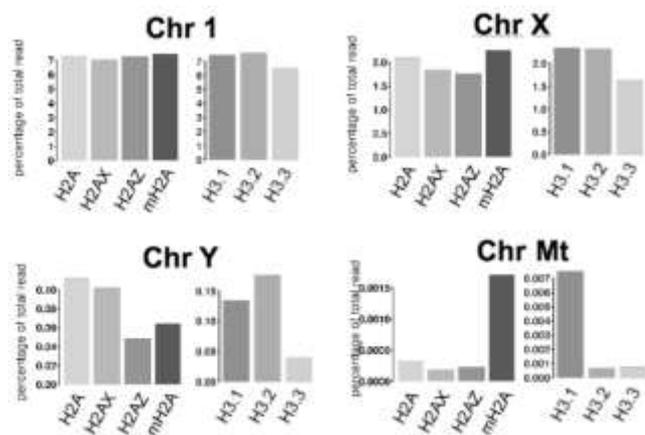


図1 各染色体におけるヒストン変異体の分布
H2A, H3 変異体 それぞれの ChIPseq データの総 read 数に対する各染色体の read 数の割合を示す。

2. ヒストン変異体と遺伝子領域との関係

転写の状況によって遺伝子領域におけるクロマチン状態は変化し、転写が active な状態だと promoter において H3K4me3 が、gene body においては H3K36me3 のヒストン修飾レベルが増加することが知られている。そこで、遺伝子の転写状況とヒストン変異体の局在の相互関係を調べるために遺伝子領域に着目して ChIPseq データを解析することにした。まず、RNAseq のデータから遺伝子を転写 active と転写 inactive の2つに大別し、それらの遺伝子内部と前後における各変異体の分布 profile を作成した (図2)。その結果、active な遺伝子では Transcription Start Site (TSS) 周辺において H2AZ と H3.3 の大きなピークが見られた。そして、mH2A は gene body において排除されていることが分かった。また、H3.3 においては遺伝子内部だけでなく遺伝子前後においても高い局

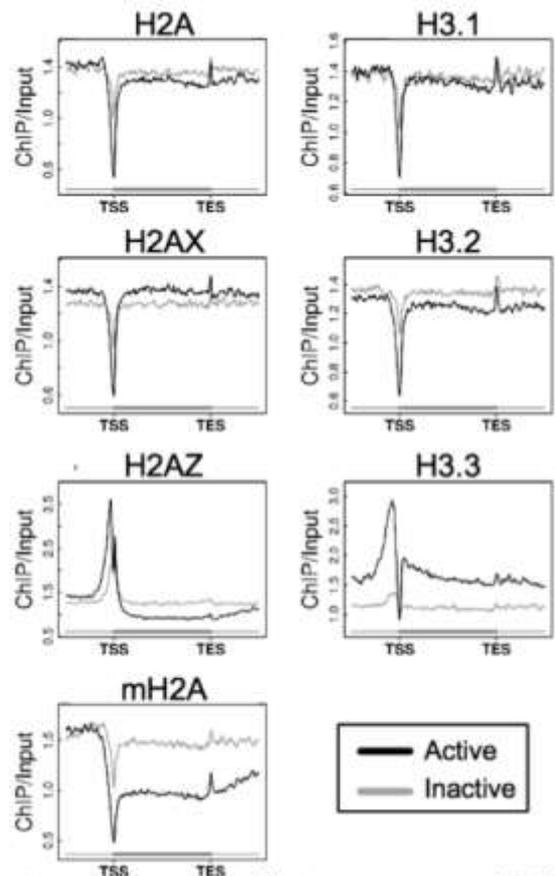


図2 Active, Inactive 遺伝子におけるヒストン変異体局在
Active (黒)および Inactive (灰)な遺伝子の内部と前後における H2A (左)および H3 変異体 (右)のプロファイル。

在があることが分かった。さらに、active な遺伝子では TSS において全てのヒストン変異体の局在が顕著に減少していた。一方、inactive な遺伝子

では上記のような特徴は見られず、どのヒストン変異体も遺伝子内部および前後において一定の局在を示していた。これらつまり、ヒストン変異体によって active, inactive な状態のクロマチンが形成され、転写の状態が決定されていることを示唆している。

また、promoter 領域に CpG 配列が多い遺伝子 (HCP) と少ない遺伝子 (LCP) とではクロマチン状態や転写様式が異なっていることが報告されている。そこで、ヒストン変異体の局在と promoter における CpG の density および転写状態との間の相互関係を調べることにした。最初に、遺伝子を HCP と LCP に分類し、続いて Active と Inactive に分類して TSS 周辺の profile を作成した。その結果、H2AZ と H3.3 の TSS 周辺における peak は HCP 遺伝子でのみ見られることが分かった (図3)。また、図2で active

な遺伝子に見られた TSS におけるヒストン変異体の局在量の低下は遺伝子が active, inactive な状態に依らず、遺伝子が HCP か LCP かどうかに依存していることが分かった。以上から遺伝子領域におけるヒストン変異体の局在は遺伝子の発現状況および promoter 領域における CpG density によって異なっていることが分かった。

3. 調節エレメントにおけるヒストン変異体分布

まず転写調節領域でのヒストン変異体局在を調べた。データベース上に存在するマウス ES 細胞における各種転写因子の ChIPseq のデータを解析し転写因子結合サイト (TFBS: Transcription Factor Binding Site) を同定した。そして、各種転写因子結合サイトにおいてヒストン変異体

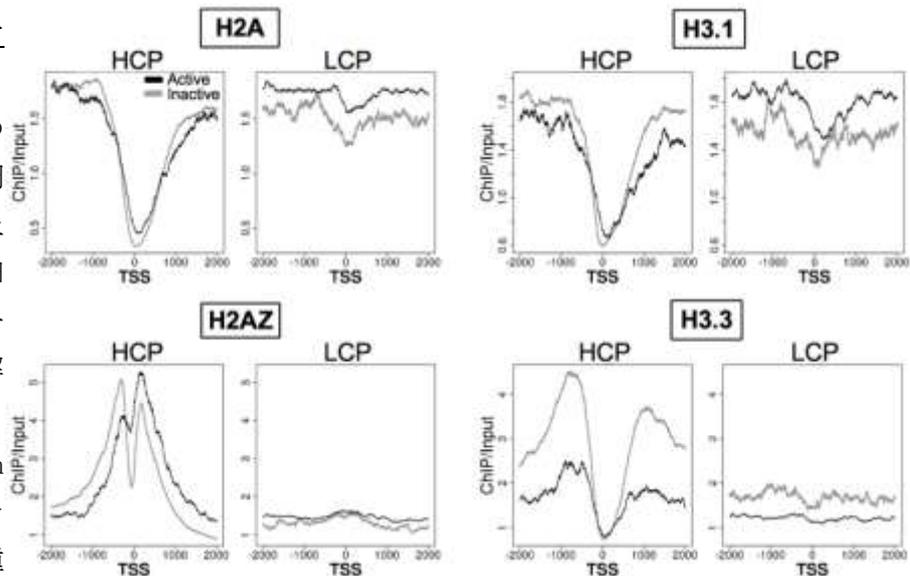


図3 promoter の CpG density と転写状況の異なる遺伝子におけるヒストン変異体局在 HCP と LCP 遺伝子の TSS 周辺 (TSS±2000bp) における H2A (左) および H3 変異体 (右) のプロファイル。H2AX, mH2A のプロファイルは H2A と、H3.2 のプロファイルは H3.1 と同様のパターンを示していた。

の局在を調べたところ、ほとんどの TFBS において H2AZ と H3.3 が高いレベルで局在していることが分かった (図 4)。

次に、CpG Island (CGI) について解析を行った。CGI は GC 含量が多く DNA のメチル化がなされる CpG 配列に富むが、その大部分はメチル化が起こっておらず各種クロマチンタンパク質をリクルートし、ユークロマチン状態になっていることが報告されている。データ解析の結果、H2A 変異体の中では H2AZ が CGI に多く局在していることが分かった (図 5)。また、CGI が遺伝子領域 (promoter, gene body) および intergenic のいかなる領域と重なり合う場合でも H2AZ は同程度の局在量を示していた。一方、H3 変異体の中では H3.3 が CGI に多く局在していることが分かった (図 5)。

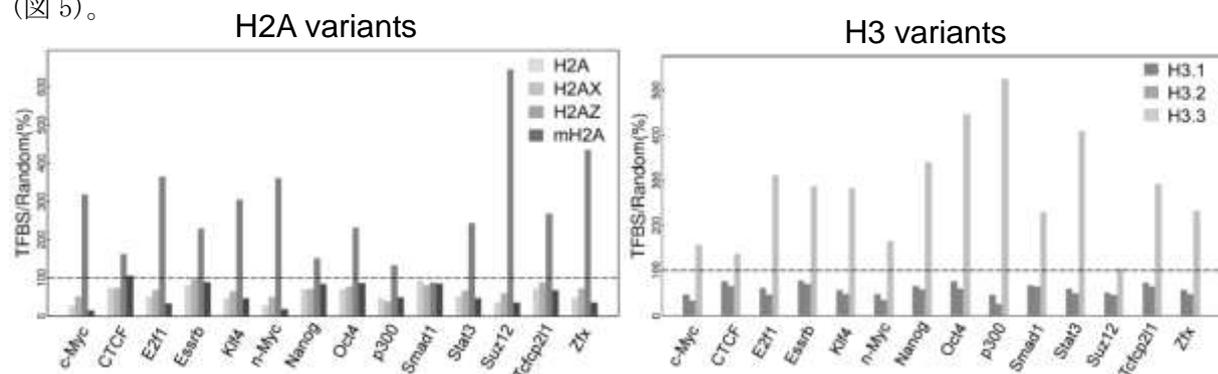


図4 TFBS におけるヒストン変異体局在 同定した転写因子結合サイトにおける H2A 変異体 (左) と H3 変異体 (右) それぞれの局在を表示。点線は TFBS 以外の領域からランダムに抽出された領域の平均を示している。

4. H2A 変異体と H3 変異体の組み合わせ解析

各ヌクレオソーム単位は、それを構成する H2A 変異体と H3 変異体の組み合わせにより、その性質が大きく異なると考えられている。例えば、H2AZ を含むヌクレオソームは不安定であるとされているが、これは H3.3 との組み合わせで形成された場合だけであって、他の H3 変異体との組み合わせの場合は、

むしろ他の H2A 変異体を含むヌクレオソームよりも安定性が高いことが示唆されている。そこで、特定の組み合わせのヌクレオソームが高頻度に存在するゲノム領域を特定するため、以下の解析を行った。まず、ゲノムを 1ヌクレオソームの長さである 150bp の bin として区切り、H2A 変異体と H3 変異体それぞれについて、ある特定の变異体一つだけが他すべての変異体よりも有意に多く存在する bin を特定した。このようにして得られた特定の H2A 変異体および H3 変異体を多く含む bin が互いに重なった場合、この bin は特定の組み合わせのヌクレオソームが存在する bin であると見做した。そして各組合せの出現頻度を調べたところ、H2AZ と H3.3 の組み合わせが他の変異体同士の組み合わせのものよりも高いことが分かった (図 6)。このことはヌクレオソームを形成する過程において H2AZ と H3.3 の親和性が高いことを示している。

また、H2AZ と H3.3 はそれぞれ H3K4me3 と関係があると報告されている。そこで、H2AZ と H3.3 が重なり合う bin の H3K4me3 レベルを調べてみたところ、それぞれの変異体が単独で存在する bin よりも高いことが分かった (図 7)。このことから H2AZ と H3.3 は一つのヌクレオソーム内で協調して働き H3K4me3 の修飾が入るクロマチン状態を作り出していると考えられる。

[結論]

以上より、ヒストン変異体は遺伝子の活性化状態およびゲノム上の様々な調節領域で特異的な局在を示すことが分かった。また H2A 変異体と H3 変異体の組み合わせには優位性があり、クロマチン状態に関与することが示唆された。今後は、ヒストン以外のクロマチンタンパク質の ChIPseq データと統合して解析することにより、さらなるヒストン変異体の役割の発見およびクロマチン状態への関与を明らかにできるものと考えられる。

[発表論文]

1. [Yukawa M, Oda S, Mitani H, Nagata M, Aoki F. \(2007\). Deficiency in the response to DNA double-strand breaks in mouse early preimplantation embryos. *Biochem Biophys Res Commun* 358: 578- 584.](#)
2. [Nashun B, Yukawa M, Liu H, Akiyama T, Aoki F. \(2010\). Changes in the nuclear deposition of histone H2A variants during pre-implantation development in mice. *Development* 137:3785-94](#)

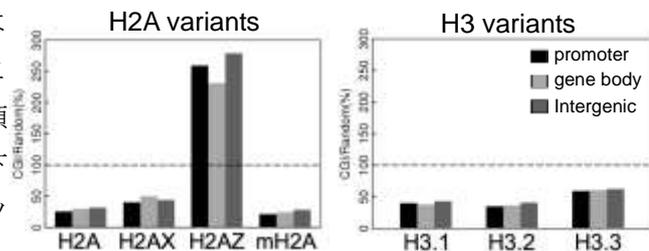


図 5 CGIにおけるヒストン変異体局在
CGIにおける H2A 変異体 (左) と H3 変異体 (右) それぞれの局在を表示。点線は CGI 以外の領域からランダムに抽出された領域の平均を示している

図 6 H2A 変異体と H3 変異体の組み合わせ解析

H2A 変異体、H3 変異体それぞれにおいて一変異体だけが局在する領域を同定し、H2A 変異体と H3 変異体の領域の間で重なり合う頻度を計算した。点線は頻度の期待値を示す。

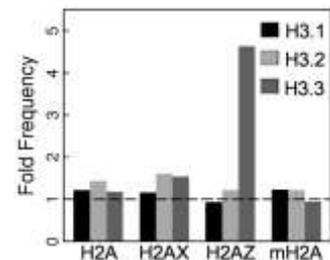


図 7 H2AZ と H3.3 の組み合わせによる H3K4me3 レベルへの影響

H2AZ 単独、H3.3 単独、H2AZ と H3.3 が重なり合う bin における H3K4me3 レベルを示す。

