

平成 30 年 6 月 24 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26860860

研究課題名(和文)胎児脳におけるヒストンアセチル化修飾を介した神経細胞分化制御機構の解析

研究課題名(英文)Mechanisms underlying regulation of mammalian neuronal differentiation via histone acetylation

研究代表者

爪 麻美 (Tsume, Mami)

地方独立行政法人大阪府立病院機構大阪母子医療センター(研究所)・病因病態部門・研究技術員

研究者番号：70711026

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文):マウス胎児脳の初期発生過程において、神経幹細胞は自己複製を行うとともに神経細胞を産生するが、この過程にヒストンアセチル化修飾がどのように関わっているかはよく分かっていない。本研究では、プロモドメインを介してヒストンアセチル化修飾に結合し、転写制御に働くことが示唆されているBETファミリータンパク質(BET)に着目した。BETが結合するH4K5acとH4K12acの発現パターンを解析すると、神経幹細胞のS期で強く発現することが分かった。さらに、BETの機能を阻害する化学薬剤を用いた解析から、BETは幹細胞の未分化性維持に重要な役割を果たす遺伝子群の転写に必要であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文): During mammalian early neurogenesis, neural stem/progenitor cells proliferate by self-renewal and differentiate into neurons in a developmental-stage dependent manner, but the roles of histone acetylation in maintenance of stemness and neurogenesis remain unclear. In this study, I analyzed roles of BET family proteins (BET), which specifically bind to lysine residues of acetylated histone H4 through their bromodomains and regulate transcription. I found that BET binding acetylated histones such as H4K5ac and H4K12ac were up-regulated in S-phase of neural progenitor cells specifically. By exploiting a BET inhibitor that blocks the binding to acetylated histones, I also identified that BET is required for the transcription of genes involved in maintenance of stem cells.

研究分野：発生生物学

キーワード：ヒストンアセチル化 BETファミリータンパク質 幹細胞 マウス

1. 研究開始当初の背景

神経幹細胞は、自己複製能を持ち、発達期の脳において神経細胞やグリア細胞の供給を行い、脳の発生に重要な役割を果たしている。マウス胎児の脳の初期発生過程では、神経幹細胞は胎生 8.5 日目頃から神経上皮細胞として認められ、最初は対称分裂をくり返すことで増殖するが、胎生 10 日目までに放射状グリア細胞となり、非対称分裂を行うことで神経細胞を産生するようになる。これらの神経幹細胞の自己複製と細胞分化は、*Hes1/5* や *Neurogenin1/2* などの bHLH (basic helix-loop-helix) 型転写因子の発現調節や、DNA のメチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな遺伝子発現制御などによって厳密にコントロールされている。特に、ヒストン修飾に関しては、ヒストン H3 やヒストン H4 の N 末側のリジン残基 (K) に付加されるメチル化修飾によって、遺伝子発現の ON/OFF が制御され、H3K9 や H3K27、H4K20 のメチル化は転写抑制へ、H3K4 のメチル化は転写活性化へ働くことが知られている。その一方で、ヒストンのアセチル化修飾は、転写が活性化されている遺伝子領域で豊富に見られることが分かっているが、実際に幹細胞の維持や分化、細胞運命決定においてどのような役割を果たすのかはよく分かっていない。

2. 研究の目的

我々はこれまで、ヒストンアセチル化修飾に結合することのできる BET ファミリータンパク質 (BET) に着目し、研究を行ってきた。BET は N 末側に 2 つのプロモドメインと C 末側に 1 つの ET ドメインを持つタンパク質で、酵母からショウジョウバエ、マウス、ヒトにわたって広く保存されている。BET はプロモドメインを介してヒストン H4 の 5、8、12、16 番目のリジンアセチル化修飾 (H4K5ac/K8ac/K12ac/K16ac) に特異的に結合し、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) が行う遺伝子の転写活性化を仲介する役割を担い、転写制御に働くことが示唆されている。マウスでは、BET は体細胞で発現する Brd2、Brd3、Brd4 と生殖系列で特異的に発現する Brdt が知られている。

我々は以前、*Brd2* 遺伝子を欠損したマウス胚の解析を行い、胎児期の脳神経上皮において、Brd2 タンパク質が神経細胞の分化に必要であることを報告した (Tsume *et al.*, 2012)。しかしながら、以前の結果からは、Brd2 がヒストンアセチル化修飾を介して、どのように転写を制御し、神経幹細胞や神経細胞の細胞分化制御を行っているかについては明らかになっていない。そこで本研究では、BET が関与するヒストンアセチル化修飾とその後の転写の制御が、どのように未分化な神経幹細胞から神経細胞への分化に役割を果たしているかについて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 神経分化過程におけるヒストン化学修飾の発現パターンの解析

マウス胚の前脳 (終脳) 領域において、自己複製を行っていた神経上皮細胞が神経細胞の産生を開始する前後の時期 (胎生 9.5 日目から 12.5 日目) を追って、ヒストン化学修飾を特異的に認識する抗体を用いた免疫染色を行い、未分化な神経上皮細胞と分化した神経細胞でヒストン化学修飾パターンにどのような違いがあるかについて調べた。未分化な神経上皮細胞は anti-Sox2 抗体を、分化した神経細胞は anti-TUJ1 の抗体を用いて区別した。アセチル化ヒストンについては、BET ファミリーが結合する H4K5ac、H4K8ac、H4K12ac、H4K16ac について解析した。また、代表的な転写抑制マーカーであるヒストンメチル化修飾 (H3K27 のトリメチル化、H4K20 のトリメチル化) および転写活性マーカー (H3K4 のトリメチル化) についても発現パターンを解析した。神経上皮細胞において特異的なパターンが見られたヒストン修飾抗体に関しては、細胞周期に関する抗体や BrdU の取り込みにより、どのような細胞であるか決定した。さらに、マウス胎児脳の初期神経発生過程モデルとして、P19C6 細胞を導入し、レチノイン酸添加による神経分化誘導系を立ち上げ、マウス個体と同様にヒストン修飾パターンを解析した。

(2) ヒストンアセチル化修飾に結合する BET の神経分化過程における機能解析

P19C6 細胞の神経分化誘導系に BET 機能阻害剤を添加して培養し、神経幹細胞の増殖・維持や神経分化にどのような影響が見られるか、免疫染色法にて解析した。BET の機能阻害剤として、BET のプロモドメインとヒストンアセチル化修飾との結合を阻害する (+)-JQ1 (以下、JQ1) を用いた。また、BET はヒストンアセチル化修飾を介して転写制御に働くことが知られているので、JQ1 処理によってどのように転写の状態が変化するかについて解析した。具体的には、Pol II の C 末は 7 つのアミノ酸の繰り返し配列からなるが、5 番目のセリンリン酸化 (pSer5) は転写開始に、2 番目のセリンリン酸化 (pSer2) は転写伸長の促進に働いていることが知られているため、それぞれのリン酸化に特異的な抗体を用いて免疫染色を行った。さらに、核内における転写状態を可視化するために、RNA 蛍光 *in situ* hybridization (RNA-FISH) を行った。蛍光プローブはイントロン配列を含むように設計することで、新規に転写された未成熟な (スプライシングを受けていない) RNA のみを検出するようにした。

(3) ヒストンアセチル化修飾に結合する BET の標的遺伝子の網羅的な解析

BET のヒストンアセチル化修飾を読み取る機能を阻害 (JQ1 処理) し、発現変動が見られる遺伝子を網羅的に調べるために、マイクロアレイを行った。マイクロアレイで得られたデータは有意差検定を行い、コントロール群と JQ1 処理群で 1.9 倍以上の発現差があった遺伝子を抽出した。マイクロアレイで顕著に発現が低下した遺伝子については、特異的な領域をクローニングしてプローブを複製し、ホールマウント *in situ* hybridization を行った。さらに、JQ1 処理によって発現変動した遺伝子群はどのような特徴を持っているか、またどのようなシグナル経路と関わりがあるかについて調べるために、Ingenuity Pathway Analysis (IPA) を行った。

4. 研究成果

(1) 神経分化過程におけるヒストン化学修飾の発現パターンの解析

BET が結合するアセチル化修飾の中でも、H4K5ac および H4K12ac は、神経上皮細胞と神経細胞の両方で核内のユークロマチン領域にシグナルが見られ、特に神経上皮細胞では BrdU を取り込む S 期の細胞で強い発現を示した。一方で、H4K8ac や H4K16ac は上記の特異的な発現パターンは認められず、神経上皮細胞と神経細胞で発現に大きな差異は見られなかった。次に、転写抑制化に関与する H4K20me3 やポリコームタンパク質が結合する H3K27me3 は、神経細胞で強い発現を認め、特に DAPI で強く染色されるヘテロクロマチン領域で非常に強く染まっていた。その一方で、転写活性化の目印である H3K4me3 は、神経上皮細胞と神経細胞において特に発現の変化を認めなかった。P19C6 細胞の神経分化誘導系においても、神経幹細胞および神経細胞で、マウス胚と同様のヒストン修飾パターンを認めた。

(2) ヒストンアセチル化修飾に結合する BET の神経分化過程における機能解析

P19C6 細胞の神経分化誘導系で JQ1 処理を行ったところ、BET が特異的に結合するヒストンアセチル化修飾 (H4K12ac など) に関しては、神経幹細胞および神経細胞ともに、特に発現の差異は認められなかった。ところが、Pol のリン酸化の状態変化に関して、特に神経幹細胞では、転写開始に関わる Pol II C 末端ドメインセリン 5 番目のリン酸化シグナル (Pol II pSer5) が核内で局所的に強く集積しており、その集積数も増加する傾向にあった。さらに、未分化性維持に関わる Oct3/4 タンパク質の発現低下も認められた。これらのことから、BET におけるヒストンアセチル化修飾の読み取り機能を阻害することで、未分化幹細胞の維持に関連する遺伝子の転写に影響が見られることが示唆された。

JQ1 処理によって、未分化幹細胞に対して特異的に異常が認められたため、未分化幹細胞

の解析や観察により適しているマウス胚盤胞 (受精後 3.5 日目) の培養も同時に立ち上げた。マウスの胚盤胞は、細胞数が 32~64 細胞と非常に少なく、全ての細胞の観察が可能で、細胞系譜もよく知られており、個体を用いた未分化幹細胞の解析に優れた材料である。受精後 3.5 日目の胚盤胞では、外側の細胞は栄養外胚葉へ分化し、内側に存在する未分化性を持った内部細胞塊 (Inner Cell Mass: ICM) は、エピプラストまたは原子内胚葉へ分化する過程にある。この胚盤胞を JQ1 を添加して培養したところ、ICM の核内で Pol II pSer5 シグナルが集積し、ICM やエピプラストの未分化性維持に関わる Nanog タンパク質の発現が消失した。これらの結果は、P19C6 細胞で得られた結果とよく一致していた。次に、JQ1 処理で見られた遺伝子の発現低下は、転写の異常が原因であるかについて調べるために RNA-FISH を行った。RNA-FISH と組み合わせ、遺伝子座の位置を特定できる DNA-FISH も行い、RNA-FISH のシグナルが目的の遺伝子座における転写産物を見ていることを確認した。JQ1 処理した胚盤胞の ICM の核内では、Nanog の蛍光シグナルが消失したことから、RNA の転写が停止していることが分かった。

以上の結果から、神経幹細胞とマウス胚盤胞のどちらにおいても、BET はヒストンアセチル化修飾を介して未分化幹細胞の維持に働くことが示唆された。

(3) ヒストンアセチル化修飾に結合する BET の標的遺伝子の網羅的な解析

これまでの結果を考慮して、材料は未分化幹細胞を個体で解析するのに適しているマウスの胚盤胞を用いた。およそ 100~200 個のマウス胚盤胞を一度に回収し、DMSO 処理 (コントロール) または JQ1 処理を行い、RNA を抽出した (これを 1 サンプルとし、n=3 ずつ集めた)。マイクロアレイの結果、コントロール群と JQ1 処理群で発現差が 1.9 倍以上の遺伝子は、発現低下した遺伝子が 357 遺伝子、発現亢進した遺伝子は 141 遺伝子で、発現が低下した遺伝子の方が多かった。そこで、発現が低下した遺伝子群に着目したところ、これらの遺伝子群には幹細胞の形成・維持に重要な役割を果たす Nanog 遺伝子が含まれていた。さらに、発現低下した遺伝子の中で上位にあった遺伝子 *Arid5b*、*Pramel6*、*Pramel7*、*Trim43a* についてホールマウント *in situ* hybridization による解析を行った。その結果、これらの遺伝子は特に ICM で強い発現を示し、JQ1 処理した胚盤胞では、マイクロアレイの結果と同様に発現低下することが確認できた。

次に、マイクロアレイで得られたデータを用いて、BET ファミリータンパク質のヒストンアセチル化修飾への結合を阻害したときに発現変動する遺伝子群が、どのような生物学的機能を持っているかについて、IPA を行

った。その結果、BET の機能阻害によって発現が低下した遺伝子群は、胚性幹細胞の分化多能性や転写制御に関わる遺伝子群であること、さらには JAK/STAT シグナル経路と関連していることが分かった。

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)

[学会発表] (計 2 件)

爪 麻美、木村 - 吉田 千春、上田 陽子、持田 京子、松尾 勲
BET ファミリータンパク質を介したマウス着床前胚の細胞運命制御
2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017)
2017 年 12 月
神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)

Mami Tsume, Chiharu Kimura-Yoshida, Yoko Ueda, Kyoko Mochida, Isao Matsuo
Regulation of cell fate via BET family proteins in mouse preimplantation embryos
International Young Scientists Workshop on Neural Development & Stem Cells 2018
2018 年 3 月
関西セミナーハウス (京都府京都市)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

爪 麻美 (TSUME, Mami)
地方独立行政法人 大阪母子医療センター
(研究所) ・ 病因病態部門 ・ 研究技術員
研究者番号 : 70711026