

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：17601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15055

研究課題名(和文) エピジェネティック制御によるヒトTERT遺伝子制御機構と細胞不死化獲得機構の解明

研究課題名(英文) Study for epigenetic regulation of human TERT gene

研究代表者

西野 光一郎 (Nishino, Koichiro)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90508144

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)：テロメラーゼ逆転写酵素(TERT)は幹細胞における高い自己増殖能を支える重要な分子である。しかし、ヒトTERT遺伝子の細胞・組織特異的な発現制御機構に関わるエピジェネティック制御は不明である。本研究では、ヒトTERT遺伝子のDNAメチル化可変領域(TERT-DMR)を同定し、TERT-DMRの高メチル化がTERT発現維持・獲得に重要であることを明らかにした。さらにヒトiPS細胞ではH3K4me3修飾が、体細胞ではH3K27me3修飾および、HP-1の結合が有意に認められた。DNA高メチル化が遺伝子発現に促進的に働くというエピジェネティック制御の新たな機構を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Telomerase reverse transcriptase (TERT) is an important molecule that supports high self-proliferative capacity in stem cells. However, epigenetic regulation of tissue-specific expression for the human TERT gene is unknown. In this study, we identified the differentially DNA methylated region of the TERT gene (TERT-DMR), of which hypermethylation enhanced TERT expression. Furthermore, H3K4me3 modification was recognized in human iPS cells, on the other hand, H3K27me3 modification and HP-1 binding were significantly recognized in somatic cells. We showed here a new epigenetic mechanism that DNA hypermethylation acts on gene expression.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：エピジェネティクス TERT遺伝子 細胞不死化機構

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物の染色体末端にはテロメアと呼ばれる繰り返し配列が存在し、細胞分裂に伴いこのテロメアが短縮する。テロメア長が一定以下まで短縮すると細胞分裂が停止し、それ以上の細胞増殖が不可能となる。一方、胚性幹細胞(ES細胞)や人工多能性幹細胞(iPS細胞)などの多能性幹細胞は、高い自己複製能を有しており、際限なく増殖可能である。この高い増殖能はテロメラーゼの高発現によるテロメア長の維持によって支えられており、テロメラーゼ活性の有無はテロメア逆転写酵素(*TERT*)遺伝子の発現により決定されている。*TERT*遺伝子の発現パターンはマウスとヒトにおいて大きく異なっており、マウスでは広範な細胞で *Tert* 遺伝子発現が認められるのに対し、ヒトを始めとする多くの動物においては多能性幹細胞や生殖細胞、がん細胞など、一部の限られた細胞においてのみ発現が認められる。

申請者はこれまでヒト iPS 細胞 20 株以上の DNA メチル化解析から、ヒト *TERT* 遺伝子の近位プロモーターは発現の有無に関係なく、低メチル化を示したのに対し、プロモーター遠位の領域で体細胞では低メチル化、ES 細胞、iPS 細胞、EC 細胞で高メチル化を示す領域を発見した。この領域は、*TERT* 遺伝子の発現と相関して、DNA のメチル化が変化しており、この領域を *TERT* 遺伝子の DNA メチル化可変領域(*TERT*-DMR)として同定した。一般的に、DNA メチル化と遺伝子発現の関係は、プロモーター周辺の DNA が高メチル化状態であると遺伝子発現は抑制される。しかし *TERT*-DMR における DNA メチル化は *TERT* を発現している細胞において高メチル化状態であり、*TERT* を発現していない細胞では低メチル化状態であった。これは、DNA メチル化と遺伝子発現の一般的関係とは正反対であり、DNA 高メチル化が遺伝子発現を活性化する可能性を示唆した。これまでヒト *TERT* 遺伝子の発現調節に関する研究は、近位プロモーターの解析に限られ、申請者が同定したプロモーター遠位領域のエピジェネティック解析はほとんど行われていない。

## 2. 研究の目的

体細胞から人工多能性幹細胞(iPS細胞)への形質転換時における細胞不死化はテロメア伸長に関わる *TERT* 遺伝子の発現獲得と大きく関係している。申請者はこれまでヒト *TERT* プロモーターの遠位領域にヒト多能性幹細胞特異的 DNA メチル化可変領域(*TERT*-DMR)を同定したが、iPS細胞樹立時における *TERT*-DMR と発現獲得機構については明らかとなっていない。本研究では、*TERT*-DMR におけるヒストン修飾とクロマチン構造の解析を通して *TERT*-DMR の DNA メチル化を介したヒト *TERT* 遺伝子の

エピジェネティック発現制御機構の解明を目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) メチル化プロモーターアッセイ

*TERT*-DMR の高メチル化が *TERT* 遺伝子発現へ与える影響を確認するために *TERT*-DMR 特異的メチル化コンストラクトを作成し、メチル化レポーターアッセイをヒト iPS 細胞 3 株に増やし、体細胞と比較して実施した。

### (2) *TERT*-DMR のヒストン修飾の解析

エピジェネティックな発現制御において、DNA メチル化修飾とヒストン修飾が相互作用することでクロマチン構造を決定し、転写因子結合を促進・阻害することで発現調節を行っている。申請者は既に *TERT*-DMR を同定しており、*TERT*-DMR は *TERT* 発現細胞において高メチル化状態を示し、非発現細胞において低メチル化状態を示すことを見出している。そこで *TERT*-DMR におけるヒストン修飾解析とクロマチン構造解析を目的に *TERT* 発現細胞(ヒト iPS 細胞)と非発現細胞(ヒト体細胞:iPS 細胞の親細胞を使用)に対して、活性型ヒストン修飾である H3K4me3 と抑制型ヒストン修飾である H3K27me3 の抗体を用いてクロマチン免疫沈降(ChIP)を行い、定量的 PCR により *TERT*-DMR におけるヒストン修飾の種類と程度を解析した。さらに、ChIP と Bisulfite Sequencing を組み合わせた方法を用いて DNA メチル化解析を行った。

### (3) クロマチン構造の解析

高メチル化 *TERT*-DMR におけるクロマチン構造の解析を行うために、ヘテロクロマチンタンパク質、HP-1 の ChIP-PCR を実施した。さらにヒト ES 細胞および体細胞の ATAC-Seq データを用いた *in silico* による解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) メチル化プロモーターアッセイ

*TERT*-DMR 特異的メチル化コンストラクトを用いたレポーターアッセイをヒト iPS 細胞 3 株と体細胞を用いて実施した結果、高メチル化 *TERT*-DMR は *TERT* 遺伝子の発現を促進した。一方、非メチル化 *TERT*-DMR は *TERT* 遺伝子の発現を促進できなかった。(図 1)

この結果は、*TERT*-DMR の高メチル化が積極的に *TERT* 遺伝子の発現に関与していることを示唆している。

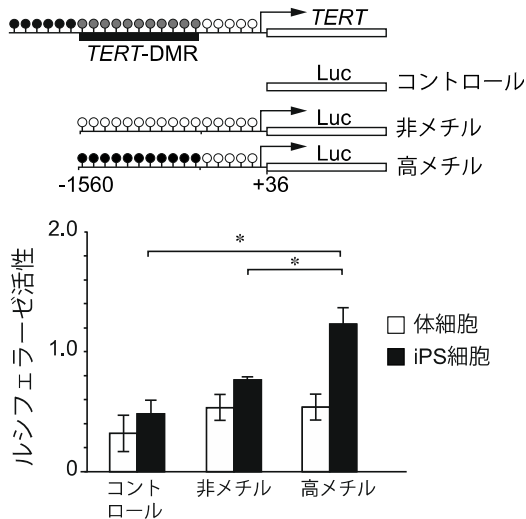


図1 メチル化プロモーターアッセイ  
高メチル化 *TERT*-DMR が *TERT* 遺伝子の発現を促進する。

(2) *TERT*-DMR のヒストン修飾の解析  
H3K4me3 および H3K27me3 修飾を ChIP-PCR にて解析した結果、H3K4me3 はヒト iPS 細胞において豊富に認められ、一方、H3K27me3 は体細胞において多く見られた。(図2)

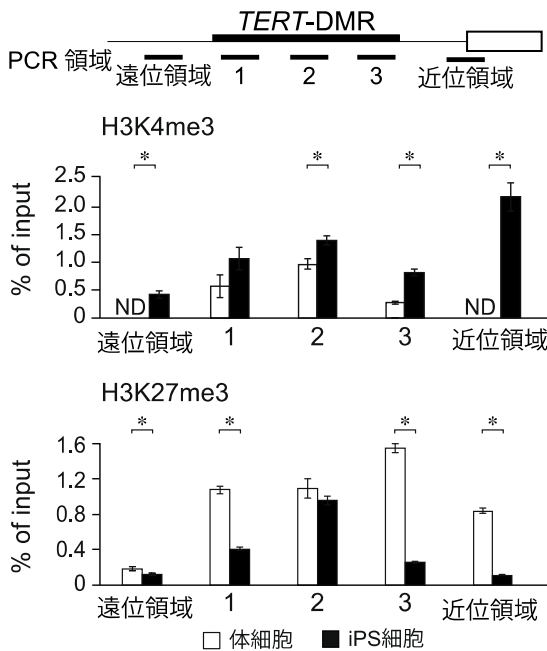


図2 H3K4me3 および H3K27me3 の ChIP-PCR  
H3K4me3 は *TERT* 遺伝子が発現している iPS 細胞において豊富に認められ、一方、H3K27me3 は *TERT* 発現のない体細胞で豊富に認められた。

この結果は、*TERT*-DMR が高メチル化にもかかわらず、ヒストン修飾状態が、活性型になっていることを示している。

(3) クロマチン構造の解析

さらに高メチル化 *TERT*-DMR におけるクロマチン構造を検討するためにヘテロクロマチンタンパク質、HP-1 の ChIP-PCR を実施

した。(図3)

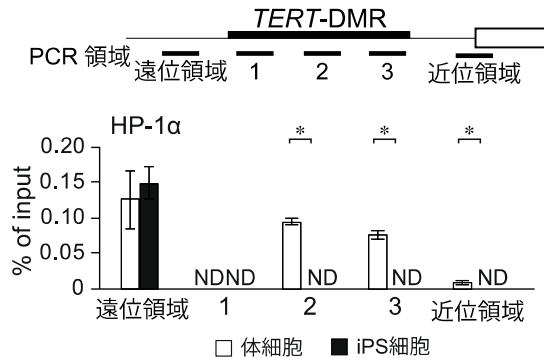


図3 HP-1 の ChIP-PCR  
HP-1 は *TERT* 遺伝子の発現のない体細胞で豊富に認められた。

さらにヒト ES 細胞および、体細胞の ATAC-Seq データを用いた *in silico* による解析した結果、ヒト iPS 細胞における *TERT*-DMR は高メチル化状態であるにもかかわらずオープンクロマチンであることが明らかになった。

本研究では、*TERT*-DMR における DNA の高メチル化が *TERT* 遺伝子の発現を促進する現象を明らかにした。これは DNA メチル化と遺伝子発現の一般的関係とは正反対であり、エピジェネティック制御の新たな機構の発見となった。

## 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)

〔雑誌論文〕(計1件)

Takasawa K, Arai IY, Yamazaki-Inoue M, Toyoda M, Akutsu H, Umezawa A, Nishino K. “DNA hypermethylation enhanced telomerase reverse transcriptase expression in human induced pluripotent stem cells” *Human Cell*. 31(1): 78-86. 2018. 査読有り

〔学会発表〕(計1件)

Ken Takasawa, Yoshikazu Arai, Mayu Yamazaki-Inoue, Masashi Toyoda, Hidenori Akutsu, Akihiro Umezawa, Koichiro Nishino. “DNA methylation induced human telomerase reverse transcriptase gene expression via lamin B1”. The 72th Fujihara seminar 2017 (2017/9/13-15 苫小牧市) 西野光一郎 「ヒト iPS 細胞とエピジェネティック・リプログラミング」 第5回臍帯血による再生医療研究会学術集会 招待講演 I (2017/7/23、宮崎市)

〔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.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/Vet\\_biochem/top.html](http://www.agr.miyazaki-u.ac.jp/~vet/Vet_biochem/top.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西野 光一郎 (NISHINO, Koichiro)

宮崎大学・農学部・准教授

研究者番号：90508144

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

なし