

令和 2 年 6 月 14 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15391

研究課題名(和文)新規ヒストンO-GlcNAc修飾による栄養状態依存的Nodal遺伝子制御機構

研究課題名(英文) Nutrition-dependent regulation of Nodal gene by a novel histone O-GlcNAc modification

研究代表者

新井 大祐 (Arai, Daisuke)

早稲田大学・理工学術院・講師(任期付)

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遺伝子は初期発生において非常に重要な役割を果たしている。我々はNodal遺伝子の発現制御機構について、エピジェネティクスと栄養状態の影響に注目して研究を行った。Nodal遺伝子の制御領域EREにグルコース応答性ヒストン修飾H2AS40-Gcが存在することを見出した。一方、ES細胞においてNodal遺伝子は培地中のグルコース濃度の影響を受けなかった。また、EREの転写誘導に必要なモチーフやエピジェネティックな抑制の標的領域を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Nodal遺伝子の発現異常は先天性疾患やガンの悪性化の原因となるため、制御機構の解明は生物学的にも医学的にも重要な課題である。本研究成果はエピジェネティクスの観点からNodal遺伝子の発現制御と栄養・代謝との関係を示唆しており、栄養環境と分化・発生やガンの悪性化の関係を解明する手がかりになりうる。また、ゲノム編集やエピゲノム編集を駆使することにより新たな知見が得られ、制御機構の全容解明に近づくことができた。

研究成果の概要(英文)：Nodal gene plays quite important roles in embryonic development. In this project, we studied regulatory mechanisms of Nodal gene expression, focusing on epigenetics and nutrition. We identified the glucose-responsive histone modification (H2AS40-Gc) on ERE, the regulatory region for Nodal gene. On the other hand, expression level of Nodal in mouse embryonic stem cells was not affected by glucose concentration in the culture medium. Besides, we identified a functional transcription factor binding motif, as well as a target region for epigenetic repression, in ERE.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス Nodal ヒストン修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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、中胚葉誘導や内臓の左右性の決定因子として、脊椎動物の初期発生に極めて重要な役割を果たしている。Nodal 遺伝子自身の突然変異や上流の制御系の異常による Nodal 遺伝子の発現異常は、左右性の破綻に基づく重篤な疾患、特に様々なタイプの先天性心疾患を引き起こす。また、Nodal 遺伝子は胚発生の途中で発現が消失し、以後生涯にわたりほぼ全ての組織で抑制され続ける。成体での Nodal 遺伝子の再活性化はガンの悪性化を引き起こすと考えられている。Nodal 遺伝子の発現制御機構は生物学的にも医学的にも重要な課題である。

真核生物の核内では、ゲノム上の特定の領域の DNA やヒストンが翻訳後修飾を受けることによりクロマチンの構造を変化させ、遺伝子発現やゲノムの安定性を調節している。このような機構をエピジェネティック制御と呼ぶ。我々はこれまで Nodal 遺伝子のエピジェネティック制御機構を解明してきた。Nodal 遺伝子のエピジェネティック制御のターゲットとして新規の制御領域 ERE (Epigenetic regulatory element) を同定し、抑制マークであるヒストン H3 の 27 番目のリジン (H3K27) トリメチル化 (me3) が ERE 制御に重要な役割を担っていることを示してきた (Arai et al., Genes Cells, 2009; Arai et al., Dev. Biol., 2010; Arai et al., Mech. Dev., 2015)。

2010 年、ヒストンに単糖 (N-アセチルグルコサミン、GlcNAc) が付加される O-GlcNAc 修飾の存在が報告された。この修飾の基質である UDP-GlcNAc はグルコースの代謝物であり、栄養状態に反応して変化するエピジェネティクス系として注目を集めている。最近、我々はヒストン H2A の 40 番目のセリン (H2AS40) が O-GlcNAc 修飾を受ける (H2AS40-Gc) ことを新たに見出し、これを特異的に認識する抗体の開発に成功した (Hirosawa et al., Sci. Rep., 2016)。これにより、エピジェネティクスと栄養を結ぶ新たな研究の展開が可能になった。

2. 研究の目的

Nodal 遺伝子が H2AS40-Gc により制御されているか、また栄養状態が H2AS40-Gc を介して Nodal 遺伝子に影響をおよぼすかどうか確かめる。また、ERE 内の転写因子モチーフを除去することで、ERE 制御に関わる転写因子を見つけ出し、エピジェネティック制御との関係を解明する。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞 (mESC) は J1 株を用い、既報に従い 15%FBS、LIF 存在下で培養した。培地のグルコース濃度を変更する場合、グルコース濃度の異なる DMEM (富士フィルム和光) を基礎培地として用いた。

(2) H2AS40-Gc 修飾状態は、同修飾を特異的に認識するマウスモノクローナル抗体 (20B2, Hirosawa et al., Sci. Rep., 2016) を用いたクロマチン免疫沈降 (ChIP) により解析した。

(3) 遺伝子発現については、キットを用いて抽出した Total RNA から cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法により定量的に解析した。

(4) ERE 欠失はゲノム編集により行った。ERE 中心付近に設計した 2 種類の sgRNA を CRISPR/Cas9 Nickase 発現ベクター pX335 に導入し、mESC にトランスフェクションした。単離した mESC の ERE 付近のゲノム DNA 配列をサンガー法により決定し、複数の欠失クローンを得た。

(5) 独自の CRISPR/dCas9-KRAB 発現ベクターを開発し、Nodal 上流の様々な領域を標的とした sgRNA を組み込んで、mESC に一過的にトランスフェクションした。導入細胞を薬剤で選別し、リアルタイム PCR 法により Nodal 発現レベルを解析、比較することで、各領域への dCas9-KRAB の効果を確認した。

4. 研究成果

(1) Nodal 遺伝子の発現制御に H2AS40-Gc が関与しているかどうかを明らかにするために、抗 H2AS40-Gc モノクローナル抗体を用いた ChIP による解析を行った。また、O-GlcNAc 修飾はグルコース量に応じて量が増減する例が多く知られているため、培地中のグルコース濃度の影響についても検討した。mESC を高グルコース培地 (25 mM) と低グルコース培地 (5.5 mM) で 96 時間培養し、回収して ChIP に供した。結果、H2AS40-Gc は ERE 上に濃縮されることが確認された。低グルコース培地よりも高グルコース培地で培養した方が H2AS40-Gc レベルが高くなる傾向が見られたが、有意差は確認できなかった (図 1)。

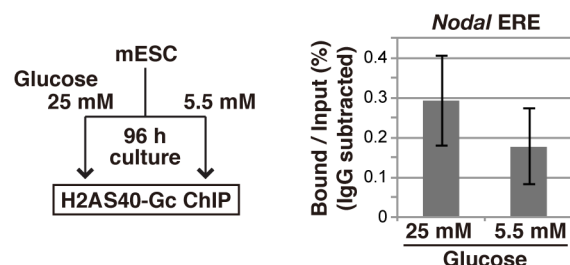


図 1 H2AS40-Gc が ERE 上に存在する

(2) 培地中のグルコース濃度が *Nodal* 遺伝子発現に与える影響を調べるため、mESC を高グルコース培地と低グルコース培地で培養し、*Nodal* 遺伝子の mRNA 発現量を解析した。しかし、発現量に有意な差は認められなかった。

(3) ERE を介した *Nodal* 遺伝子発現制御の機構をより詳細に調べるために、ERE のモチーフ解析を行った。以前の研究で、ERE の中でも mESC においてクロマチンが最も緩んでいる領域に OCT4 モチーフを見出している (Arai et al., Mech. Dev., 2015)。しかし他のグループの報告は別の OCT4 モチーフが *Nodal* 遺伝子発現誘導を担うと主張していた (Papanayotou et al., Plos Biol., 2014)。CRISPR/Cas9 を用い、ERE を様々な長さで欠失させた mESC クローンを樹立した。各クローンにおける *Nodal* 遺伝子の発現状態を比較した結果、我々が注目していた OCT4 モチーフを含む極めて短い領域の欠失が、*Nodal* 遺伝子の発現を劇的に減少させるのに十分であることが確かめられた。しかしながら、OCT4 モチーフ欠失細胞でも *Nodal* 遺伝子の発現は 10%程度残存していたため、他の経路も発現誘導に参加していると考えられた。

(4) CRISPR/dCas9 法により *Nodal* 遺伝子上流のどの領域が転写誘導に重要であるかを検討した。dCas9 のエフェクターとして H3K9me3 を介して標的を抑制する KRAB ドメインを用いた。mESC で転写開始点近傍から OCT4 モチーフまでの領域に dCas9-KRAB を誘導すると *Nodal* 遺伝子の発現が顕著に低下した。この領域は分化に伴い H3K27me3 修飾を受けており、抑制の標的領域であるという先行研究の知見 (Arai et al., Mech. Dev., 2015) と一致した (図 2)。OCT4 モチーフより上流の領域は分化に伴い DNA が高メチル化状態となるが、この領域への dCas9-KRAB の効果は緩やかであった (図 2)。OCT4 モチーフ欠失細胞において ERE に dCas9-KRAB を誘導すると *Nodal* 遺伝子の発現レベルはさらに大幅に減少したことから、ERE へのエピジェネティックな抑制は OCT4 以外の転写誘導経路に対しても機能することがわかった。

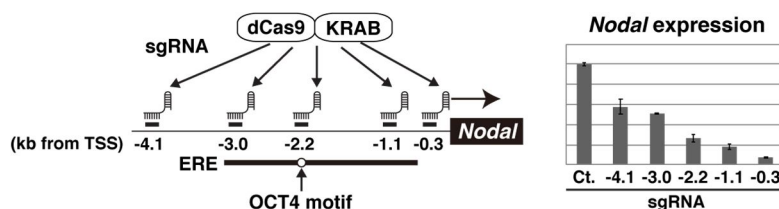


図 2 *Nodal* 遺伝子の抑制標的領域の決定

以上より、*Nodal* 遺伝子は制御領域 ERE に H2AS40-Gc 修飾を受けていることを明らかにしたが、具体的な機能や栄養状態との関係を確認することはできなかった。グルコース濃度変化による ERE 上の H2AS40-Gc の変化は小さく、発現に影響を及ぼすほどではないのかもしれない。また mESC 培養におけるグルコースの効果は大きく、様々な副次的作用により *Nodal* 遺伝子への影響がマスクされている可能性もある。一方で、ERE の制御機構に関する詳細な知見が得られた。これらは H2AS40-Gc やその他のヒストン修飾によるエピジェネティック制御の全容解明のための足がかりになると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Machida K, Arai D, Katsumata R, Otsuka S, Yamashita JK, Ye T, Tang S, Fusetani N, Nakao Y	4. 巻 26
2. 論文標題 Sameuramide A, a new cyclic depsipeptide isolated from an ascidian of the family Didemnidae.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 3852-3857
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.1016/j.bmc.2018.06.042	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 該当する
1. 著者名 Nakamura F, Maejima H, Kawamura M, Arai D, Okino T, Zhao M, Ye T, Lee J, Chang YT, Fusetani N, Nakao Y	4. 巻 28
2. 論文標題 Kakeromamide A, a new cyclic pentapeptide inducing astrocyte differentiation isolated from the marine cyanobacterium Moorea bouillonii.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 2206-2209
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bmcl.2018.04.067	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 該当する
1. 著者名 Nakamura F, Kudo N, Tomachi Y, Nakata A, Takemoto M, Ito A, Tabei H, Arai D, de Voogd N, Yoshida M, Nakao Y, Fusetani N	4. 巻 71
2. 論文標題 Halistanol sulfates I and J, new SIRT1/3 inhibitory steroid sulfates from a marine sponge of the genus Halichondria	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 273 ~ 278
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/ja.2017.145	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Takase S, Kurokawa R, Arai D, Kanemoto Kanto K, Okino T, Nakao Y, Kushiro T, Yoshida M, Matsumoto K	4. 巻 7
2. 論文標題 A quantitative shRNA screen identifies ATP1A1 as a gene that regulates cytotoxicity by aurilide B	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-02016-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daisuke Arai
2. 発表標題 Marine Natural Products that Control a Specific Set of Histone Modifications
3. 学会等名 XVI MaNaPro & XI ECMNP, 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----