

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06492

研究課題名（和文）分化制御を担う転写プロセスにおけるヒストン脱メチル化酵素の役割

研究課題名（英文）The roles of histone demethylases in transcriptional process involved in cell differentiation

研究代表者

秋山 智彦（Akiyama, Tomohiko）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師

研究者番号：20570691

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、UTXの脱メチル化酵素非依存的な役割が示唆されたため、UTXのホモログであるY染色体にコードされるUTYに着目した。UTYは進化的に酵素活性部位に変異が起こり脱メチル化機能は認められない。UTXとUTYを両方とも欠損させると未分化ES細胞および分化細胞において、遺伝子発現の異常がグローバルにみられた。さらにエンハンサー領域に結合する転写因子の局在が数千か所に渡って変化していることが分かった。これらの結果から、UTXは脱メチル化酵素非依存的に転写因子の配置を制御しており、UTYと協調して分化制御に関わっていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、ヒト多能性幹細胞における転写制御因子のゲノム上の配置を制御する因子を同定した。これらの結果は、ヒト発生の分子機構を明らかにしただけでなく、細胞分化誘導技術の開発において有用な知見として期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we found that UTX regulates pluripotency of human ES cells by the demethylase activity independent pathway. Therefore, we focused on UTY, a homolog of UTX, which is encoded on the Y chromosome. UTY is evolutionarily mutated in the enzyme activity and has no demethylation function. When both UTX and UTY were deleted, abnormalities in gene expression were observed globally in undifferentiated ES cells and differentiated cells. Furthermore, the localization of transcription factors that bind to enhancer regions was altered in thousands of locations. These results indicate that UTX and UTY regulate transcription factor positioning in a demethylase-independent manner and are involved in the regulation of ES cell differentiation.

研究分野：幹細胞制御

キーワード：多能性 転写制御因子 配置制御

1. 研究開始当初の背景

多能性幹細胞では、分化に関わる遺伝子の多くはそのクロマチン領域が bivalent domain と呼ばれる特別な構造を形成することにより遺伝子発現が抑制されている。Bivalent domain からヒストン修飾 H3K27 のメチル基が取り除かれることにより発現が開始され、分化プログラムが起動する (図 1)。

H3K27 の脱メチル化には 2 つの相同性の高い酵素遺伝子が関与することが知られている (図 2)。JMJD3 と UTX と呼ばれるこれらの遺伝子は、両者とも JmjC ドメインを持ち、H3K27 を特異的に脱メチル化する。申請者は、先行研究において JMJD3 がヒト ES 細胞の分化時に発現することを見出し、その発現レベルと H3K27 の脱メチル化レベルに相関があることを明らかにした。さらに、JMJD3 の酵素活性部位をクローニングし、ES 細胞に過剰発現させると遺伝子領域の脱メチル化がグローバルに起こり、中内胚葉系遺伝子ネットワークが迅速に誘導されることを明らかにした。すなわち JMJD3 が ES 細胞の分化制御において重要な役割を果たすことを見出した (Development 2016, Stem Cells Int 2017)。しかしながら、もう一つの脱メチル化酵素である UTX の機能については殆んどわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、ES 細胞の分化制御における JMJD3 と UTX の機能の違いを明らかにし、二つの脱メチル化酵素による遺伝子発現調節機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) CRISPR-Cas9 システムを用いたゲノム編集を行い、ヒストン脱メチル化酵素遺伝子の C 末端側に標識タグをノックインさせ、分化前後における発現パターンやゲノム上における局在を網羅的に解析する。

(2) CRISPR-Cas9 システムを用いてヒストン脱メチル化酵素遺伝子のノックアウト細胞を樹立し、多能性維持や分化能についての機能解析を行う。遺伝子の 5' 側コーディング領域に guide RNA を設計することにより、開始コドン直下に終止コドンを人工的に挿入させ、翻訳を阻害しタンパク合成が起こらないようにする。この欠損 ES 細胞およびその分化細胞を用いて遺伝子発現プロファイリングを行う。分化誘導には Activin A, BMP4, VEGF を使った中胚葉系を用いる。遺伝子発現は RNA シーケンス法により網羅的に行う。

(3) 上記のノックアウト細胞を用いて、遺伝子のエンハンサー領域にリクルートされる転写因子の結合の有無や RNA ポリメラーゼの堆積および伸張反応を調べることにより、転写制御プロセスにおける JMJD3 と UTX の役割を明らかにする。またエンハンサー領域や Gene body 領域におけるヒストン修飾の変化を調べることにより、JMJD3 と UTX が制御するクロマチン構造変化を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 分化前後における JMJD3 と UTX の発現パターン

CRISPR-Cas9 システムを用いて、JMJD3 または UTX の C 末端側に 3xFlag タグをノックインさせたヒト ES 細胞を樹立し、分化前後におけるそれぞれの発現を免疫染色法 (Flag 抗体) により調べた。その結果、JMJD3 は未分化 ES 細胞では発現が検出されず、分化誘導させた細胞においてはじめて発現することが分かった (図 3)。これは、以前調べた RNA レベルでの発現パターンと一致する結果であった。一方で、UTX は分化細胞だけでなく、未分化 ES 細胞でも発現しており、分化前後での発現量に顕著な違いはみられなかった (図 3)。

(2) 分化前後における JMJD3 と UTX の局在パターン

上記の細胞を用いて Flag 抗体による ChIP シーケンス解析を行い、分化前後における JMJD3 と UTX のゲノムワイドな局在解析を行った。その結果、JMJD3 は免疫染色の結果と同様に ES 細胞で

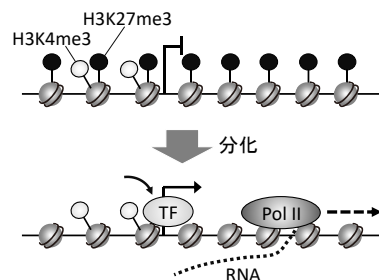


図1 多能性幹細胞における分化制御遺伝子の発現機構

遺伝子領域には、ヒストン修飾 H3K4me3 と H3K27me3 からなる bivalent domain が存在する。H3K4me3 はプロモーターに局在するが、H3K27me3 は遺伝子全体に存在する。分化するとすべての H3K27me3 が除去され、転写因子 (TF) や RNA ポリメラーゼ (Pol II) が結合し、分化遺伝子の転写プロセスが進行する。

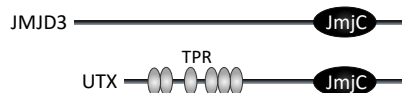


図2 JMJD3 と UTX の構造

H3K27me3 の脱メチル化酵素である JMJD3 と UTX はともに C 末側に JmjC ドメインを持つ。UTX には TPR (タンパク質間相互作用モジュール) が存在するが機能はわかっていない。

は局在を示すピークがほとんど検出されなかった。ところが分化細胞においては、約2万個のピークが検出され、そのほとんどが分化制御遺伝子の gene body 領域に堆積していることがわかった(図4)。これらの領域は、H3K27メチル化の脱メチル化が起こる領域と一致していた。一方UTXは、未分化ES細胞と分化細胞の両方で約2万個ずつのピークを検出することができた。局在の特徴を調べたところ、UTXはES細胞、分化細胞それぞれで高発現する遺伝子のプロモーターおよびエンハンサー領域に局在することが明らかになった(図4)。興味深いことにこれらの領域は、H3K27メチル化とは関連のない領域であることから、UTXは、ES細胞および分化細胞の両方で脱メチル化酵素非依存的に機能している可能性が示唆された。そこで、本研究では、UTX遺伝子のホモログであるUTYに着目した。X染色体上遺伝子であるUTXがヒストンの脱メチル化酵素であるのに対して、Y染色体にコードされるUTYは進化的に酵素活性部位に変異が起こり脱メチル化機能は認められない(Hong et al, PNAS 2007、Shpargel et al, PLoS genet 2012)。In vitroの質量分析解析でも活性がわずかに検出できる程度であり(Walport et al, JBC 2014)、そのためUTYの存在意義は未解明であった。上記のとおり本研究を実施する過程においてUTXが脱メチル化酵素に依存しない機能を果たす可能性が浮上してきたので、当初予定にはなかったが、酵素活性がもともと失活しているUTYの機能解析を進めることにした。UTXとUTYの両方を解析することにより酵素活性非依存的な新規の機能を明らかにできると考えた。

(3) UTYの局在パターン

UTXと同様にゲノム編集技術を用いてUTY遺伝子のC末端に3xFlagタグをノックインさせたヒトES細胞を樹立し、Flag抗体によるChIPシーケンスを行った。その結果、ピークの高さはUTXに比べて半分程度であったが、ほぼすべてのピークがUTXと共局在することが明らかとなった(図5)。これらの結果からUTXとUTYは酵素活性非依存的に協調して機能していることが示唆された。

(4) UTXとUTYの欠損による遺伝子発現への影響

UTXとUTYの機能を明らかにするために、それぞれの欠損株を樹立し、RNAシーケンスにより遺伝子発現への影響を網羅的に調べた。その結果、発現の変化した遺伝子の数はわずかに数十個個であったが、共通する遺伝子が増加していることが明らかとなった。そこで、UTXとUTYの両方を欠損させた細胞を樹立し、RNAシーケンスを行った結果、発現の変化した遺伝子が顕著に増加し、1000個以上の遺伝子が有意に変化していることが分かった(図6)。減少した遺伝子には、NODAL, LEFTYなどの多能性維持に関わる遺伝子が多く含まれており、増加した遺伝子には神経系に関わる遺伝子が多く含まれていた。これらの結果からUTXとUTYは、酵素活性に依存しない機能を持っていることが示された。

(5) UTXとUTYの欠損による転写制御因子への影響

遺伝子発現異常の分子メカニズムを明らかにするために、転写制御因子の解析を行った。未分化ES細胞において、転写因子OCT4のChIPシーケンスを行った結果、UTXとUTYを欠損させるとピークの数には変わらないものの、OCT4の局在エラ

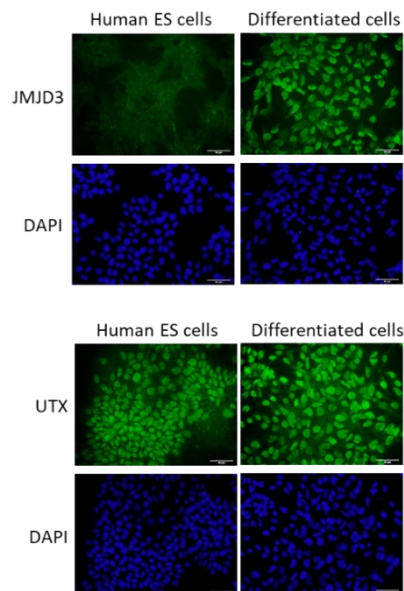


図3 JMJD3とUTXの発現パターン

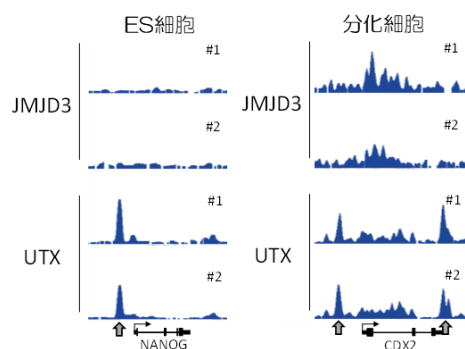


図4 JMJD3とUTXのChIPシーケンス解析

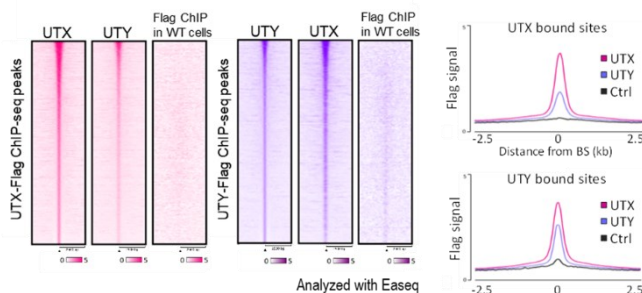


図5 UTXとUTYのChIPシーケンス解析

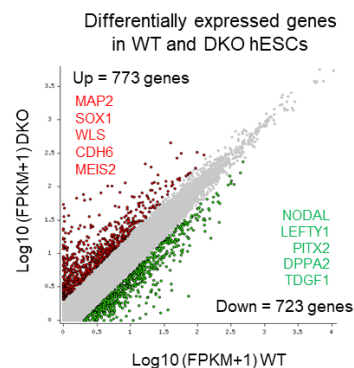


図6 UTXとUTYの欠損(DKO)による遺伝子発現の変動

一が起きていることが明らかとなった(図7)。さらに、OCT4と複合体を形成する転写制御因子やクロマチン制御因子についても同様の局在エラーが起きていることが明らかとなった(図8)。さらに本来結合が見られない領域の近傍遺伝子の発現を調べると、発現が活性化されており、神経系分化に関連する遺伝子が多くみられた。以上の結果から、UTXとUTYは未分化性を維持するために転写制御因子の局在を制御する遺伝子であることが示唆された。

OCT4 differential peaks in WT and DKO hESCs

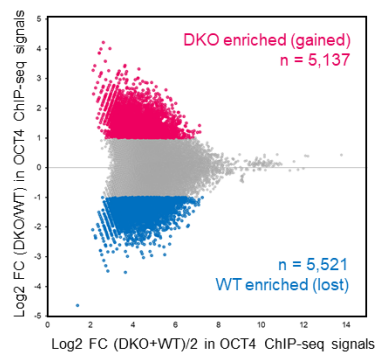


図7 UTXとUTYの欠損(DKO)によるOCT4の局在変化

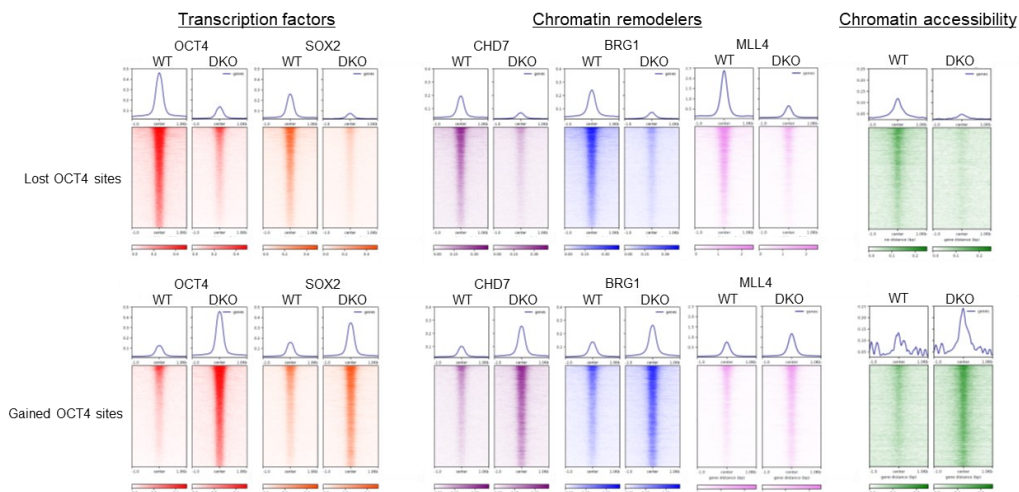


図8 UTXとUTYの欠損(DKO)による転写制御因子の局在変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Akiyama Tomohiko (責任著者)、Sato Saeko, Ko Shigeru B. H., Sano Osamu, Sato Sho, Saito Masayo, Nagai Hiroaki, Ko Minoru S. H., Iwata Hidehisa	4. 巻 10
2. 論文標題 Synthetic mRNA based differentiation method enables early detection of Parkinson's phenotypes in neurons derived from Gaucher disease induced pluripotent stem cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 STEM CELLS Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 572 ~ 581
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/sctm.20-0302	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 Tanosaki S, Tohyama S, Fujita J, Someya S, Hishiki T, Matsuura T, Nakanishi H, Ohto-Nakanishi T, Akiyama T, Morita Y, Kishino Y, Okada M, Tani H, Soma Y, Nakajima K, Kanazawa H, Sugimoto M, Ko MSH, Suematsu M, Fukuda K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Fatty Acid Synthesis Is Indispensable for Survival of Human Pluripotent Stem Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101535 ~ 101535
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101535	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 -

1. 著者名 Nakatake Yuhki, Akiyama Tomohiko (18番目)、Ko Minoru S.H.	4. 巻 31
2. 論文標題 Generation and Profiling of 2,135 Human ESC Lines for the Systematic Analyses of Cell States Perturbed by Inducing Single Transcription Factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107655 ~ 107655
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.107655	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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------