

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：12102
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2013～2015
課題番号：25291001
研究課題名(和文) ヒストンシャペロンによるクロマチンのダイナミック制御

研究課題名(英文) Dynamic regulation of chromatin by histone chaperone

研究代表者
永田 恭介 (Nagata, Kyosuke)

筑波大学・ 学長

研究者番号：40180492

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストンシャペロンTAF-Iの生理機能を明らかにすることを目的とした。TAF-I KOマウスは胎生12.5日目までに重度の貧血と未熟な血管形成を示して致死となった。TAF-I KO ES細胞は野生型に比べて細胞増殖が著しく低下し、初期胚を模した胚様体の形成が遅延する様子を示した。培養細胞を用いた解析から、TAF-IはヒストンH1を介してインターフェロン誘導性遺伝子の転写制御に関わることが明らかとなった。生化学的解析から、TAF-Iの分子内相互作用によるヒストンH1シャペロン活性制御機構を明らかにした。TAF-Iをプローブとした感染細胞におけるアデノウイルスゲノム動態解析法を確立した。

研究成果の概要(英文)：Aim of this study is to reveal the physiological function of histone chaperone TAF-I. TAF-I KO mice showed the embryonic lethality along with severe anemia and immature vascular remodeling until 12.5 day post conception. TAF-I KO ES cells showed the significant growth retardation and the delay of embryonic body formation mimicking the early embryo. From cell culture analyses, we found that TAF-I is involved in transcriptional regulation of interferon-stimulated genes through its histone H1 chaperone activity. From biochemical analyses, we revealed the regulatory mechanism of histone H1 chaperone activity of TAF-I through its intra-molecular binding. We also established the live cell imaging method of adenovirus genome in infected cells using TAF-I as a probe.

研究分野：分子生物学

キーワード：遺伝子 ウイルス ゲノム 発生・分化 クロマチン

1. 研究開始当初の背景

(1)真核細胞ゲノム DNA はヒストンとの複合体であるクロマチン構造を形成し、転写をはじめとする核内反応の制御において重要である。これまで ATP 依存性クロマチンリモデリング因子や、ヒストンのアセチル化やメチル化を触媒する修飾酵素などを中心に、多くのクロマチン構造制御因子について生化学的機能の解析、生理機能の解析が進められてきた。一方で、ヒストンと DNA との結合性を化学量論的な反応機序で制御するヒストンシャペロンについては、生化学的機能解析が進む一方で、生理機能の解析はあまり進行していない。

(2)我々は、アデノウイルスクロマチンの構造変換因子として Template Activating Factor (TAF)-I、II、および III の 3 つの因子を同定し、その機能解析を進めてきた。生化学的解析から、これら TAF はすべてヒストンシャペロンとして機能し、コアヒストンのみならずリンカーヒストン H1 のシャペロンとしても機能する。しかし、その生理機能に関してはほとんど明らかでない。

2. 研究の目的

本研究では、TAF-I に焦点をあてて、KO マウスを用いた生理機能、精子クロマチンの細胞型クロマチンへの変換機構、およびクロマチン構造変換に基づく遺伝子制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)TAF-I KO マウスを用いた生理機能の解析

TAF-I KO マウスの胎児について経時的および網羅的に遺伝子発現パターンを解析し、TAF-I の標的遺伝子の探索を行う。同時に

TAF-I KO ES 細胞を構築し、細胞増殖や細胞分化における TAF-I の機能を明らかにする。各種 TAF-I 変異体を用いて TAF-I KO ES 細胞のレスキュー実験を行い、TAF-I の胚発生における機能の解明を試みる。

(2)精子クロマチンの細胞型クロマチンへの変換機構

TAF-I KO マウスの初期胚発生において母性 TAF-I が消失するタイミングを、受精卵の経時的観察により明らかにする。*TAF-I* 遺伝子のコンディショナル KO マウスを作製し、母性 TAF-I を持たない卵および *TAF-I* 遺伝子欠損精子を得る。また、発現抑制のためのアンチセンスオリゴやドミナントネガティブ TAF-I 変異体、と伴に蛍光タンパク質を融合したヒストンをコードした mRNA を第一減数分裂前期の未受精卵にインジェクションした後、試験管内で成熟させる。試験管内受精により発生を開始させ、受精直後の精子核脱凝集現象における TAF-I の役割を明らかにする。

(3)クロマチン構造変換に基づく遺伝子制御機構

主に生化学的な実験手法を用いた TAF-I の機能解析を通じて、ウイルスクロマチン構造制御とそれによるエピジェネティックな遺伝子発現パターンのプログラミングの分子基盤を明らかにする。このウイルスを用いた解析結果を基盤に、実験を TAF-I によって制御される細胞遺伝子にも拡張し、TAF-I の遺伝子制御機構を明らかにする。また TAF-I の 2 つのサブタイプ間での機能的違いについて、生化学的解析を中心に明らかにする。

4. 研究成果

(1) TAF-I KO マウスを用いた生理機能解析

TAF-I KO マウスは胎生 8.25 日目から発生に異常を示し始め、重度の貧血と未熟な血管形成を示して胎生 12.5 日目までに致死となった。cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現パターンを網羅的に解析したところ、TAF-I KO 胚では低酸素応答遺伝子群や解糖系に関連する遺伝子群の発現量が増加していることが明らかとなった。

TAF-I による遺伝子発現への影響を培養細胞系で解析するために、TAF-I KO ES 細胞を樹立した。フィーダー細胞と LIF を用いて未分化状態を維持する培養条件では、TAF-I KO ES 細胞と野生型 ES 細胞との間で細胞増殖能にほとんど差は見られなかった。しかし初期胚を模した embryonic body (胚様体) 形成への影響を見たところ、TAF-I KO ES 細胞は野生型に比べて細胞増殖の著しい低下が観察され、胚様体形成が遅延することが明らかとなった。以上の結果は、TAF-I KO マウスの胚発生で観察された成長の遅延を再現していると考えられる。

(2) 精子クロマチンの細胞型クロマチンへの変換機構

TAF-I ヘテロ欠損マウスの精子と卵子を用意し、体外受精を行った後、免疫染色法により TAF-I の発現状態を観察した。その結果、未受精卵において TAF-I は発現しており、受精後 48 時間までは TAF-I の発現が消失した胚は観察されなかった。しかし、さらに発生が進み受精後 72 時間 (胚盤胞期) 後になると母性 TAF-I は消失した。

アデノウイルスゲノムはウイルスゲノム DNA とウイルスの塩基性コアタンパク質か

らなるクロマチン様複合体を形成している。感染直後、ウイルスゲノム DNA にはヒストンが結合し、感染後期の子孫ウイルスゲノムの粒子へのパッケージングの際にはヒストンは再びウイルスコアタンパク質に置き換わる。この一連の過程は、ほ乳類における精子形成および受精後のクロマチン動態に相似している。アデノウイルス感染細胞でのコアタンパク質とヒストンの動態を解析したところ、感染初期にはウイルスコアタンパク質とコアヒストンが両方結合したヘテロなウイルスクロマチン構造をとることが明らかとなった。一方感染後期では、複製非依存的なウイルスゲノムへのコアヒストンの取り込みが起こることが明らかとなった。交換反応の詳細について検討するための試験管内系の構築を目指した。しかし、上述した構成成分だけでは容易には交換反応は起こらず、他の因子の関与も含めた系の構築について検討中である。さらに、精子特異的塩基性タンパク質、アデノウイルスコアタンパク質、およびヒストン H1 の間にはアミノ酸配列、および構造上の強い類似性が認められた。そこで、今後は感染直後のアデノウイルスゲノム-コアタンパク質からアデノウイルスゲノム-ヒストン H1 への交換機構についても検討していく予定である。

(3) クロマチン構造変換に基づく遺伝子制御機構の解析

ヒト子宮頸がん由来 HeLa S3 細胞を用いて、TAF-I が発現制御に関わる遺伝子およびそのメカニズムを解析した(図 1)。その結果、TAF-I の発現を抑制した細胞では、コントロールの細胞と比較してインターフェロン誘導性遺伝子群 (ISG 群) の転写量が増加する様子が観察された。またその傾向は、インターフェロ

ン非添加時に特に顕著であった。次に、TAF-I による ISG 遺伝子転写制御がヒストン H1 依存的であるか検討した。ヒストン H1 の発現抑制により ISG 転写量が増加したことから、ヒストン H1 は ISG 転写に抑制的に機能していることが明らかとなった。TAF-I の発現を抑制した細胞では、ISG 遺伝子上でのヒストン H1 結合量の低下が観察された。また、TAF-I 発現抑制の効果はヒストン H1 発現抑制と組み合わせることで減弱化した。以上の結果より、TAF-I は ISG 遺伝子へのヒストン H1 の結合を促進することで、ISG 転写に抑制的に働くことが明らかとなった。

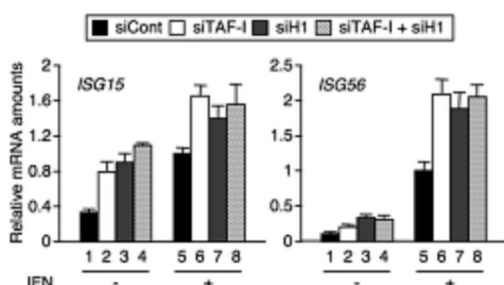


図1: TAF-I とヒストン H1 による ISG 転写制御

ヒトおよびマウスの TAF-I には N 末端の数
十アミノ酸のみが異なる と の 2 つのサブ
タイプが存在し、ヘテロあるいはホモ 2 量体
を形成する。TAF-I と TAF-I でヒストン H1
シャペロン活性を比較したところ、TAF-I は
に比較してより強い活性を示した。また
TAF-I の N 末端領域を欠損させ、TAF-I と
の共通領域のみにした変異体は、TAF-I とほ
ぼ同程度の活性を示した。これらの結果より、
TAF-I の N 末端領域が自身のヒストン H1 シ
ャペロン活性を負に制御することが明らかと
なった。TAF-I N 末端アミノ酸領域中には、
に比して塩基性アミノ酸であるリシンおよ
びアルギニンが多く存在している。そこで、

TAF-I N 末端領域が、TAF-I のヒストンシャ
ペロン活性において重要な C 末端酸性アミノ
酸領域に結合するか検証した。TAF-I N 末端
アミノ酸領域中のリシンおよびアルギニンを
アラニンに置換した複数の変異体を作製し、
GST プルダウン法ならびにゲルシフトアッセ
イを行なったところ、TAF-I N 末端アミノ酸
領域が、その中に存在する塩基性アミノ酸ク
ラスタに依存して C 末端酸性アミノ酸領域
に相互作用することが明らかとなった。また、
TAF-I の N 末端アミノ酸領域と C 末端酸性
アミノ酸領域が実際に分子内相互作用するこ
とを FLASH ラベリング法により確認した。さ
らに、これら TAF-I N 末端の塩基性アミノ
酸をアラニンに置換した変異体は、TAF-I と
同程度のヒストン H1 シャペロン活性を示し
た。以上の結果より、TAF-I は自身の N 末
端アミノ酸領域と C 末端酸性アミノ酸領域の
分子内相互作用を介して、ヒストン H1 シャ
ペロン活性を負に制御することが明らかとな
った。

アデノウイルスの感染後期におけるウイル
スクロマチン上への Prorein VII の配置機構と
TAF-I の機能について解析を行った結果、
TAF-I とは異なる細胞性因子が TAF-I とは独
立して Protein VII と複合体を形成し、ウイル
スゲノム上への配置に関与している可能性が
示唆された。また、これまで感染後期におい
てウイルスクロマチン構造はヒストンの配置
された細胞型から Protein VII の結合したウイ
ルス粒子型に変換されると考えられてきたが、
新規合成されたウイルス DNA にヒストンが
結合する前に Protein VII の配置が行なわれる
という新たな経路の可能性が示唆された。

TAF-I がアデノウイルス感染初期に Protein VII との結合を介してウイルス DNA 上にリクルートされることに着目し、EGFP/mCherry を融合させた TAF-I を用いたライブセルイメージング系を確立し、感染初期におけるウイルス DNA の挙動をリアルタイムで観察した。その結果、広く信じられている「DNA ウイルスのゲノムは PML-nuclear body (PML-NB) に局在する」という仮説に反して、アデノウイルスゲノムは感染初期において PML-NB に局在しないこと(図 2) さらに他の核内の抗ウイルス因子にも認識されない可能性が示された。

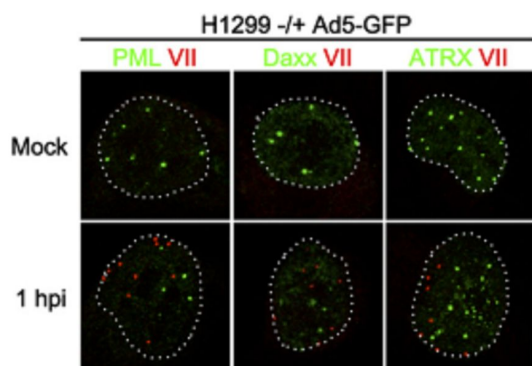


図2: アデノウイルスゲノムは感染初期においてPML-NBに局在しない

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Komatsu T, Will H, Nagata K, and Wodrich H, Imaging analysis of nuclear antiviral factors through direct detection of incoming adenovirus genome, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 473, 2016, pp. 200-205 (査読あり)

Komatsu T, Nagata K, and Wodrich H, An adenovirus DNA replication factor, but not incoming genome complexes, targets PML nuclear bodies, *J. Virol.*, vol. 90, 2015, pp.

1657-1667 (査読あり)

Komatsu T, Dacheux D, Kreppel F, Nagata K, and Wodrich H, A method for visualization of incoming adenovirus chromatin complexes in fixed and living cell, *PLoS One.*, vol. 10, 2015, DOI: 10.1371/journal.pone.0137102 (査読あり)

Kadota S and Nagata K, Silencing of IFN-stimulated gene transcription is regulated by histone H1 and its chaperone TAF-I, *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, 2014, pp. 7642-7653 (査読あり)

Komatsu T, Sekiya T, Nagata K, DNA replication-dependent binding of CTCF plays a critical role in adenovirus genome functions, *Scientific Reports*, vol. 3, 2013, <http://dx.doi.org/10.1038/srep02187> (査読あり)

〔学会発表〕(計 5 件)

鍛谷香織、加藤広介、永田恭介、ヒストン H1 シャペロン TAF-I の分子内相互作用による活性制御機構、第 38 回日本分子生物学会年会、2015.12.1、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市)

門田伸一、永田恭介、リンカーヒストン H1 シャペロン TAF-I による IFN 誘導性遺伝子の転写抑制機構、冬の若手ワークショップ 2014、2014.1.30、舌切りの宿 雀磯部ガーデン(群馬県安中市)

Kadota S, Nagata K, TAF-I regulates the transcription of interferon-stimulated genes through its histone chaperone activity, Leading Graduate Schools International Conference (Tsukuba Global Science Week), 2013.10.3, Tsukuba, Japan

門田伸一、永田恭介、TAF-I によるヒストン
シャペロン活性を介したインターフェ
ロン誘導性遺伝子転写制御、第 31 回染色
体ワークショップ・第 12 回核ダイナミク
ス研究会、2013.11.26、ホテルおかだ（神
奈川県箱根町）

阿部真弓、久岡美晴、永田恭介、ヒスト
ンシャペロンによるリンカーヒストン H1
バリエーションの機能制御機構、第 36 回日本
分子生物学会、2013.12.3、神戸ポートア
일랜드（兵庫県神戸市）

6 . 研究組織

(1)研究代表者

永田 恭介 (NAGATA, Kyosuke)

筑波大学・学長

研究者番号：40180492

(2)研究分担者

奥脇 暢 (OKUWAKI, Mitsuru)

筑波大学・グローバル教育院・准教授

研究者番号：50322699