

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32689
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2013～2015
課題番号：25850219
研究課題名(和文) エピジェネティクスによるNodal遺伝子制御機構の再描画

研究課題名(英文) Study on epigenetic regulation of Nodal gene

研究代表者

新井 大祐 (Arai, Daisuke)

早稲田大学・理工学術院・講師

研究者番号：20624951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：Nodal遺伝子は胚発生期に必須の役割を果たす一方で、成体では発現が完全に抑制され、再活性化はがんの悪性化に寄与する。我々はエピジェネティクスの観点からNodal遺伝子の制御機構を研究した。マウスNodal遺伝子の転写開始点上流にDNAメチル化可変領域を同定し、EREと命名した。EREは胚性幹細胞においてNodal遺伝子の発現を誘導する新規の制御領域であった。分化した細胞ではEREのヒストンH3K27トリメチル化がNodal遺伝子の発現抑制に必須であることを確かめた。またEREはヒトにも保存されており、がん細胞ではH3K27トリメチル化が減少していた。

研究成果の概要(英文)：Nodal gene plays essential roles in embryonic development. Meanwhile, expression of Nodal gene is strictly repressed in adults, and reactivation of Nodal gene is thought to contribute to malignant transformation. In this project, we investigated mechanisms for regulation of Nodal gene in terms of epigenetics. We found a region exhibiting dynamic changes in DNA methylation at upstream of transcriptional start site of mouse Nodal gene. This region, termed ERE, was a novel regulatory element that induced expression of Nodal in mouse embryonic stem cells. We confirmed that trimethylation of histone H3 lysine 27 (H3K27me3) at ERE was required for transcriptional repression of Nodal gene in differentiated cells. Furthermore, ERE is conserved in human genome, and H3K27me3 was decreased at ERE in human cancer cells.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：Nodal エピジェネティクス ヒストン修飾 細胞分化 がん

1. 研究開始当初の背景

Nodal は TGF-スーパーファミリーに属する成長因子の一つで、脊椎動物の初期発生に極めて重要な役割を持つ。そのため、*Nodal* 自身の突然変異や、上流の制御系の異常による *Nodal* の発現異常は、重篤な先天性疾患を引き起こす。*Nodal* の発現制御機構を解明することは、発生学の観点のみならず、先天性疾患の病因解明という点からも重要である。

これまでに *Nodal* の発現をコントロールする複数の制御領域が同定され、その活性化を担うシグナル伝達経路と転写因子が明らかにされてきた。しかし、*Nodal* の遺伝子発現パターンは既知の制御機構、すなわち制御領域とシグナル伝達・転写因子の組合せでは説明しきれない部分があり、既知の制御領域を適切に活性化・抑制する別の制御機構や、未報告の制御領域の存在が予想された。

我々は以前にメダカを用いた研究から、エピジェネティクスの主要な制御因子であるポリコム (PcG) タンパクが *Nodal* の制御ならびに左右軸形成に重要であることを明らかにした (Arai et al., Genes Cells, 2009; Arai et al., Dev. Biol., 2010)。さらに、マウスの *Nodal* 転写開始点上流に、組織間で異なる DNA メチル化状態を示す領域 (T-DMR) を見出し、新たな制御領域 (Epigenetic regulatory element, ERE) として同定した。ERE は内部細胞塊やそれに相当する胚性幹細胞 (mESC) において *Nodal* の発現を誘導していた。また ERE では、細胞分化に伴う *Nodal* の発現低下と並行して、DNA メチル化の亢進とクロマチン凝縮が起っていた。これらの知見は、ERE やその他の領域を標的としたエピジェネティック機構が *Nodal* の発現制御に重要な役割を担っていることを示唆した。

2. 研究の目的

Nodal の発生特異的 DNA メチル化領域のエピジェネティック制御機構と、その意義を明らかにする。そのために、以下の課題に取り組む。

(1) *Nodal* ならびに周辺ゲノム領域の DNA メチル化状態を、初期胚の各組織や *in vitro* 分化細胞など様々な細胞種において調べることで、*Nodal* の T-DMR を漏れなく同定し、またメチル化状態の変化を明らかにする。

(2) *Nodal* T-DMR における他のエピジェネティック制御 (ヒストン修飾など) を解析し、相互関係を明らかにして、エピジェネティック制御の全体像を示す。

(3) ERE を制御する転写因子、ERE やその他 T-DMR を制御するエピジェネティック因子を決定する。それら因子や DNA メチル化酵素の機能阻害・過剰発現により、T-DMR がどのような影響を受けるかを解析する。

3. 研究の方法

(1) 培養細胞

マウス ES 細胞 (mESC) は MS12 株を用いた。マウス胚性繊維芽細胞 (MEF) は 14.5 日胚から単離して用いた。ヒト正常細胞として乳腺管腔上皮細胞 (MLEC) を、がん細胞として SH-SY5Y、MDA-MB-231、HeLa を用いた。培養、分化はすべて既報に従って行った。

(2) エピジェネティック解析

DNA メチル化状態はバイサルファイトシークエンス法により、ヒストン修飾状態はクロマチン免疫沈降法により、クロマチン凝縮状態は EpiQ Chromatin Analysis Kit (Bio-Rad 社) を用いて解析した。

(3) ERE の転写誘導活性

任意の DNA 配列を上流に組み込んだルシフェラーゼ遺伝子のプラスミドを細胞に一過的に導入し、ルシフェラーゼアッセイにより転写誘導活性を測定した。遺伝子ノックダウンは、上記のプラスミドと同時に shRNA 発現プラスミドを導入することにより行った。

(4) 遺伝子発現解析

キットを用いて抽出した Total RNA から Oligo dT プライマーにより cDNA を合成し、アガロース電気泳動、あるいはリアルタイム PCR 法により PCR 産物量を解析した。

4. 研究成果

(1) *Nodal* の T-DMR 解析

Nodal の転写開始点周辺や既知の制御領域 (ASE、NDE、PEE) の DNA メチル化状態を解析した結果、発生に伴うメチル化の変化が認められたが、ERE と比較するとかなり緩やかな変化であった。よって、ERE が *Nodal* エピジェネティック制御の主要な標的である可能性が示唆された。

(2) ERE を制御する転写因子群

ERE の中でも mESC でクロマチンが特に弛緩している領域に Oct3/4 結合モチーフが存在することを見出した。Oct3/4、ならびに Oct3/4 と複合体を形成していることが知られる Nanog、Med12 のノックダウンにより、ERE の転写誘導活性が著しく低下した。以上より、Oct3/4 を中心とする複合体が ERE を介して *Nodal* の転写を誘導していることが示された。

(3) ヒストン修飾による ERE の制御

ERE は mESC から胚様体への分化に伴い、抑制型のヒストン修飾である H3K27 トリメチル化を受けることを明らかにした。このとき、H3K27 トリメチル化を行う酵素である PcG タンパクの Ezh2 も ERE に共局在していた。そこで胚様体形成の過程に Ezh2 の阻害剤である DZNep を添加したところ、*Nodal* の発現が上昇したことから、Ezh2 による ERE の H3K27 トリメチル化が、細胞分化に伴う *Nodal* の抑制に必要であることが示された。

Nodal の発現は胚発生の途中で消失し、以後は胚、成体のほとんどの組織で完全に抑制されている。実際、発生後期のマウスに由来する線維芽細胞 (MEF) では *Nodal* の発現は検出されなかった。しかし、MEF を DZNep 処理したところ、*Nodal* の発現が認められた。DZNep 処理により ERE の H3K27 トリメチル化は減少していたが、ERE に結合して *Nodal* の転写誘導を行う Oct3/4 や Nanog の発現量は変化していなかった。すなわち、*Nodal* の長期安定な抑制には、Ezh2 による ERE の H3K27 トリメチル化が決定的な役割を果たしていることが判明した。

(4) ヒト正常細胞・がん細胞における ERE のエピジェネティック制御

ヒト *NODAL* 遺伝子 (以下 *hNODAL*) にも ERE の配列は保存されていた。*hNODAL* の再活性化ががんの悪化に関与しているという報告に基づき、ヒトの正常細胞ならびに3種のがん細胞における ERE のエピジェネティック状態を解析した。*hNODAL* の発現は正常細胞では完全に抑制されていたが、2種のがん細胞で発現が認められた。さらに、3種すべてのがん細胞において、ERE の H3K27 トリメチル化が減少していることを確かめた。以上より、ERE のエピジェネティック異常が *hNODAL* の再活性化に関与している可能性が示された。

以上を総括すると、ERE はマウス、ヒトに共通する *Nodal* エピジェネティック制御の標的領域であり、特に H3K27 トリメチル化が分化細胞における ERE の抑制に必須であるという、*Nodal* の新たな制御機構を明らかにした。さらに当初の研究計画では想定していなかった成果として、ERE の H3K27 トリメチル化の減少がヒトのがん細胞における *hNODAL* の異常発現に寄与している可能性も見出し、*Nodal* のエピジェネティック制御が持つ生理的意義を示すことができた。これらの成果をまとめて、*Mechanisms of Development* 誌上にて報告した (Arai et al., 2015)。

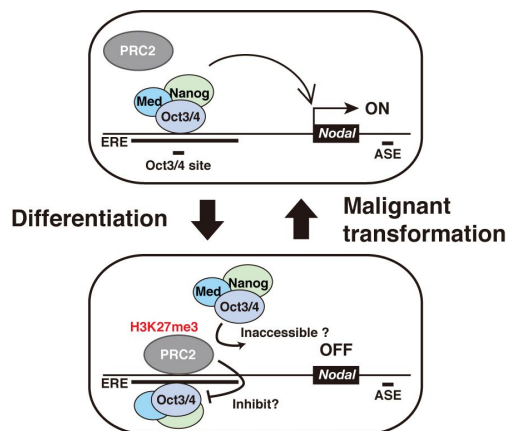


図1 ERE による *Nodal* エピジェネティック制御モデル

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)

[雑誌論文](計1件)

Daisuke Arai, Koji Hayakawa, Jun Ohgane, Mitsuko Hirose, Yoichi Nakao, Satoshi Tanaka, Kunio Shiota
An epigenetic regulatory element of the *Nodal* gene in the mouse and human genomes.
Mechanisms of Development **136**, 143-154, 2015.
doi:10.1016/j.mod.2014.12.003
(査読あり)

[学会発表](計4件)

Daisuke Arai, Chiaki Sakuma, Yoko Hayashi-Takanaka, Hiroshi Kimura, Yoichi Nakao
Marine natural products that control a specific set of histone modifications. The 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2015年12月15日~20日
Honolulu, USA

Daisuke Arai, Chiaki Sakuma, Kind K. Kanto, Yoko Hayashi-Takanaka, Hiroshi Kimura, Yoichi Nakao
Marine natural products that control a specific set of histone modifications. 第40回内藤コンファレンス 2015年9月15日~18日
シャトレーゼガトーキングダム (札幌)

新井大祐、早川晃司、大鐘潤、中尾洋一、田中智、塩田邦郎
Epigenetic regulation of *Nodal* gene expression in the embryonic stem cell.
第7回日本エピジェネティクス研究会年会 2013年5月30日~31日
東京大学伊藤国際学術研究センター (東京)

新井大祐、大鐘潤、田中智、塩田邦郎
Epigenetic regulation of *Nodal* gene expression in the embryonic stem cell.
第8回日本エピジェネティクス研究会年会 2014年5月25日~27日
奈良県新公会堂 (奈良)

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況 (計0件)
取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.chem.waseda.ac.jp/nakao/top.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

新井 大祐 (Daisuke Arai)

早稲田大学・理工学術院総合研究所・次席
研究員

研究者番号：20624951

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし