

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：84408

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15738

研究課題名(和文)着床前胚の細胞運命決定におけるBETファミリータンパク質を介した転写制御機構

研究課題名(英文)Cell fate determination through transcriptional activation by BET family proteins in preimplantation embryos

研究代表者

爪 麻美 (Mami, Tsume)

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):哺乳動物の着床前胚は、栄養外胚葉、エピブラストおよび原始内胚葉の3種の細胞系譜で構成される。これらの細胞運命決定は、各細胞系譜で特異的な転写因子の発現によって主に制御されている。本研究では、BETファミリータンパク質(BET)がヒストンのアセチル化修飾を介した転写制御機能を持つ点に着目し、着床前胚の細胞運命決定における機能解析を行った。その結果、BETはエピブラスト系譜の特異化と維持に必要であり、STAT3に依存した経路を部分的に介して働いていること、さらにエピブラスト系譜の特異化にはBRD4が中心的な役割を、BRD2が相補的な役割を担っていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

BETの発生過程における機能については、ノックアウトマウスの解析が行われていたものの、着床前胚での細胞運命決定における機能については不明確であり、ユビキタスに発現するBETがSTAT3依存性の経路を部分的に介してエピブラスト系譜特異的に働いていることは本研究課題で初めて明らかにされた。BETファミリーは神経組織など他の組織でもユビキタスに発現することから、得られた知見は、他の臓器や組織形成での細胞分化における転写制御機構についても普遍化できることが期待される。

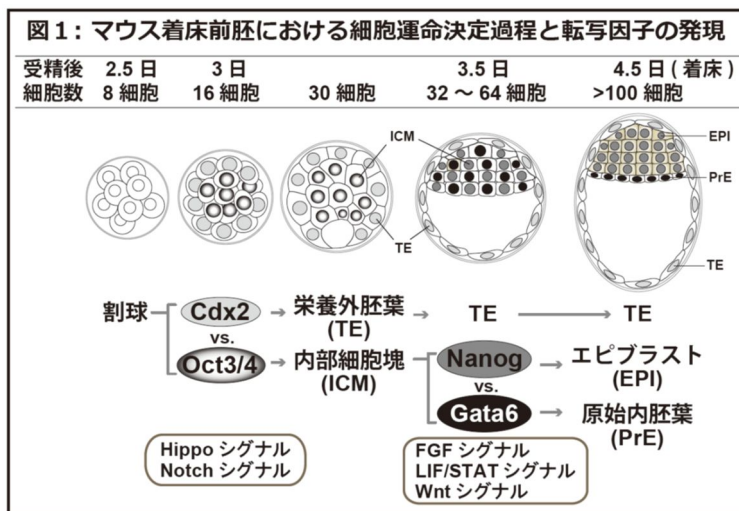
研究成果の概要(英文):During mammalian preimplantation development, as the fertilized egg develops and differentiates, three cell lineages become specified: trophoctoderm, epiblast, and primitive endoderm. The formation of the three lineages is primarily controlled by expression of the lineage-specific transcription factors. In this research, we focused on the function of transcriptional activation of BET family proteins through the binding of BET bromodomains to acetylated histone and examined the function of the BET proteins during the cell fate specification in mouse preimplantation development. The results indicate that BET proteins are essential to the specification and maintenance of the epiblast lineage by activating lineage-specific core transcription factors through partly association with the STAT3-dependent pathway during mouse preimplantation development. Furthermore, among BET proteins, BRD4 plays a central role and BRD2 a complementary role in the specification of epiblast lineages.

研究分野：発生生物学

キーワード：マウス 着床前胚 エピブラスト BETファミリータンパク質 Brd4 Brd2 STAT3

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物の着床前胚は胚盤胞とよばれ、将来胎盤となる栄養外胚葉、将来の胚本体となるエピプラスト、将来胚の保護膜となる原始内胚葉の3種類の細胞群で構成されている。これらの細胞運命は、細胞系譜特異的に発現する転写因子(Cdx2、Oct3/4、Nanog、Gata6など)が拮抗的に働くことなどにより、2つの段階を経て決定される(図1)。マウスでは、16~32細胞期の間に、外側の割球はCdx2を強く発現し栄養外胚葉へ、内側の割球はOct3/4の強い発現を示し、内部細胞塊(ICM)へと特異化される。



続いて、32~64細胞期の間に、ICMの細胞はNanogとGata6を互い違いに発現し、Nanogの発現が強い細胞はエピプラストへ特異化される一方で、Gata6の発現が強い細胞は原始内胚葉へと特異化され、それぞれが維持されることで、最終的には128細胞期までに運命決定が完了する(図1)。これら一連の過程には、FGF、Notch、Hippo、LIF、Wntなどのシグナル経路の関与が明らかになってきている(Frum & Ralston, 2015)。しかし、マウス着床前胚の細胞運命決定に必要な転写因子を含む遺伝子の発現が、どのようにして転写の段階で制御を受けているのかについては、依然として不明な点が多い。

BETファミリータンパク質(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ドメインを特徴的な構造として持ち、プロモドメインを介してアセチル化修飾を受けたヒストンH3やヒストンH4に特異的に結合し、転写制御に働くことが示唆されている。体細胞で発現するBETには、BRD2、BRD3およびBRD4があり、特にBRD4は、RNAポリメラーゼが転写の開始や転写伸長を行うために必要なP-TEFbを動員する役割を担い、転写を促進する活性を持つ(Jang et al., 2005)。ES細胞を用いた研究では、BETは幹細胞の維持に働いているとの報告がある(Di Micco et al., 2014)。また、マウスの*Brd4*遺伝子欠損胚は、着床直後に致死となる(Houzelstein et al., 2002)。さらに、BETは互いにヘテロダイマーを形成して働く可能性も示唆されている。これらのことから、より早期の発生ステージである着床前胚においても、BETが相補的に機能することが考えられる。

申請者は、BETの機能阻害剤を用いて胚盤胞胚を培養し、*Nanog* 遺伝子の発現が低下することを見いだしていた(申請当時、未発表)。このことから、着床前期において、BETはエピプラストの形成に関与することが推察されるが、BETが細胞運命決定に果たす役割について、その詳細は知られていない。

2. 研究の目的

本研究では、着床前期の重要なイベントである細胞運命決定において、転写制御機能を持つBETがどのような遺伝子の発現制御を行い、細胞運命決定にどのように働いているの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

着床前期の細胞運命決定におけるBETの機能を明らかにするために、以下の3点に着目し解析を行った。

(1) BET機能阻害剤を用いた表現型解析

BET機能阻害剤"JQ1"は、BETのプロモドメインに特異的に結合し、ヒストンのアセチル化修飾への結合を阻害する試薬である。JQ1を培養液に添加して着床前の様々な発生段階の胚を培養し、どのような異常が認められるか*in situ*ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法を行い解析した。

(2) 細胞運命決定期において BET と協調的に働くシグナル経路の解析

まず、BET で発現制御される遺伝子を網羅的に同定するために、32 細胞期以降の胚盤胞胚を JQ1 処理または DMSO 処理(コントロール群)して回収し、マイクロアレイを行った。次に、マイクロアレイで得られた発現プロファイルを用いて Ingenuity Pathway Analysis を行い、BET と協調的に働くシグナル経路を推測した。推測したシグナル経路が本当に BET と関連しているか調べるために、シグナル経路特異的な阻害剤を用いて胚盤胞胚を培養し、*in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法を用いた表現型解析や RNA シークエンスを行い、JQ1 処理胚の表現型と比較解析した。

(3) 細胞運命決定期に働く BET の特定

これまでの解析で BET 機能阻害剤として用いている JQ1 は、BRD4 のプロモドメインに最も強く結合するが、その他の BET (BRD2、BRD3、BRDT) のプロモドメインにも強く結合することが知られている (Filippakopoulos et al., 2010)。さらに、BET は互いにヘテロダイマーを形成して働く可能性も示唆されている。そこで、どの BET が着床前の細胞運命決定において重要な役割を果たすのかについて調べるために、BET の遺伝子欠損マウスを用いて表現型解析を行い、JQ1 処理胚の表現型と比較した。*Brd2* 遺伝子欠損マウスは、当研究室にて維持されているラインを用いた (Tsume et al., 2012)。*Brd4* 遺伝子欠損マウスは、MMRRC から導入した *Brd4^{tm1a(EUCOMM)Wtsi}* マウスの精子と *-actin Cre* マウスの卵との IVF によって得られたラインを解析に用いた。さらに、BET の遺伝子を二重に欠損したマウスの作出を試み、二重遺伝子欠損マウス胚と JQ1 処理胚との表現型の比較を行うことで、相補的に働く BET を探った。

4. 研究成果

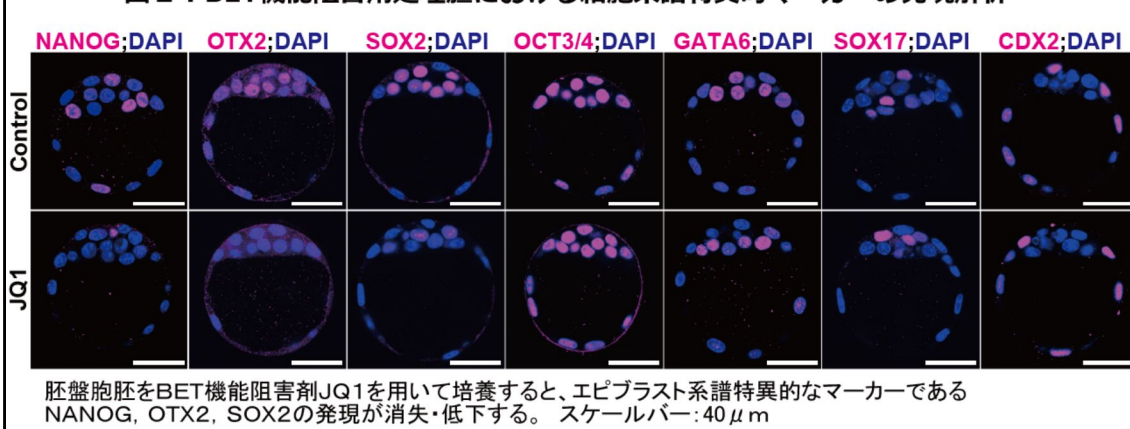
(1) BET 機能阻害剤を用いた表現型解析

マウスにおいて *Brd4* 遺伝子欠損胚は着床直後に致死となることが報告されている (Houzelstein et al., 2002) ことから、*Brd4* は着床前に機能することが推察される。そこでまず、マウス着床前胚における BRD4 タンパク質の発現を特異的な抗体を用いて調べた。その結果、細胞運命決定が行われる以前の 8 細胞期から、2 回の細胞運命決定が完了する 4.5 日目まで、BRD4 タンパク質はすべての細胞系譜の細胞で発現することが分かった。

そこで次に、BET の機能阻害が細胞運命決定に及ぼす影響を調べるために、BET 阻害剤 JQ1 を用いて、32 細胞期以降のマウス胚盤胞胚を培養し、細胞系譜特異的なマーカーを用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法を行った。その結果、JQ1 処理胚では、エピプラスト系譜で発現する *Nanog*、*Sox2*、*Otx2* の mRNA の発現が顕著に低下していることが分かった。その一方で、栄養外胚葉系譜特異的な *Cdx2* や原始内胚葉系譜特異的な *Gata6*、*Sox17*、未分化細胞に特異的に発現する *Oct3/4* の発現に変化は見られなかった。さらに、細胞レベルでの発現解析を行うために、免疫組織化学法を行ったところ、JQ1 処理胚では、エピプラスト系譜特異的な NANOG、SOX2 および OTX2 タンパク質の発現が消失した一方で、その他の細胞系譜マーカーに異常は認められなかった (図 2)。これらの結果から、BET はエピプラスト系譜に必要な遺伝子の転写活性化を通じて、エピプラストの特異化と維持に機能していることが分かった。

さらに、発生ステージを遡り、JQ1 を用いて 16 細胞期胚を桑実胚期 (およそ 30 細胞) まで培養した場合も、同様に NANOG、SOX2、OTX2 のタンパク質の発現が消失した。このことから、BET は内部細胞塊形成の早い段階から、エピプラスト細胞系譜の特異化に働いていることが分かった。

図 2 : BET機能阻害剤処理胚における細胞系譜特異的マーカーの発現解析



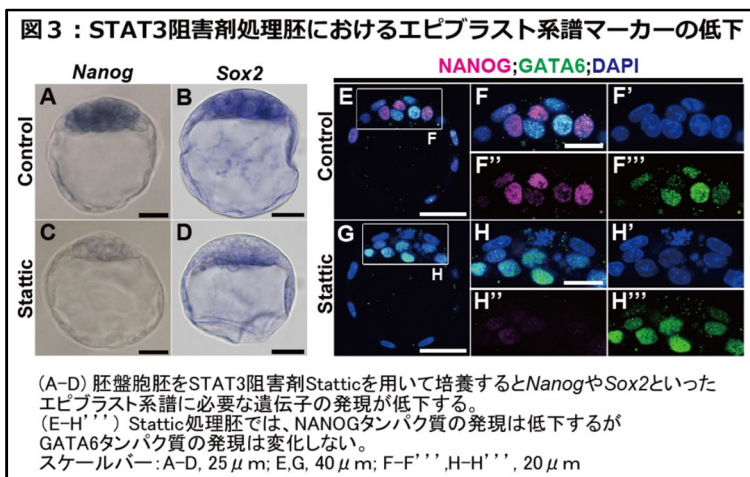
(2) 細胞運命決定期において BET と協調的に働くシグナル経路の解析

着床前胚において BET を機能阻害した場合、エピプラスト系譜のみに異常が認められたことから、BET によって活性化される遺伝子群は特異的な経路を介してエピプラスト系譜に働く可能性が考えられた。そこでまず、JQ1 処理胚とコントロール胚 (DMSO 処理胚) を用いてマイクロアレイを行い、BET の機能阻害で発現が低下する 288 遺伝子を同定した。次に、Ingenuity Pathway Analysis を行い、BET の阻害で発現低下が見られた遺伝子群に関連するシグナル経路の候補を絞った結果、JAK/STAT 経路および STAT3 を介した経路に着目して解析を進めた。

まず、エピプラスト系譜の特異化に STAT3 の活性が関連しているか調べるために、STAT3 の活性化型であるリン酸化 STAT3 (pSTAT3) の発現とエピプラスト系譜マーカー NANOG の発現の関係について、免疫組織化学法を用いて調べた。その結果、エピプラストの特異化が行われる 32 細胞期以降の胚盤胞胚において、pSTAT3 は ICM の細胞で不均一に発現していたが、NANOG 陽性細胞の 86.8% は pSTAT3 と共発現しており、NANOG の発現に pSTAT3 が必要であることが示唆された。次に、胚盤胞胚を STAT3 阻害剤 "Stattic" を用いて培養したところ、エピプラスト系譜に必要な *Nanog* や *Sox2* の遺伝子発現低下と NANOG 陽性細胞数の減少を認め、BET 阻害剤処理と同様の表現型を示すことが分かった (図 3)。さらに、BET 阻害剤処理胚では、Stattic 処理胚と同様に pSTAT3 の発現の消失を認めた。これらの結果から、BET がエピプラストの特異化に働く際に、STAT3 の機能が関わっていることが示唆された。

BET 阻害剤で発現が低下する遺伝子群と、STAT3 阻害剤で発現が低下する遺伝子群に関連性があるかどうかについて網羅的に解析するために、各阻害剤処理した胚を用いて RNA シークエンスを行った。その結果、胚盤胞胚における BET の標的遺伝子は、全発現遺伝子のうち 11.5% であったのに対し、STAT3 の標的遺伝子はわずか 2.6% であった。RNA シークエンスで得られた遺伝子プロファイルから、BET と STAT3 の両方の制御を受ける 110 遺伝子を同定し、STAT3 標的遺伝子のうち、およそ 3 分の 1 は BET に依存して転写活性化されることが分かった。さらに、BET と STAT3 の両方によって制御を受ける遺伝子群は、BET 単独で制御される遺伝子群よりも発現が優位に低下していた。これらの網羅的な解析結果から、胚盤胞胚において BET を介して転写制御される遺伝子群は、一部は STAT3 が関わる経路を介して働いていることが示唆された。

さらに、BET と STAT3 の両方の制御を受ける 110 遺伝子がどのような特徴を持っているかを調べるために、Gene Ontology (GO) 解析を行った。その結果、BET と STAT3 の両方の制御を受ける遺伝子群では、幹細胞の維持に関わる GO term が高頻度に抽出された。さらに、STAT3 で制御されるが BET で制御されない遺伝子群では、幹細胞の維持に関わる GO term は抽出されなかった。これらの結果から、STAT3 単独ではなく、STAT3 と BET が協調して働いた場合、幹細胞の特徴を持つエピプラストの形成に関わることが示唆された。



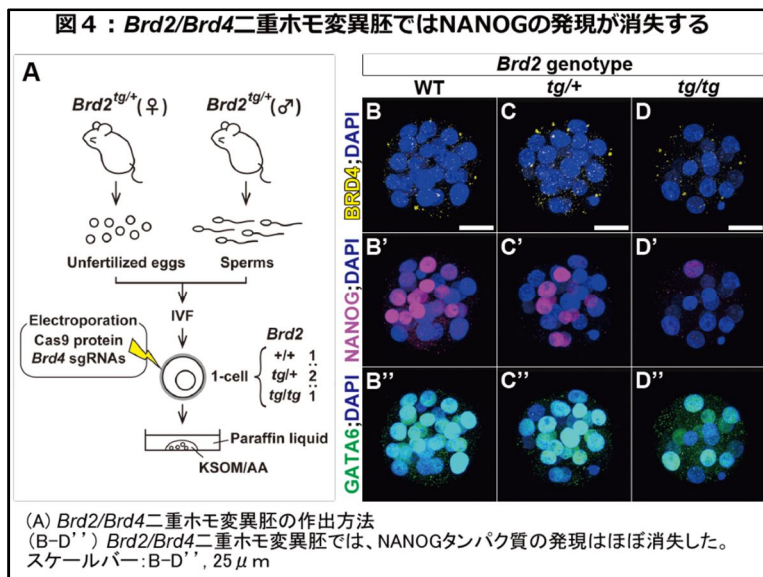
(3) 細胞運命決定期に働く BET の特定

体細胞で発現する BET には、BRD2、BRD3、BRD4 が知られている。さらに、これまで用いてきた BET 機能阻害剤 JQ1 は、これらのプロモドメインに結合することが報告されている。そこで、着床前の細胞運命決定期において、どの BET がエピプラストの特異化に重要な役割を果たすのか調べるために、BET の遺伝子欠損マウス胚を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法による表現型解析を行った。

まず、*Brd4* 遺伝子欠損胚の解析を行ったところ、NANOG 陽性のエピプラスト細胞は、着床期である 4.5 日目胚では激減していた。3.5 日目の *Brd4* 遺伝子欠損胚では、*Nanog* mRNA の発現は低下していたが、NANOG タンパク質の発現は減少していなかった。BET 機能阻害剤 JQ1 で処理した胚では、*Brd4* 遺伝子欠損胚よりも、より早い発生段階から NANOG タンパク質が消失していたことから、エピプラストの特異化や維持に *Brd4* は働いているものの、*Brd4* 以外の他の BET も重複して働いている可能性が示唆された。

そこで次に、胚盤胞胚を用いたマイクロアレイの結果をもとに、*Brd4*の次に発現が高い*Brd2*に着目した。3.5日目の*Brd2*遺伝子欠損胚では、野生型胚と比較して、*Nanog* mRNA や NANOG タンパク質の発現に変化は認められなかった。そこで、*Brd2/Brd4* 二重ホモ変異胚の表現型を解析することで、*Brd2* が *Brd4* と相補的に機能しているか調べた。*Brd4* と *Brd2* は同じ 17 番染色体上の近傍に位置するため、マウスの交配によって *Brd2/Brd4* 二重ホモ変異体を得られなかった。そこで、*Brd2* ヘテロ変異マウスを交配させて得られた受精卵に、CRISPR-Cas9 システムによるゲノム編集技術を用いて *Brd4* をノックアウトし、その後、受精卵を桑実胚期まで培養した(図4)。その結果、*Brd4* ホモ変異胚や *Brd2* ホモ変異胚では、NANOG タンパク質の発現に影響が見られなかった一方で、*Brd2/Brd4* 二重ホモ変異胚では NANOG の発現が消失した(図4)。さらに、*Brd4* ホモかつ *Brd2* ヘテロ変異胚でも、NANOG の発現が低下する傾向にあったことから、*Brd4* 欠損下において、*Brd2* のコピー数がエピプラスト細胞系譜の特異化に影響を及ぼすことが分かった(図4)。これらの結果から、着床前胚のエピプラスト細胞系譜の特異化には、*Brd4* が中心的な役割を、*Brd2* が相補的な役割を担っていることが明らかになった。

以上の研究成果は、BMC biology に掲載された。



< 引用文献 >

Frum&Ralston, *Trends Genet.* 2015
Jang et al., *Mol Cell.* 2005
Di Micco et al., *Cell Rep.* 2014
Houzelstein et al., *Mol Cell Biol.* 2002
Filippakopoulos et al., *Nature.* 2010
Tsume et al., *Biochem Biophys Res Commun.*2012

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ueda Yoko, Kimura-Yoshida Chiharu, Mochida Kyoko, Tsume Mami, Kameo Yoshitaka, Adachi Taiji, Lefebvre Olivier, Hiramatsu Ryuji, Matsuo Isao	4. 巻 31
2. 論文標題 Intrauterine Pressures Adjusted by Reichert's Membrane Are Crucial for Early Mouse Morphogenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107637 ~ 107637
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2020.107637	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 Mami Tsume-Kajioka, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Yoko Ueda, Isao Matsuo	4. 巻 20
2. 論文標題 BET proteins are essential for the specification and maintenance of the epiblast lineage in mouse preimplantation embryos	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Biology	6. 最初と最後の頁 64
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12915-022-01251-0	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mami Tsume, Chiharu Kimura-Yoshida, Yoko Ueda, Kyoko Mochida, Isao Matsuo
2. 発表標題 BRD4 is essential for transcriptional activation of JAK/STAT targets during epiblast lineage specification in the mouse pre-implantation development.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 MBSJ2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yoko Ueda, Chiharu Kimura-Yoshida, Kyoko Mochida, Mami Tsume, Yoshitaka Kameo, Taiji Adachi, Lefebvre Olivier, Ryuji Hiramatsu, Isao Matsuo
2. 発表標題 Embryo shape change from sphere to egg-cylinder mediated by intrauterine pressures is crucial for mouse primary axis formation.
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 MBSJ2020（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mami Tsume, Chiharu Kimura-Yoshida, Yoko Ueda, Kyoko Mochida, Isao Matsuo
2. 発表標題 BET proteins are essential for specification and maintenance of the epiblast lineage in mouse preimplantation embryos
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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

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