

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03687

研究課題名(和文) マウスES細胞において開いたクロマチンの状態を規定する分子機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of molecular mechanism governing open chromatin formation in mouse ES cells

研究代表者

丹羽 仁史 (Niwa, Hitoshi)

熊本大学・発生医学研究所・教授

研究者番号：80253730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：Mystファミリーヒストンアセチル化酵素は、遺伝子発現やDNA修復などに関与することが知られているが、その胚性幹細胞における機能は不明な点も多い。我々は、Myst複合体の共通因子であるMeaf6について、欠損胚性幹細胞を作成し、その機能を解析した。その結果、Meaf6の機能は胚性幹細胞の増殖に必須であった。一方で、Meaf6が存在しない状態でもMyst複合体は存在し、そのヒストンアセチル化酵素活性も維持されていた。これより、Meaf6はヒストンアセチル化制御以外の機能で、細胞増殖に関わっている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Meaf6と他の遺伝子の融合遺伝子が、子宮内膜間質肉腫において見出されており、その癌遺伝子としての機能が推定されている。我々の研究は、Meaf6が細胞増殖制御に関わることを初めて明らかにしたものであり、今後の発がんとの関連性の解明に資するものである。

研究成果の概要(英文)：Myst family genes encode lysine acetyltransferases that mainly mediate histone acetylation to control transcription, DNA replication and DNA damage response. They form tetrameric complexes with PHD-finger proteins (Brpfs or Jades) and small non-catalytic subunits Ing4/5 and Meaf6. Although all the components of the complex are well-conserved from yeast to mammals, the function of Meaf6 and its homolog has not been elucidated in any species. Here we revealed the role of Meaf6 in the Myst complex utilizing inducible Meaf6 KO ES cells. Elimination of Meaf6 results in cease of proliferation although histone acetylation is largely unaffected. In the absence of Meaf6, one of the Myst family members Myst2 increased its ability to interact with PHD-finger proteins. This is the first indication of the function of Meaf6, which is not essential for HAT activity, but modulates the stoichiometry of the Myst complex.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：エピジェネティクス ヒストン アセチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

マウス ES 細胞などの多能性幹細胞は、特徴的なエピジェネティック制御状態にあることが知られていた。それは、一般的な分化細胞では、遺伝子をコードする領域のクロマチンは、遺伝子発現が活発な領域では開いていてユークロマチンを形成し、遺伝子発現が抑制された領域では閉じたヘテロクロマチンを形成するのに対し、多能性幹細胞ではほぼ全領域がユークロマチン状態にあるということである。このような状態は、多能性幹細胞においては、将来生体を構成する全ての種類の細胞に分化する能力 (= 多能性) を維持するためには、全ての遺伝子を発現可能な状態にとどめておく必要があることを反映していると推測される。しかし、分子機構として、どのようなクロマチン制御因子がこのような多能性幹細胞特異的なクロマチン状態の決定に関与しているのかは、明らかではなかった。

ヒストン修飾のうち、アセチル化は物理的に直接クロマチンの凝集を抑制することが知られていることから、ヒストンアセチル化のレベルを検討したところ、H3 アセチル化が未分化状態のマウス ES 細胞では高く、分化に伴い減少することを見出した。そこで、H3 アセチル化に関わる *Myst* family histone acetyl transferase (HAT) の遺伝子発現を調べたところ、*Myst2* と *Myst4g* が未分化状態のマウス ES 細胞では高発現し、分化に伴いその発現が減少することを見出した。そこで、我々は、*Myst2*、*Myst4* を中心とした *Myst* family HAT の機能を解析し、それらの多能性幹細胞特異的なクロマチン状態制御への関与を検討することとした。

2. 研究の目的

本研究は、マウス ES 細胞において開いたクロマチンの状態を規定する分子機構を解明することを、その目標とする。具体的には、我々が同定した候補因子 *Myst2* について、さらに詳細な機能解析を進める。*Myst2* の機能が、ヒストンアセチル化によるものなのか、あるいは他の分子のアセチル化を介したものなのかを、明らかにするとともに、これらのアセチル化がどのように多能性維持に関与するのかを解明する。そして、*Myst2* 欠損を代償する分子の同定を行い、これを *Myst2* とともに欠損させた時の ES 細胞の表現型を解析する。また、*Myst2* と他のエピジェネティック制御因子の協調性についても解析する。さらに、このような分子機構の多能性誘導過程における機能を、XEN 細胞のケミカルリプログラミング系などを用いて検討する。

3. 研究の方法

(1) 誘導型ノックアウト ES 細胞の作成

Myst2、*Myst4* については、内在遺伝子座に相同遺伝子組み換え法により loxP site を挿入し、そののちホルモン誘導型 Cre 遺伝子を導入することにより、ホルモン誘導型ノックアウト ES 細胞を作成した。*Meaf6* については、*Rosa26* 遺伝子座に loxP で挟まれた恒常型発現ベクターを挿入し、ホルモン誘導型 Cre 遺伝子を導入するとともに、内在性遺伝子を Crispr/Cas9 法で破壊することにより、ホルモン誘導型ノックアウト ES 細胞を作成した。

(2) 誘導型ノックアウト ES 細胞の解析

ノックアウト ES 細胞の細胞周期、細胞死のパターンは定法に従い FACS で解析した。また、遺伝子発現パターンは qRT-PCR 法、マイクロアレイ法ならびに RNA-seq 法で解析した。さらに、各因子の相互作用については免疫沈降法と質量分析法により解析した。

4. 研究成果

(1) *Myst2* ノックアウト ES 細胞の解析

マウス ES 細胞において、*Myst2* 遺伝子破壊を誘導すると、ES 細胞は、細胞増殖速度が低下するものの、ES 細胞の形態を維持したまま増殖を続けた。ここから樹立した *Myst2* KO ES 細胞では、histone H3 K14、H3 K27 のアセチル化レベルは、野生型に比べて低下していたが、ヘキスト染色の観察される核内ヘテロクロマチンのパターンに顕著な変化は認められなかった。また、遺伝子発現パターンを RNA-seq 法で検討したところ、*Utf1* など一部の多能性関連遺伝子の発現量は低下していたが、遺伝子発現パターンは概ね維持されていた。また、*Myst2* KO ES 細胞に GFP 恒常発現ベクターを導入したのち、胚盤胞に注入したところ、キメラ胚への寄与が確認されたことから、これら ES 細胞は多能性を維持していることが確認された。これより、*Myst2* の機能は、ES 細胞の多能性維持とクロマチン状態の維持において必須ではないと結論された。

(2) *Myst4* ノックアウト ES 細胞の解析

マウス ES 細胞において、*Myst4* 遺伝子破壊を誘導すると、ES 細胞は、通常の細胞増殖速度で、ES 細胞の形態を維持したまま増殖を続けた。ここから樹立した *Myst4* KO ES 細胞では、histone H3 のアセチル化レベルは、野生型に比べて変化はなく、ヘキスト染色の観察される核内ヘテロクロマチンのパターンにも顕著な変化は認められなかった。また、遺伝子発現パターンを qRT-PCR 法で検討したところ、主要な多能性関連遺伝子発現パターンは概ね維持されていた。これより、*Myst4* の機能は、ES 細胞の多能性維持とクロマチン状態の維持において必須ではないと結論された。

(3) Myst2:Myst4 ノックアウト ES 細胞の解析

上記の結果から、Myst2 と Myst4 の重複機能による機能代償の可能性が疑われた。そこで、ホルモン誘導型 Myst2 KO ES 細胞において、Crispr/Cas9 法により Myst4 を破壊し、さらにホルモンにより Myst2 ノックアウトを誘導することにより、Myst2:Myst4 重複ノックアウト ES 細胞を樹立した。これらの細胞は、細胞増殖速度が低下するものの、ES 細胞の形態を維持したまま増殖を続けた。また、histone H3 K14, H3 K27 のアセチル化レベルは、Myst2 KO に比べてさらに低下していたが、ヘキスト染色の観察される核内ヘテロクロマチンのパターンに顕著な変化は認められなかった。また、遺伝子発現パターンを qRT-PCR 法で検討したところ、Utf1 など一部の多能性関連遺伝子の発現量は低下していたが、主要な多能性関連遺伝子発現パターンは概ね維持されていた。これより、Myst2:Myst4 の重複機能は、ES 細胞の多能性維持とクロマチン状態の維持において必須ではないと結論された。

(4) Meaf6 ノックアウト ES 細胞の解析

Myst family は、5つのメンバーからなる (Myst1-4, Tip60)。これらのメンバーのうち、Myst2,3,4 は PHD finger protein (Brpf1-3, Jade1-3), Ing protein (Ing4, Ing5), Meaf6 からなる 4 量体で機能することが知られている。また、Tip60 は、この 4 量体を含む巨大複合体として機能する。これらの Myst 複合体群の重複機能が ES 細胞のクロマチン構造の規定に寄与しているとすれば、その解析には複合体群全体の機能欠損を誘導する必要がある。そこで、我々は、これら複合体で共有される、機能重複分子が存在しない単一の因子である Meaf6 に着目した。Meaf6 homolog は yeast からヒトまで存在することから、その機能は Myst 複合体活性に重要であると考えられるが、これまでにノックアウトマウスの作成は報告されていない。そこで、我々は、CAG-loxP-Meaf6-Ty1-loxP-DsRed-IRES-neo-pA を Rosa26 に挿入し、その後ホルモン誘導型 Cre 導入と Crispr-Cas9 による内在性 Meaf6 遺伝子破壊を同時に行うことで、簡便にホルモン誘導型 Meaf6 ノックアウト ES 細胞を作成した。この ES 細胞において、Meaf6 遺伝子破壊を誘導すると、ES 細胞は、細胞増殖速度が低下し、1 継代後には死滅した。この表現型は Myst2:Myst4 ノックアウト ES 細胞には見られない劇的なものであり、これよりその原因を追求することとした。

Meaf6 の発現は分化に伴う変化はなく、様々な細胞で恒常的に発現している。そこで、ES 細胞で確認された表現型の細胞種特異性を検討すべく、誘導型 Meaf6 ノックアウト ES 細胞にホルモン誘導型 Gata6 遺伝子を導入し、この活性化により原始内胚葉細胞への分化を誘導したのち、Meaf6 ノックアウトを誘導して、その効果を検討した。その結果、原始内胚葉細胞においても Meaf6 欠損は細胞増殖の停止をもたらしたことから、その効果は ES 細胞特異的なものではないと考えられた。

次に Meaf6 欠損がヒストンアセチル化に及ぼす影響を検討した。Meaf6 は Myst 複合体の共通因子であることから、その効果は Myst2:Myst4 KO より大きいことが推測された。しかし、ウエスタンブロットによる解析から、Meaf6 KO 誘導によるヒストンアセチル化の減少は極めてわずかであることが確認された。そこで、さらに、Meaf6 の欠損が Myst 複合体形成に与える影響を、抗 Myst2 抗体で免疫沈降した産物を、質量分析法で解析することにより、検討した。この結果、野生型 ES 細胞における免疫沈降産物には、PHD finger protein (Brpf1-3, Jade1-3), Ing protein (Ing4, Ing5), Meaf6 が全て含まれること、そして Meaf6 欠損細胞では、Meaf6 以外の全ての構成因子は沈降されてくることが明らかとなった。さらに、質量分析結果の定量的解析から、Meaf6 非存在下では、Myst2 と PHD finger protein (Brpf1-3, Jade1-3), Ing protein (Ing4, Ing5) との相互作用は強化されることが示唆され、この結果は western blot 法でも確認された。これらの結果は、Meaf6 は Myst 複合体形成には必須ではないが、その量的バランスの制御に必要であることを示す。

では、ES 細胞においては、Meaf6 は Myst 複合体でのみ機能しているのだろうか？これまで、Meaf6 を中心とした複合体解析は、Meaf6 に対する特異抗体が存在しなかったためか、報告がない。そこで、我々は Meaf6 KO 細胞で機能している外来性 Meaf6 遺伝子に添加された Ty1 タグを利用し、抗 Ty1 抗体を用いた免疫沈降産物を質量分析法で解析した。その結果、Meaf6 の相互作用は、Myst 複合体と、Tip60 を含む Trrap 複合体に限定され、それ以外の複合体との相互作用は検出されなかった。これより、Meaf6 の機能はこれら複合体の制御を介したものと結論された。以上の結果は、Meaf6 は、Myst 複合体の酵素活性そのものには必須ではないが、その相互作用のバランスを制御することにより、細胞増殖制御に寄与していることを示唆する。

Meaf6 は進化的に極めてよく保存された因子であるものの、これまでその機能は全く不明であった。本研究は、あらゆる生物種を通じて、その機能の一端を初めて明らかにしたものである。また、近年、子宮内膜間質肉腫(endometrial stromal sarcoma)において、MEAF6 との融合遺伝子(MEAF6/PHF1, MEAF6/SUZ12 など)が同定され、その癌遺伝子としての機能が推測されている。本研究は Meaf6 が細胞増殖促進に寄与することを示した初めてのものであり、今後の発がんにおける Meaf6 の機能解明に資するものと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Niwa, H.	4. 巻 145
2. 論文標題 The principles that govern transcription factor network functions in stem cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev157420
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/dev.157420	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丹羽 仁史
2. 発表標題 Molecular mechanism to generate heterogeneous gene expression in mouse ES cell population
3. 学会等名 第55回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Hitoshi Niwa
2. 発表標題 Functional analysis of Myst family histone acetyltransferase complex in mouse ES cells.
3. 学会等名 The 4th Symposium of the Inter-University research Network for Trans-Omics Medicine
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	岡野 正樹 (Okano Masaki)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 協力 者	松浦 公美 (Matsuura Kumi)		