

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07164

研究課題名(和文) 重複遺伝子クラスターと幹細胞super stateを制御するRif1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of Rif1 in regulating multicopy gene cluster and super state of pluripotent stem cells

研究代表者

吉沢 直子(須賀田直子)(YOSHIZAWA, Naoko)

公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム医科学研究分野・主席研究員

研究者番号：30344071

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの胚性幹細胞でmRif1をノックダウンすると、通常初期胚2細胞期でのみ転写がみられる遺伝子群(2CG)が脱抑制される(以下2CG-high)。本研究ではこの2CG-high細胞を詳細に解析し、1. 2CGとともに内在性レトロウイルスMerv-Lが著しく脱抑制する 2. Zscan4領域のDNAの脱メチル化は限定的である 3. Zscan4遺伝子領域付近で広範囲にH3K27Acが顕著に増加し、少なくとも20kbにおよぶ特殊なエンハンサー構造を形成することを見出した。また、N末端の欠失変異体を一過性発現すると2CG-high状態を誘導できることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Mouse embryonic stem (ES) cells contain a small population expressing zygotic genes usually transcribed at 2-cell stage (2CG). Based on the previous finding, 2CG-high cells induced by Rif1 knockdown were precisely analyzed in this study. The main results were as follows; 1. mRif1 knockdown lead to massive derepression of 2CG and endoretrovirus Merv-L. 2. DNA methylation at Zscan4 loci was not substantially reduced. 3. H3K27Ac was noticeably increased in Zscan4 gene loci and formed enhancer-like structure for at least 20 kb. Furthermore, Transient expression of mRif1 deletion mutant without N-terminal HEAT repeat structure could induce 2CG-high states.

研究分野：分子生物学

キーワード：Rif1 初期胚 2細胞期 内在性レトロウイルス エンハンサー Zscan4 ヒストン修飾 DNAメチル化

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究の背景

近年、再生医療への期待を反映して、多能性幹細胞の作製や特定の細胞系譜への分化誘導法の開発研究がますます重要となっている。一方で、リプログラミングの分子機構や多能性幹細胞特異的なクロマチン構造などの基礎的な知見に関しては未知の領域が多く残されていた。

一口に多能性細胞と言っても様々な状態が存在する。例えばヒト ES 細胞は、少し分化の進んだエピステム(epiblast 様の幹細胞)状態であるが、阻害剤 (2i) の添加により多能性の高い「ground state」へ誘導できる。またマウス ES 細胞では Nanog や Rex1 等が一部の集団でしか発現していない (丹羽ら, 2009) ことや、通常初期胚 2 細胞期後期でのみ特異的に転写される遺伝子 (以下 2CG) 群が数%の ES 細胞集団で散発的かつ遷移的に発現する (Zalzman ら, 2010) ことが報告されていた。後者に関しては、ヒストン脱メチル化酵素 Kdm1a を発現抑制すると 2CG の発現が脱抑制されること、また 2CG 陽性細胞を多く含む ES 細胞は胎児組織のみならず胎盤へも分化することが報告された (Macfarlan ら, 2011, 2012, 一部異論あり)。この特殊な ES 細胞は内在性レトロウイルスの一種である Merv-L の発現も上昇するなど *in vivo* (初期胚) での現象を反映しており、全能性を獲得したかのような状態は「2 細胞期胚様 (2-cell like cell)」または「super state」と評された (Surani ら, 2012)。

(2) 本研究に先行する報告や研究代表者の準備状況

前回の基盤研究(C) (課題番号 23570243) において研究代表者は、マウス ES 細胞での DNA 複製制御因子の解析の過程で、Rif1 を発現抑制すると幹細胞マーカー遺伝子の発現は変わらないが 2CG の発現が著しく上昇することを、偶然発見した (結果 1)。同様の実験の報告は過去にあったが (Wang ら, 2006), 彼らは ES 細胞での Rif1 のノックダウンが線維芽細胞様の分化を誘導するという異なる結論に至っていた。また、本研究開始直前に結果 1 と同様の報告がなされたが (Dan ら, 2014), Rif1 による Zscan4 の発現抑制メカニズムには不明な点が残されていた。研究代表者は、2CG は数十から数百 kb の広範囲で遺伝子クラスターを形成する特殊なゲノム構造を持ち、一因子がこのような広範囲な遺伝子の発現を制御する例は知られていないことに着目して、Rif1 は幹細胞特異的なクロマチン構造の形成に重要な役割を持つと考え本研究の申請に至った。準備段階で mRif1 の結合部位を ChIP アッセイにより解析し、mRif1 が転写の変動する遺伝子の近傍に結合する可能性を示唆した。

2. 研究の目的

(1) Rif1 の発現抑制が重複遺伝子クラスターの転写を活性化するメカニズムの解明: 初期胚 2 細胞期遺伝子はファミリー遺伝子が重複してクラスターをなす特殊な構造である。この領域のクロマチン構造を詳細に解析し、mRif1 の発現抑制が 2CG を脱抑制するメカニズムを同定する。またクロマチンのアクセサビリティを解析する。

(2) Rif1 依存的な、幹細胞特異的なクロマチン高次構造の決定 (特にウイルス因子との関連): マウス ES 細胞の 2 細胞期胚状態では、初期胚 2 細胞期 (図 1) と同様にクラス III の内在性レトロウイルス Merv-L の発現も上がる事が知られている。Rif1 の発現抑制が内在性レトロウイルスの発現を脱抑制するかを詳細に調べる。また、これを誘導するクロマチン構造変化を解析する。

(3) 重複遺伝子クラスター構造と内在性ウイルス因子を利用した super state 誘導法の開発: 2CG の発現誘導に必要な制御領域を同定し、クロマチン構造変化と転写制御の関係を明らかにする。これにより ES 細胞の super state を誘導する方法を開発する。

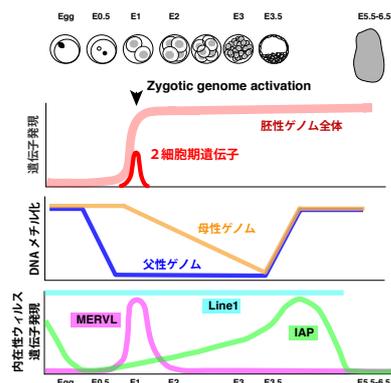


図 1. 初期胚 2 細胞期でのイベント

3. 研究の方法

(1) Rif1 のノックダウンによる 2CG と内在性レトロウイルスの発現解析: Rif1 およびコントロールノックダウンは 2 種の mRif1 siRNA (#2, NC#1) および universal 配列 siRNA で行った。qRT-PCR は細胞から RNA を TRIZOL で抽出後精製し、cDNA を作製して Light Cycler (ロシュ) にて PCR を行った。Zscan4, (Zscan4c/f, Zscan4d, 全 Zscan4 共通配列) Usp17l, AA681485, Gm7789, 内在性レトロウイルス, Major satellite はデータベースの配列を参考としてプライマーを作製した。Zscan4 上流領域約 2.6 kb (Zsc4c-pro) と融合した Emerald GFP をゲノムに異所挿入した細胞, Zscan4c 遺伝子領域に Emerald GFP を挿入したノックイン細胞は洪実教授 (慶応大学) から譲渡して頂いた。リポーター遺伝子の発現はフローサイトメーター (FACS CantoII) にて解析した。レスキュー実験ではマウス ES 細胞 E14tg2a 株に pCAG-FLAGx2-

mRif1-IRES-pac ベクターを導入して安定発現株を取得し、上記の 2 種の mRif1 siRNA を用いてノックダウンを行った。

(2) DNA メチル化の解析: siRNA 導入後細胞からゲノム DNA を調製してバイサルファイト処理を行い、非メチル化 CG サイトの塩基変換を行った。Zscan4(遺伝子上と上流の計 4 か所), Merv-L, IAP, Major satellite, T の標的領域を増幅するプライマーを作製し、ゲノム DNA を鋳型に増幅して配列を解析した。Zscan4 #2 プライマーは Zscan4d と Zscan4b/e を区別するため SNP を配慮した。その他のプライマーはファミリー遺伝子の共通配列にアニールするよう設計した。

(3) ヒストン修飾の変化: ノックダウン後の細胞を 1% ホルムアルデヒドで固定し、超音波処理機 (Branson および Covaris 社製) で断片化、遠心上清作製して修飾ヒストン抗体を用いてクロマチン免疫沈降を行った。回収した DNA は脱クロスリンク後、プロテアーゼ K および RNaseA 処理と精製を行い ChIP-qPCR の鋳型に用いた。プライマーは Zscan4 遺伝子の近傍 7 か所と、比較のため他の遺伝子およびその近傍を標的としてデータベースの配列を参考に設計した。免疫沈降した DNA の量を、全クロマチンから精製した DNA 量で標準化して数値を示した。

(4) クロマチンアクセサビリティの解析: Zscan4 遺伝子上流, Merv-L 5' LTR, Major satellite 領域の DNA 断片を増幅し, [α - 32 P] dCTP にて標識し DNA プローブを作製した。細胞は可溶性後分注し, 段階的濃度のマイクロコッカルヌクレアーゼ (MNase) を添加してクロマチンを部分的に消化した。各試料をアガロースゲルにて電気泳動後, サザンブロットを行った。

(5) Rif 欠失変異体の解析: Rif1 cDNA はマウス ES 細胞 D3 より取得し NCBI に登録した (JX255737)。全長 cDNA は pCAG-IRES-pac ベクターにサブクローニングした。欠失変異体はこれを元に制限酵素サイトで切断 (または部分消化) し, 再結合して作製した。これを Zsc4-pro-Emerald GFP 細胞に一過性に発現し, 免疫染色を行って共焦点顕微鏡 (LSM780) にて観察した。

4. 研究成果

(1) Rif1 のノックダウンによる 2CG と内在性レトロウイルスの脱抑制: ES 細胞での Zscan4 の発現に必要な遺伝子上流領域約 2.6 kb (Zsc4c-pro) は 2CG 陽性細胞のリポーター遺伝子のプロモーターとして機能することが報告されている。Rif1 のノックダウンにより他の 2CG と同様に Zscan4 も脱抑制されることがマイクロアレイの結果からわかっていった。このとき, 遺伝子の脱抑制には

Zsc4c-pro 配列が必要十分なのか, あるいは遺伝子クラスター構造なのか疑問であった。これを知るため, Zsc4-pro-Emerald GFP をゲノムに異所挿入した細胞 (A) と, Zscan4c 遺伝子領域に Emerald GFP を挿入したノックイン細胞 (B) とで脱抑制の程度を比較した。その結果, A では 3.9% から 25.5% へ, B では 1.0% から 11.3% といずれも Emerald GFP 陽性細胞が増加した。このことから Zsc4c-pro 配列は 2CG の脱抑制に必要であることがわかった (図 2)。しかし B では 6.5 倍なのに対し, クラスター内領域では 12 倍とより強い発現誘導が見られることから, 遺伝子クラスター構造が脱抑制をさらに増強する可能性が示唆された。

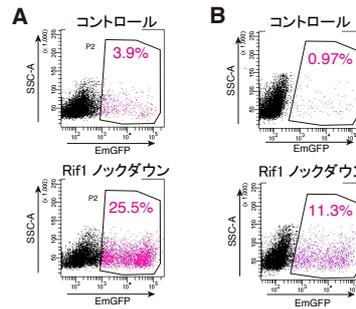


図2. Zscan4 リポーター遺伝子の発現

Rif1 ノックダウンによる Zscan4-Emerald GFP の発現変化。リポーター遺伝子をゲノムへ異所導入した細胞 (A) または Zscan4c へノックインした細胞 (B) を用いてフローサイトメーターで解析した。

さらに, 様々な 2CG の発現変化を qRT-PCR により確認した。その結果, Zscan4, Usp171, AA681485 などが Rif1 のノックダウンにより数十倍に増加した。FLAG-Rif1 を安定発現した株では, この 2CG の脱抑制を解消 (レスキュー) することができた。また Zscan4 ファミリー遺伝子間の発現を比較したところ, Zscan4c/f および Zscan4d, 全 Zscan4 遺伝子 (共通配列のプライマーにて解析) の発現変化は 60, 44, 73 倍といずれも著しく脱抑制された (図 3)。Zscan4 遺伝子はマウス 7 番染色体の約 820kb の範囲に 9 つのファミリー遺伝子からなる遺伝子クラスターを形成するが, この領域内に存在する非ファミリー遺伝子 Gm7789 を調べたところ 2 倍程度の発現変化しか見られなかったことから (図 3),

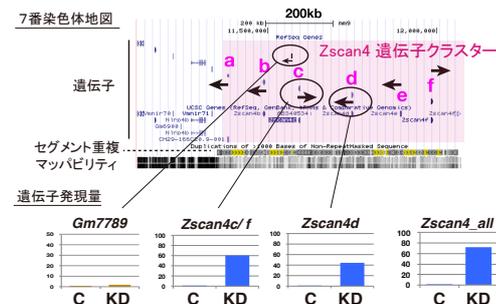


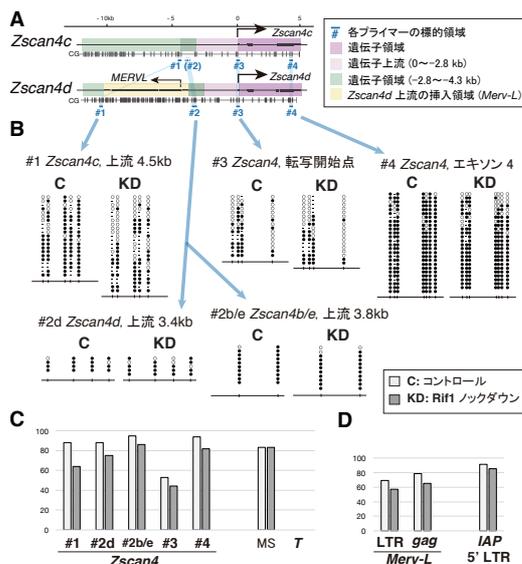
図3. Zscan4 遺伝子クラスターの構造

上: 7 番染色体地図と Zscan4 ファミリー遺伝子等の分布
下: Zscan4 遺伝子と非ファミリー遺伝子 (Gm7789) の発現変化. C, コントロール. KD, Rif1 ノックダウン.

この領域全体の転写が脱抑制されているわけではないことがわかった。

初期胚 2 細胞期後期および ES 細胞の 2CG 陽性細胞においては 2CG の発現と共に内在性レトロウイルス (ERV) の発現が誘導されることが知られている。そこで Rif1 をノックダウンした ES 細胞において ERV の発現を qRT-PCR で解析した。LINE1 および AluB1 (非 LTR 型 ERV), ERV1 (クラス I), IAP (クラス II), ORR1 (クラス III), Merv-L (クラス III) を調べたところ, Merv-L のみ発現が数十倍程度に上昇したが, 他の ERV は変化しないかあるいは 2 倍程度の上昇であった。また, Major satellite の転写も 8.5 倍と顕著な増加が見られた。このことは Rif1 ノックダウン細胞では初期胚 2 細胞期や super state の ES 細胞と同様の, 特殊な ERV などの転写が脱抑制していることが明らかとなった。

(2) **DNA メチル化解析:** 初期胚では Zygotic genome activation (胚ゲノムの活性化) の前後に DNA の脱メチル化が見られる。ES 細胞で Rif1 のノックダウンにより Zscan4 遺伝子近傍で DNA の脱メチル化が見られるかを 5 つのプライマーセットを設計して解析した。転写開始点 (#3) を除く 4 領域では DNA メチル化は 88%~95% であり, Rif1 をノックダウンしても依然として高めであった (63%~86%, 図 4)。この結果は最近報告された, 2 細胞期胚様 ES 細胞の DNA メチル化解析の結果と同様の傾向であった (秋山ら, 2015)。また Zscan4d 遺伝子の上流には Merv-L が挿入されているので DNA の脱メチル化が亢進しているのではないかと考えたが, 予想に反してメチル化は依然として維持されていることがわかった (コントロールで 88%, Rif1 ノックダウンで 75%, 図 4)。



同様に転写が脱抑制した Merv-L の近傍領域の DNA メチル化も解析したところ 5' LTR 領域 (69%) および gag 遺伝子領域 (79%) とともに少し減少したものの概ねメチル化は維持されていた (それぞれ 57%, 65%, 図 4)。一方, 転写変化が 2 倍程度だった IAP の領域では高く維持されていた (コントロールで 91%, Rif1 ノックダウンで 85%, 図 4)。

(3) **Zscan4 遺伝子領域のヒストン修飾の変化:** 遺伝子の脱抑制がクロマチン構造の大きな転換を伴うことが予想されたのでヒストンの修飾変化を解析した。ChIP-qPCR の標的配列は Zscan4 遺伝子の上流 0.3 kb (TSS), 1.4, 3.2, 10 kb の領域, エキソン 3, エキソン 4, 遺伝子の下流 1.9 kb とした (図 5A)。まず, ES 細胞で転写に連動したヒストン修飾であるヒストンとして知られる, H3 の 4 番目のアミノ酸であるリジンのトリメチル化 (H3K4me3) と, 9, 14 番目のリジンのアセチル化 (H3K9K14Ac) を調べたところ, Zscan4 領域ではどちらも元々非常に低いレベルであることがわかった (図 5B, 左上)。さらに意外なことに Rif1 をノックダウンしてもどちらも低いまま維持されていた。ヒストン H4 の修飾 (H4K5Ac, H4K8Ac, H4K12Ac, H4K16Ac) もほとんど変化がなかった。これに対して, H3K27Ac は Rif1 のノックダウンにより数倍程度の著しい増加が見られた (図 5B, 左下)。H3K27Ac の増加は調べた全ての領域で見られたことから, 少なくとも Zscan4 遺伝子の近傍十数 kb に渡る広範囲でこの現象が見られることが示唆された。

一方, 転写抑制型のヒストン修飾である H3K27me3, H3K9me3, H4K20me1 についても調べた。H3K9me3 は他の転写が活性化された部位やサイレントな領域と比較して中程度のレベルだったが, ノックダウンした Zscan4 遺伝子領域では, 多少変動するものの同程度に維持されていた (図 5B, 右下)。H3K27me3 (図 5B, 右上), H4K20me1 は変化がなかった。

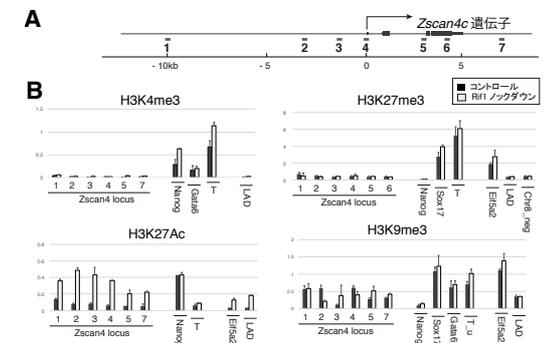


図 5. クロマチン構造変化 (ヒストン修飾)
A. Zscan4c 遺伝子の構造と ChIP-qPCR の標的領域
B. ChIP-qPCR の結果。Zscan4 以外の遺伝子は比較のためのポジティブまたはネガティブコントロールの値を示す。

本研究の準備中に競合するグループから Rif1 のノックダウンによる Zscan4 の脱抑制はこの領域の H3K9me3 と H3K9 メチル化酵素

である GLP の結合の低下を伴うとの報告があった (Dan ら, 2014)。そこで本研究では C57Bl/6j *mRif1 flox/flox* マウスより ES 細胞を樹立して CreERT2 をゲノムに挿入し、コンディショナルノックアウトができる細胞を作製して ChIP-qPCR を行ったが、ノックダウンの結果と同様、H3K9me3 はほぼ変化しないことが確認された。

(4) クロマチンアクセサビリティの解析: クロマチン構造を調べる目的で *Zscan4* 遺伝子, Major satellite, Merv-L 領域のクロマチンアクセサビリティを, ゲノム DNA の MNase 酵素に対する感受性で解析した。その結果, Rif1 ノックダウンにより Major satellite と Merv-L 領域に変化は見られなかったが *Zscan4* 遺伝子領域のクロマチンアクセサビリティが増え, DNA が消化されやすくなったことがわかった。このことはクロマチンがこの領域のクロマチンがよりオープンな構造に変換されたことを意味する。

(5) Rif 欠失変異体の解析: マウス Rif1 は N 末端の 1097aa の Heat repeat 構造と C 末端の約 500aa からなる進化上保存された配列を持つ。本研究に先立ち, mRif1 は ES 細胞はじめ, 様々な組織系譜の細胞で核に局在するが, 初期胚 2 細胞期では例外的に欠失変異体が発現し, その局在は C 末端に近い領域を含む断片は核に, N 末端を含む断片は細胞質に局在することを見出した。本研究では Rif1 の欠失変異体が ES 細胞の「2 細胞期胚様状態 (2-cell like cell または super state)」を誘導する可能性を考え, 12 種の欠失変異体を作製した。

核に局在する 8 変異体を ES 細胞で一過性に発現したところ, C 末端を含み N 末の Heat repeat を欠失する C552 および ΔN984 では内在性の全長 mRif1 の発現が低下することを見出した。さらにこれらを一過性に発現すると *Zscan4-EmGFP* のリポーター遺伝子の発現と, H3K27Ac の修飾が著しく増加することがわかった。以上のことから mRif1 の欠失変異体の導入により ES 細胞の super state 状態が作出できることがわかった。一方, 一過性の発現ではなく安定発現株においては ΔN984 も 2CG の脱抑制を弱くレスキューするという結果も得ていることから, 欠失変異体の発現レベルではなく, 発現量の変化が 2CG の発現を誘導する可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等 〔雑誌論文〕 (計 3 件)

1. Moriyama K, Yoshizawa-Sugata N, Masai H. (2018) 'Oligomer formation and G-quadruplex binding by purified murine Rif1 protein, a key organizer of higher-order chromatin architecture.' *J. Biol. Chem.* 293(10) p3607-3624. DOI 10.1074/jbc.RA117.000446.

(査読あり)

2. Masai H, Kanoh Y, Moriyama K, Yamazaki S, Yoshizawa N, Matsumoto S. (2018) Telomere-binding factors in the regulation of DNA replication. *Genes Genet. Syst.* 92(3), p119-125. doi: 10.1266/ggs.17-00008. (査読あり)

3. Tanaka H., Muto A., Shima H., Katoh Y., Sax N., Tajima S., Brydun A., Ikura T., Yoshizawa N., Masai H., Hoshikawa Y., Noda T., Nio M., Ochiai K., and Igarashi K. (2016) " Epigenetic regulation of the Blimp-1 gene (Prdm1) in B Cells involves Bach2 and histone deacetylase 3. " *J. Biol. Chem.* 291(12):6316-6330. doi: 10.1074/jbc.M116.713842. (査読あり)

〔学会発表〕 (計 3 件)

1. 吉沢 直子, 正井 久雄. マウス ES 細胞における *Zscan4* の発現脱抑制と Rif1 依存的なクロマチン構造変化の解析 生命科学系学会合同年次大会 (第 40 回日本分子生物学会) 2017 年 12 月 8 日, (ポスター発表)

2. Naoko Yoshizawa-Sugata and Hisao Masai. Early zygotic gene expression and organized differentiation are regulated by a conserved chromatin binding protein Rif1 in mouse ES cells. 3R Symposium. 2016 年 11 月 15 日, 16 日. (ポスター発表及び口頭発表)

3. 吉沢 直子, 小野富男, 山崎聡, 進藤真由美, 西藤泰昌, 正井久雄. 「Rif1 による ES 細胞の遺伝子クラスターの発現及びリプログラミングの制御」 BMB2015 第 38 回日本分子生物学会年会, 2015 年 12 月 3, 4 日, (口頭発表 (12 月 4 日) およびポスター発表 (12 月 3 日))

〔図書〕 (計 1 件)

1. Yoshizawa-Sugata, N., Yamazaki, S. and Masai, H. (2016) 'Rif1, a Conserved Chromatin Factor Regulating DNA Replication, DNA Repair, and Transcription'. The Initiation of DNA Replication in Eukaryotes, 1st Ed., p143-158. Kaplan, D.L. (Ed.) (Springer International Publishing) ISBN 978-3-319-24694-9. Doi: 10.1007/978-3-319-24696-3. (査読あり)

〔その他〕
(発表)

1. 吉沢 直子, 山崎 聡, 西藤 泰昌, 正井 久雄. マウス ES 細胞において Rif1 発現抑制で誘発される初期胚様状態と、その特殊なエンハンサー構造の解析. 第 3 回 TMED フォーラム

2018年3月14日（ポスター発表）

2. Naoko Yoshizawa-Sugata, Tomio Ono, Mayumi Shindo, Yasumasa Nishito, Hisao Masai. Roles of Rif1 in Maintenance of Pluripotency and Differentiation of Mouse ES cells. 14th IGAKUKEN International Symposium, 'IGAKUKEN Summit for Japan and Korea Science Leaders 2016'. 2016年7月1日（ポスター発表及び口頭発表）

3. Yoshizawa-Sugata N, Ono T, Yamazaki S, Shindo M, Nishito Y, Masai H. Rif1 regulates expression of cluster genes in mouse ES cells and reprogramming. International Symposium on Epigenome Dynamics and Regulation in Germ Cells, 2016年2月17-19日（ポスター発表）

（講義）

1. 吉沢 直子, 日本大学文理学部生命科学科2年生のための講義（正井 久雄, 吉沢 直子, 丸山 千秋）のうち「ES細胞とゲノム構造の揺らぎ」。2017年7月26日。

（アウトリーチ）

1. 東京バイオテクノロジー専門学校1年生の研究所見学対応。2017年5月8日。

2. 学芸大学附属高等学校生徒の研究所見学対応。2016年2月2日。

（ホームページ）

<http://www.igakuken.or.jp/genome/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉沢 直子（須賀田 直子）
(YOSHIZAWA-SUGATA, Naoko)
公益財団法人東京都医学総合研究所・ゲノム
医科学研究分野・主席研究員
研究者番号：30344071

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし