

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657096

研究課題名(和文) ES細胞分化における概日リズム発生のエピジェネティック制御機構

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of circadian clock development during ES cell differentiation

研究代表者

土谷 佳樹 (Tsuchiya, Yoshiki)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：30456777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：哺乳類概日リズムの発生機構を明らかにするため、マウスES細胞における時計遺伝子Per2の転写調節領域のヒストン修飾状態を調べた。その結果、未分化ES細胞と分化誘導後の細胞では、Per2転写調節領域のヒストンH3のメチル化状態に違いがあることが分かった。また、未分化ES細胞におけるPer2の発現抑制に、ヒストン脱アセチル化酵素が関与していることを見出した。

これらの結果から、ES細胞におけるPer2の発現抑制に関与するエピジェネティック制御の一端が明らかとなった。本研究成果は、概日リズムの発生機構の解明に繋がることを期待される。

研究成果の概要(英文)：I demonstrated that the methylation state of histone H3 at the promoter region of Per2 gene in mouse ES cells is different between before and after ES cell differentiation. I also found that histone deacetylase activity is involved in the repression of Per2 expression in undifferentiated ES cells. These results suggest that epigenetic regulation of Per2 expression underlies development of the circadian clock during ES cell differentiation.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：概日リズム

1. 研究開始当初の背景

概日リズムはほぼ全ての生物に備わる約 24 時間周期の生体リズムである。ヒトにおいても、睡眠覚醒や代謝をはじめとしたさまざまな生理機能に概日リズムが観察されている。哺乳類においては、視床下部に存在する視交叉上核 (SCN) が概日リズム中枢であることが分かっており、SCN において一群の時計タンパク質が転写翻訳の負のフィードバックループを構成しており、Per1,2,3,Cry1,2 などの時計遺伝子の約 24 時間周期での発現リズムを生み出している。すなわち、転写因子 BMAL1/CLOCK のヘテロ二量体が Per, Cry の発現を促進し、産生した PER および CRY タンパク質が BMAL1/CLOCK の働きを抑制することで、負のフィードバックループを形成している。この転写フィードバックループは全身のほぼ全ての細胞にも存在しており、各細胞が自律的なリズムを刻んでいる。

このように、概日リズムは分化した多種多様な細胞に共通して備わっている基本機能であると言えるが、個体の発生過程において、概日リズムがいつどのように形成されるのかという点については依然として良く分かっていない。最近の研究から、マウスでは胎生 15 日目頃から細胞レベルでの概日リズムが観察されることが報告されており (Yagita et al. 2010)、転写翻訳ループが胎生期に形成されることが分かってきたが、その形成メカニズムは不明である。以前の研究で、マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) には概日リズムが観察されないことが明らかになり、また、ES 細胞分化の過程で概日リズムが形成されることが見出された。さらに、分化した線維芽細胞に Oct4, Sox2, Klf4, cMyc を導入してリプログラミングを誘導すると、概日リズムが消失することも明らかとなった。これらの結果は、概日リズムの形成と細胞の分化状態に何らかの関係があることを示唆している。

ES 細胞分化過程における時計遺伝子の発現レベルに関して、Per1, Per2, Clock の mRNA 発現量は分化誘導後に上昇しており、Cry1 の mRNA 発現量は分化誘導後に減少していることが報告されている。これらの時計遺伝子の発現量変化が分化過程における概日リズム形成に重要であるかどうかについては依然として不明であり、また、発現量の変化を引き起こす分子機構についても分かっていない。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究では、ES 細胞の分化過程における時計遺伝子発現のエピジェネティック制御機構を解析し、分化前と分化後の制御の違いをもたらす分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

マウス ES 細胞の培養

Bmal1-Luciferase レポーターを安定導入したマウス ES 細胞株 KY1.1 は以前の報告で作製された (Yagita et al. 2010)。Per2::Luciferase 融合遺伝子ノックインマウス由来 ES 細胞は Dr. Joseph Takahashi に分与いただいた (Yoo et al. 2004)。ES 細胞は 37°C, 5% CO2 条件下で ES cell medium (G-MEM (Wako), 15% FBS (Hyclone), 0.1 mM 非必須アミノ酸 (ナカライ), 0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Sigma), 1,000 U/mL LIF (Wako), 100 u/mL ペニシリン・ストレプトマイシン (ナカライ)) を用いて培養した。

ES 細胞の分化誘導

0.25%トリプシンで ES 細胞を処理した後、ゼラチンコートディッシュ上に播種して 20 分静置し、フィーダー細胞を除去した。その後、96well の低接着性丸底プレートに 2,000 細胞/well で播種し、分化用培地 (DMEM 高グルコース (ナカライ), 12% FBS, 1 mM ピルビン酸ナトリウム (ナカライ), 0.1 mM 非必須アミノ酸, 2 mM GlutaMAX I (Invitrogen) 0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Sigma), 100 u/mL ペニシリン・ストレプトマイシン (ナカライ)) で培養した。2 日後、胚様体 (EB) をゼラチンコートした 6well プレートに 5 個/well で移して培養を続け、2 日おきに培地を交換した。

クロマチン免疫沈降

細胞を PBS で洗い、cell lysis buffer (5 mM Tris-HCl (pH 8.0), 85 mM KCl, 0.5% NP-40) で溶解した。遠心後のペレットを nuclei lysis buffer (50 mM Tris-HCl (pH8.0), 10 mM EDTA, 1% SDS) に懸濁し、バイオラプター (東湘電機) で超音波処理 (30 秒×3 回) を行った後、20 kunitz units の micrococcal nuclease (NEB) で 37°C, 20 分処理した。遠心後の上清に IP dilution buffer (プロテアーゼ阻害剤を含む) を加え、ウサギ IgG (santacruz)、抗 Histone H3K4me3 抗体 (Abcam)、または抗 Bmal1 抗体と、Dynabeads protein G (Invitrogen) を加えて 4°C 一晚インキュベートした。ビーズを Low salt buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100) で 1 回、High salt buffer (20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM NaCl, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Triton X-100) で 1 回、LiCl wash buffer (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 250 mM LiCl, 2 mM EDTA, 1% deoxycholate, 1% NP-40) で 1 回、TE で 2 回 wash した後、Elution buffer (1% SDS, 50 mM NaHCO₃) で溶出した。その後、65°C で一晚処理して脱クロスリンクを行い、続いて RNase A 処理と Proteinase K 処理を行った。得られたゲノム DNA を PCR purification kit

(QIAGEN) で精製し、ChIP サンプルとした。インプット DNA も同様に処理し、精製した。

定量リアルタイム PCR

ChIP サンプル、目的領域を増幅するプライマーセット、および FastStart Universal SYBR Green Master (Roche) により Step One Plus (Life technologies) を用いてマニュアルに従い定量リアルタイム PCR を行った。

リアルタイム発光測定

Per2::Luc ノックイン ES 細胞をトリプシン処理し、フィーダー細胞を除去した後、24well プレートに播種した。翌日、培地に 0.2 mM ルシフェリンを加え、光増幅管 (PMT) を用いて発光を継続測定 (1 分間測定, 20 分間隔) した。HDAC 阻害剤の添加はルシフェリン添加の 4 時間後に行った。

4. 研究成果

分化による Per2 転写開始点近傍のヒストン H3K4 メチル化状態の変化

ES 細胞分化における概日リズム形成に、時計遺伝子の 1 つである Per2 の発現制御が関与するかどうかを調べるため、まず、Per2 プロモーターへの BMAL1 のリクルートを調べた。その結果、未分化な ES 細胞においても、BMAL1 が Per2 の E'-box に結合していることを示唆するデータを得た (図 1)。Per2 の発現レベルは分化誘導後に上昇することから、BMAL1 の E'-box への結合以外の要素が Per2 の発現レベルの変化を引き起こしていると考えられた。そこで、Per2 転写開始点近傍領域におけるヒストンの修飾状態を調べると、転写活性化の指標となるヒストン H3 の 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) レベルが分化後に高くなっていることが見出された (図 1)。このことは、ES 細胞において Per2 転写開始点近傍の H3K4 のメチル化が抑制されていることを示唆している。

HDAC による Per2 の発現抑制

ES 細胞において BMAL1 の Per2 E'-box への結合は分化後と同程度であったが、H3K4me3 のレベルが低くなっていたことから、エピジェネティック因子の関与が考えられた。ヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) は転写調節に関与するエピジェネティック因子であり、ES 細胞において高い活性を示すことが報告されている。そこで我々は、HDAC の活性を阻害することによって Per2 の発現抑制を解除することができるのではないかと考え、ES 細胞をさまざまな HDAC 阻害剤で処理し、Per2 の発現量を測定した。このとき、Per2 発現量をリアルタイムで測定できる系として、Per2::Luciferase 融合遺伝子のノックイン ES 細胞を用いた。Per2::Luc ES 細胞を種々の HDAC 阻害剤で処理したところ、TSA、Apicidin、Sodium butyrate (NaB) による濃

度依存的な PER2::LUC の活性上昇が見られた (図 2)。TSA は広範なクラス I, II HDAC を阻害し、Apicidin は HDAC2, 3, 8 特異的な阻害剤である。NaB は HDAC6, 10 以外に特異性が高い。また、NCFN-214 は HDAC3 特異的、NCT-10 は HDAC6 特異的、NCC-149 は HDAC8 特異的阻害剤である。クラス III HDAC である Sirt ファミリーの特異的阻害剤ニコチンアミド (NAM) は PER2::LUC 活性には影響しなかった。これらの結果から、特異的な HDAC サブタイプの活性阻害が Per2 の発現亢進を引き起こす可能性が考えられた。

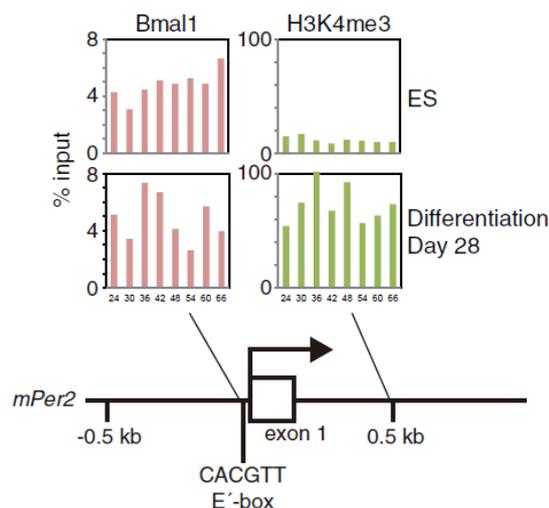


図 1. ES 細胞と分化誘導後細胞における Per2 プロモーターへの Bmal1 結合レベルと転写開始点直下のヒストン H3K4 トリメチル化レベル。グラフは 6 時間おきのデータを示している。

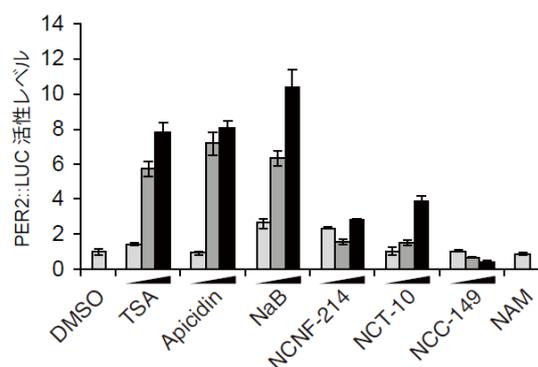


図 2. Per2 発現に与える HDAC 阻害剤の影響。HDAC 阻害剤添加後の PER2::LUC 活性のピーク値 (平均 ± 標準偏差, n = 4) を示す。

以上の結果から、ES 細胞における Per2 の発現抑制には Per2 転写開始点近傍のエピジェネティックな変化が重要であることが示唆された。Bmal1 の E'-box への結合レベルが分化前後で大きく変化しないことから、ES 細胞では Bmal1 の結合依存的な Per2 の転写活性化が起こっていない可能性が高い。HDAC 阻害剤を用いた実験から、ES 細胞では HDAC の

活性化により Per2 の転写活性化に必要なエピジェネティック変化が起こりにくい状態になっていると考えられる。Per2 の転写制御に関して、Sirt1 および HDAC1 の関与が報告されているが (Nakahata et al. 2008, DiTacchio et al. 2011)、ES 細胞における転写抑制機構についてはほとんど分かっていない。阻害剤のサブタイプ特異性から、ES 細胞における Per2 の発現抑制には HDAC2 が関与している可能性が高いと考えられる。この点について、今後 HDAC2 ノックダウンやノックアウト細胞を用いて詳細に解析する必要があるだろう。また、Per2 の発現レベルは分化誘導開始から 5 日後には既に上昇しているが、発現にリズムが観察され始めるのはそれよりもかなり遅いタイミングであることが分かっている。したがって、分化誘導をトリガーとする Per2 の発現抑制解除だけでは概日リズムの形成には不十分であると考えられる。今後、Per2 を含む時計遺伝子群の分化に伴う発現調節機構および機能制御機構についてのさらなる研究により、細胞分化と概日時計形成を結ぶ分子基盤が明らかになることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 佳樹 (TSUCHIYA, Yoshiki)

京都府立医科大学・大学院医学研究科・講師

研究者番号：30456777