

令和 6 年 6 月 6 日現在

機関番号：17401

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2019～2023

課題番号：19H05748

研究課題名（和文）クロマチン複製における転写因子ネットワークの継承機構の解析

研究課題名（英文）Analysis of Inheritance Mechanism of Transcription Factor Networks in Chromatin Replication

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） 77,300,000円

研究成果の概要（和文）：マウスES細胞を用いて、遺伝子発現を制御する転写因子ネットワーク活性が、細胞分裂を経て継承される機構を解析した。repli-ATAC-seq法によりS期新生鎖への転写因子結合解析を行い、DNA複製後の転写ネットワーク活性再構築には、KLF2/4/5による遠位エンハンサー領域の活性化と、その結果としての遺伝子発現変化に伴うプロモーター領域のアクセシビリティ変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。また、新規M期染色体結合転写因子としてDppa2を同定し、これがPCGF6-PRC1ポリコーン群複合体と拮抗して標的遺伝子の新規メチル化を制御していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞が分裂を経て同じ表現型の細胞を生み出すためには、特定の遺伝子発現パターンを規定する転写因子ネットワークの活性が継承される必要がある。本研究では、転写因子ネットワークに含まれる特定の転写因子が、この過程に重要な役割を果たすことが示唆された。このような制御機構には普遍性があることが想定されるので、基礎生物学の進展と、細胞工学的分化転換技術の理解と改良に寄与する地検になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Using mouse ES cells, we analyzed the mechanism by which transcription factor network activity regulating gene expression is inherited through cell division. The repli-ATAC-seq analysis of transcription factor binding to the S-phase nascent strand revealed that KLF2/4/5-mediated activation of distal enhancer and the resulting change in accessibility of the promoter region associated with the change in gene expression play an important role in the restructuring of transcriptional network activity after DNA replication. We also identified Dppa2 as a novel M-phase chromosome-binding transcription factor, which antagonizes the PCGF6-PRC1 polycomb group complex to regulate novel methylation of target genes.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：転写因子ネットワーク 細胞複製 細胞周期

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

マウス個体は250種類以上の細胞からなる。細胞の分化形質は、ゲノムにコードされる遺伝子のうち、特定のセットが発現することにより規定される。細胞種ごとの特異的遺伝子発現パターンは、細胞種特異的に発現する一群の転写因子と、発生過程に形成されたエピジェネティックパターンにより制御される、それらの標的遺伝子の結合許容性により決定される。細胞種特異的転写因子群の発現は、それらの相互制御状態が、特定の細胞外シグナル入力下で安定に維持されることにより達成される。このような転写因子群のシグナル入力依存的な相互制御状態は、「転写因子ネットワーク」と呼ばれる(Niwa, Development, 2018)。分裂能を喪失した終末分化細胞においては、転写因子ネットワークは複製される必要はない。しかし、増殖能を持つ細胞においては、転写因子ネットワーク活性もまた、正確に複製されて娘細胞へと継承される必要がある。また、一方で、分裂を伴い細胞が分化するときには転写因子ネットワークは元の状態から別の状態へ遷移しなければならない。我々は、このような転写因子ネットワークの維持と遷移について、マウス胚性幹細胞(embryonic stem cells: ES細胞)を用いて解析してきた。この過程で、ES細胞の多能性を維持する転写因子ネットワークの構造(Niwa et al, Nature, 2009; Yamane et al, Development, 2018)や、その栄養外胚葉幹細胞(trophoblast stem cells: TS細胞)への分化に伴う遷移(Niwa et al, Cell, 2005; Adachi et al, Mol Cell, 2013)を解析してきた。そして、これらの知見を踏まえ、「転写因子ネットワーク」の概念の明確化を目指した総説を執筆した(Niwa, Development, 2018)。しかし、ゲノム複製と転写因子ネットワーク活性の維持ないしは遷移が、どのような分子機構で制御されているのかは、極めて重要な問題であるにもかかわらず、未だに明らかにはできていない。そこで、本計画研究においては、新学術領域の連携を生かし、この問題にチャレンジすることとした。

### 2. 研究の目的

ゲノムの複製にあたっては、ゲノムDNAはクロマチン構造を解かれ、そこを複製フォークが進行する。このとき、ゲノムに確率的に結合していた転写因子は、結合を解除されると考えられる。本研究では、ゲノム複製にリンクした転写因子ネットワーク活性維持の分子機構について解析することを目指す。具体的には、S期のDNA複製後どのタイミングで転写因子のゲノムへの結合が回復するのか、あるいはこれが分化に伴う遷移過程で起きたときには、DNA複製後の転写因子の結合動態はどのように変化するのかを解析する。また、分裂期の細胞における転写因子ネットワーク活性の継承については、M期染色体に継続的に結合する特定の転写因子の、いわゆるmitotic bookmarking活性が寄与しているとの仮説がある。これについても、新規M期染色体結合転写因子を同定し、機能解析を行う。さらに、可逆的な転写因子ネットワーク遷移モデルとして、ES細胞の2細胞期様細胞への転換を制御する転写因子の機能解析を行い、そのネットワーク性を解明する。

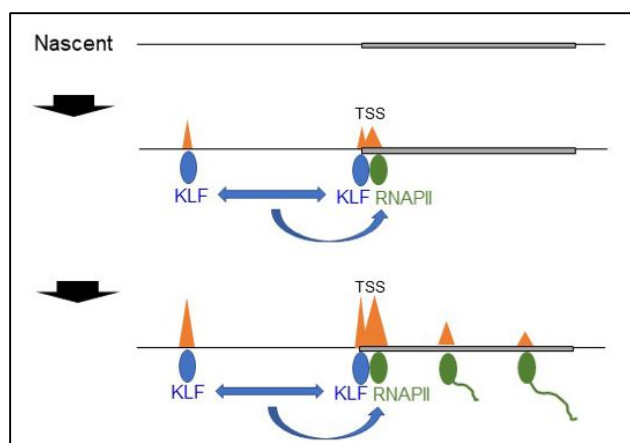
### 3. 研究の方法

S期新生鎖への転写因子結合を解析する方法として、EdU取り込みでラベルされたDNAを特異的にATAC-seqで解析するrepli-ATAC-seq法を用いた。これによって結合回復の端緒となる転写因子候補を同定し、誘導型遺伝子ロックアウトを組み合わせることにより、その機能の解析を行った。また、候補転写因子の免疫染色により、新規M期染色体結合転写因子を同定し、遺伝子ロックアウトにより、その機能を解析した。2細胞期様細胞への転換を詳細に時系列解析することにより、その制御する転写因子のネットワーク性を解析した。

### 4. 研究成果

#### (1) S期新生鎖への転写因子結合解析

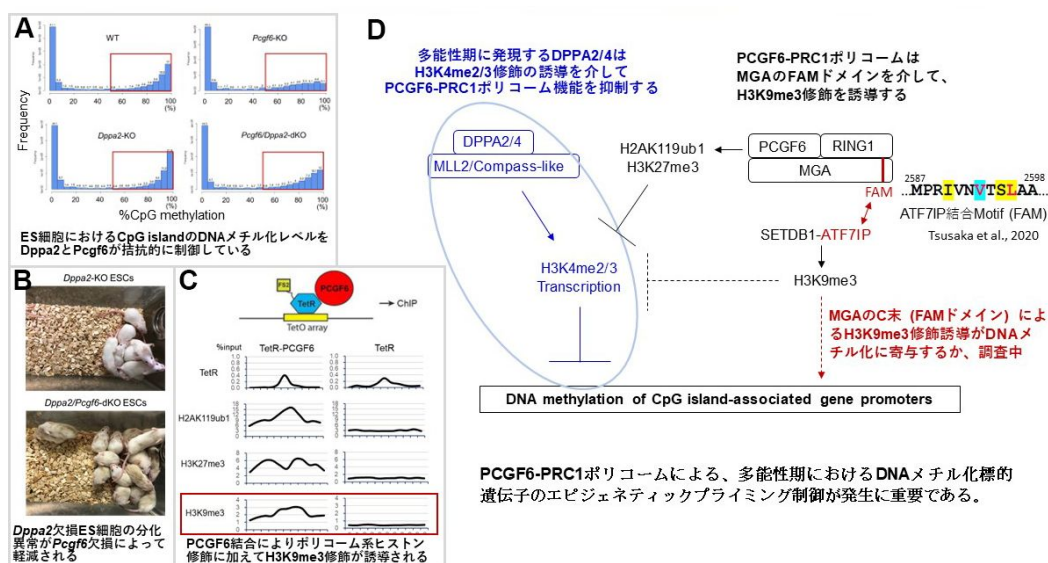
repli-ATAC-seq法により、早期に転写因子結合が回復する領域において、Klf結合配列が濃縮しているとの既報の結果を確認した。そこで、Klf2/4/5欠損ES細胞を用いたrepli-ATAC-seq解析の結果、Klf2/4/5を欠損させると、プロモーターから離れたKLF4/5結合領域において、DNA複製後のTn5アクセシビリティ回復が顕著に抑制され、2時間経過後も定常状態のレベルまで回復しないことが分かった。一方で、プロモーター領域におけるアクセシビリティ回復の変化は、KLF4/5結合よりも、むしろKlf2/4/5欠損による遺伝子発現変化と



相関していた。すなわち、*Klf2/4/5* 欠損で発現が低下する遺伝子のプロモーター領域では、DNA複製後の Tn5 アクセシビリティ回復が遅れ、発現が増加する遺伝子のプロモーター領域では早期に回復した。以上の結果から、マウス ES 細胞において DNA 複製後の転写ネットワーク活性再構築には、*KLF2/4/5* による遠位エンハンサー領域の活性化と、その結果としての遺伝子発現変化に伴うプロモーター領域のアクセシビリティ変化が重要な役割を果たしていることが示唆された。

## (2) 新規 M 期染色体結合転写因子の機能解析

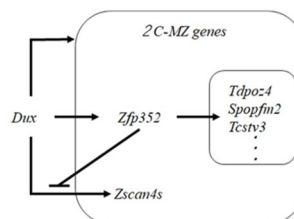
免疫染色法により、転写因子 *Dppa2*, *Dppa4* が M 期染色体に結合していることを見出した。これらの転写因子はヘテロ複合体として機能していることから、*Dppa2* についてノックアウト ES 細胞を作成し、その機能解析を行った。*Dppa2* 欠損 ES 細胞は正常に増殖を続けるが、既報通り 2 細胞期様細胞への転換が完全に抑制されていた。また、*Dppa2* 欠損 ES 細胞はキメラ寄与能に異常が見出された。さらに、*Dppa2* 欠損 ES 細胞では、ゲノム DNA メチル化の亢進が認められた。そこで、この細胞のエピジェネティック制御について詳細な解析を行ったところ、*Dppa2* はヒストン H3K4me2/3 修飾の誘導を介して、ゲノム DNA メチル化を抑制していることが示唆された。一方で、我々がこれまで解析してきた PCGF6-PRC1 ポリコーム群複合体の欠損 ES 細胞は、ゲノム DNA メチル化の低下が起こっていた。そこで、これらの制御の関係性を遺伝学的に解析したところ、*Dppa2* 欠損により誘導されるゲノム DNA メチル化の亢進は *Pcgf6* 欠損により正常化した。さらに *Dppa2* : *Pcgf6* 欠損 ES 細胞はキメラ寄与能が部分的に回復した。以上から、多能性期における PCGF6-DPPA2/4 軸による de novo DNA メチル化標的遺伝子のエピジェネティック制御が、ES 細胞の正常な分化に重要な役割を果たすことが明らかになった。



これに関連して、マウス ES 細胞において PCGF6-PRC1 ポリコーム群複合体の詳細な機能解析を行った。マウス ES 細胞で内在性の RING1A/B を CBX7-RING1B 融合タンパク質に置き換えることで、PRC2/CBX7-cPRC1 経路のみにより H2AK119ub1 が維持される ES 細胞を作製し、その機能を解析した。その結果、CBX7-PRC1 は PRC2 依存的かつ vPRC1 非依存的な H2AK119ub1 沈着の促進を介して、ポリコームサイレンシングの維持を促進する一方で、その新規確立を抑制することが明らかになった。この知見は、ES 細胞の自己複製と分化のバランス制御や、PRC1 が関与する腫瘍形成の背景となる仕組みを示唆している。

## (3) ES 細胞の 2 細胞期様細胞への転換を制御する転写因子の機能解析

マウス ES 細胞におけるマウス 2 細胞期関連遺伝子発現誘導過程を解析するために、そのマスター制御因子 *Dux* を欠損した ES 細胞を作成した。この *Dux* 欠損 ES 細胞では 2 細胞期関連遺伝子の発現は消失するが、そこに薬剤誘導性 *Dux* 遺伝子を導入し、その発現を誘導すると、2 細胞期関連遺伝子の発現も誘導された。この誘導過程において、2 細胞期関連遺伝子の発現変化を時系列解析したところ、*Zscan4* 遺伝子群の発現誘導に遅れて、転写因子 *Zfp352* の一過性発現が起こっていることを見出した。そこで、*Zfp352* 欠損 ES 細胞を作成し、その 2 細胞期関連遺伝子発現誘導への影響を検討した。その結果、転写因子 *Zfp352* がその一部の遺伝子発現制御に関与していることを明らかにした (Mwalilino et al, Genes Cells, 2023)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Mwalilino Lusubilo, Yamane Mariko, Ishiguro Kei ichiro, Usuki Shingo, Endoh Mitsuhiro, Niwa Hitoshi	4. 巻 28
2. 論文標題 The role of Zfp352 in the regulation of transient expression of 2 cell specific genes in mouse embryonic stem cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 831 ~ 844
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.13070	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 -

1. 著者名 Endoh Mitsuhiro, Niwa Hitoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Stepwise pluripotency transitions in mouse stem cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 EMBO reports	6. 最初と最後の頁 e55010
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15252/embr.202255010	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 -

1. 著者名 Horisawa-Takada Y, Kodera C, Takemoto K, Sakashita A, Horisawa K, Maeda R, Shimada R, Usuki S, Fujimura S, Tani N, Matsuura K, Akiyama T, Suzuki A, Niwa H, Tachibana M, Ohba T, Katabuchi H, Namekawa SH., Araki Ki, Ishiguro K	4. 巻 12
2. 論文標題 Meiosis-specific ZFP541 repressor complex promotes developmental progression of meiotic prophase towards completion during mouse spermatogenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3184
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-23378-4	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 -

1. 著者名 Matsuura, K., Tani, N., Usuki, S., Torikai-Nishikawa, S., Okano, M. and Niwa, H.	4. 巻 396
2. 論文標題 MEAF6 is essential for cell proliferation and plays a role in the assembly of KAT7 complexes.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112279
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2020.112279	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 -

1. 著者名 Ishiguro KI, Matsuura K, Tani N, Takeda N, Usuki S, Yamane M, Sugimoto M, Fujimura S, Hosokawa M, Chuma S, Ko MSH, Araki K, Niwa H.	4. 巻 52
2. 論文標題 MEIOSIN Directs the Switch from Mitosis to Meiosis in Mammalian Germ Cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Cell	6. 最初と最後の頁 429-445
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.devcel.2020.01.010.	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0件

〔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	遠藤 充浩  (Endoh Mitsuhiro)		

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

#### 8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------