

博士論文

論文題目 Selenoprotein H のエピジェネティック作用に関する研究

氏名 田部井 靖享

目次

諸言	3
第一章	11
序論	12
材料と方法	14
結果	25
考察	27
第二章	34
序論	35
材料と方法	37
結果	42
考察	46
第三章	58
序論	59
材料と方法	61
結果	64
考察	68
総合討論	80
引用文献	86
論文要旨	106
謝辞	110

諸言

セレノプロテイン

セレンウムは環境中に広く存在する微量元素であり、哺乳類に必須の栄養素である。セレンウムの欠乏は、免疫能の低下や精子形成不全、気分障害、心臓病などを引き起こす。一方で、セレンウムは環境庁によって環境基準物質として定められており、過剰摂取はセレンウム中毒として、脱毛や爪の脆化、消化器疾患、発疹、神経系異常を引き起こす(Goldhaber SB 2003)。さらに、セレンウム濃度は急性の影響だけでなく、より長期的かつ持続的な影響を与えることも報告されている。妊娠の一時期にセレンウム濃度の高い食餌を与えた羊の仔は、出産時の体重には影響はないがその後の成長が良い(Yunusova RD et al 2013)。また、ヒトにおいて出産期の血中セレンウム濃度が母親の産後鬱と関連することが示された(Leung BM et al 2013)。高濃度のセレンウムは弱い催奇形性も認められる(Noda M et al 1979)。

セレノプロテインは後生動物に共通するタンパク質ファミリーであり、マウスにおいては 24 種類、ヒトで 25 種類のセレノプロテインが存在している(Stoytcheva ZR and Berry MJ 2009, Jiang L et al 2012)。セレノプロテインはセレノシステインを含むタンパク質ファミリーである(Lu J and Holmgren A 2009)。セレノシステインは元素セレンウムを含むアミノ酸であり、システインの硫黄 (S) がセレンウムに置換されている(Stoytcheva ZR and Berry MJ 2009)。セレノシステインはシステインによく似た構造を有するが、その pKa はシステインの 8.3 に対して、5.2 と高い反応性を示す(Bellinger FP et al 2009)。抗酸化作用を持つセレノプロテインの一つである Selenoprotein R (methionine-R-sulfoxide reductase B1 : Msrb1) にはセレノシステインを含まず代わりにシステインを含み、同様に抗酸化作用を持つパラログの Msrb2、Msrb3 が存在する。これらの遺伝子のセレノシステインやシステインに変異を導入した研究から、セレノシステインは抗酸化作用に必須ではないが、その抗酸化作用はシステインと比較して 100 倍以上であることが示されている(Kim HY and Gladyshev VN 2005)。一方で、いくつかのセレノプロテインでは進化の中でセレノシステインがシステインに置き換わっており、glutathione peroxidase 6 (Gpx6) はヒトやウシなど多くの哺乳類でセレノシステインを含むが、マウスとラットではセレノシステインを含まない(Lobanov AV et al 2008)。

セレノシステインは通常終止コドンである UGA コドンにコードされている(Lu J and Holmgren A 2009, Reeves MA and Hoffmann PR 2009)。セレノプロテインをコードする遺伝子領域の下流には mRNA 上で特殊な二次構造をとる selenocysteine insertion sequence (SECIS) element という配列を有する(Hill KE et al 1993)。セレノシステインの翻訳時には、SECIS element にセレノシステイン tRNA や SBP2 などのタンパク質複合体が形成される(Hill KE et al 1993, Carlson BA et al 2005)。セレノプ

ロテインの発現は転写だけでなく、翻訳段階においても調節を受けている。セレンウム不足では、セレノプロテインの mRNA はセレノシステインをコードする UGA におけるナンセンス変異依存 mRNA 分解機構 (nonsense-mediated decay : NMD) による分解が起き、セレノプロテインのタンパク質量は調整される(Moriarty PM et al 1998)。NMD による分解には各セレノプロテインによって感受性の差があり、SelH はセレンウム不足環境の肝臓、腎臓において分解を受けやすい(Sunde RA et al 2009)。

SelH

Selenoprotein H (SelH)は近年になって新たに同定されたセレノプロテインであり、第二エクソン上に 1 つのセレノシステインを有している(Kryukov GV et al 2003, Martin-Romero FJ et al 2001)。SelH はマウスゲノム第二染色体上に 4 つのエクソンを持つ遺伝子として 1,488 bp にわたってコードされており、タンパク質は 116 アミノ酸から構成される。ヒトからショウジョウバエまでよく保存されたアミノ酸配列を持つタンパク質である(Novoselov SV et al 2007)。SelH のオルソログはショウジョウバエにおいて 3 遺伝子存在しているが、その内 2 つはセレノシステインを含んでいない(Novoselov SV et al 2007)。また SelH オルソログはカイメンやシロイヌナズナにおいても確認されているが、それらのオルソログはセレノシステインを含んでいない(Novoselov SV et al 2007, Jiang L et al 2012)。SelH はセレノプロテインの中で唯一核移行シグナルを有している(図 0A)。先の研究においても、NIH3T3 細胞において、GFP 融合 SelH は核内に局在することが示された(Panee J et al 2007)。また、SelH は CXXU motif を有する(Novoselov SV et al 2007)。CXXU motif は抗酸化モチーフであり、同様に抗酸化モチーフである CXXC motif とよく似た構造をとる(Novoselov SV et al 2007, Martin JL 1995, Arnér ES 2010)。

SelH の機能

セレノプロテインの機能は生体にとって重要であり、セレノシステイン tRNA のノックアウトマウスの実験から、セレノプロテインは発生において必須であることが示されている(Bösl MR et al 1997)。これまでセレノプロテインの研究は Glutathione Peroxidases(Gpx)や Thioredoxin Reductases(TR)などの抗酸化作用を持つタンパク質の研究が先行してきた。そのため、SelH の機能についても CXXU motif が着目され、抗酸化作用について研究されてきた。

2003 年、ショウジョウバエ胚を用いた実験から、SelH のオルソログである dselH ノックダウンは胚の抗酸化物質濃度を低下させ、生存率を低下させることが報告された(Morozova N et al 2003)。マウス肺がん由来の LCC 細胞において、SelH ノックダウンは活性酸素による酸化ストレス下の生存率を低下させ(Novoselov SV et al 2007)、マウス海馬神経由来の HT22 細胞における SelH の強制発現は、還元型グルタチオン濃度

を上昇させ(Panee J et al 2007)、UV ストレス下において活性酸素産生を抑制することで生存率を上昇させることが報告された(Ben Jilani KE et al 2007)。さらに、UV ストレス下の SelH の強制発現による生存率の上昇にはミトコンドリア膜の脱分極の抑制と、ミトコンドリア生合成の促進が関与することが示された(Mendelev N et al 2011, Mendelev N et al 2009, Mehta SL et al 2013)。

SelH の発現

SelH mRNA の発現は初期胚および ES 細胞で高いことが報告されている(Novoselov SV et al 2007, Huang Z et al 2009)。また、ゼブラフィッシュの発生において、SelH は受精後 24 時間から 48 時間後において発現が確認され、増殖能の高い脳室や網膜、中脳蓋で特に発現が高い(Thisse C et al 2003)。さらに、ゼブラフィッシュにおける SelH の変異は発生異常を示し、SelH は初期発生において必須であることが示されている(Amsterdam A et al 2004)。

SelH の発現調節については、転写開始点付近に、metal response elements (MRE) を 5 つ有しており、亜鉛イオンが MEF 細胞において、MRE を介して SelH の発現を抑制することが知られている(Stoytcheva ZR et al 2010)。また、SelH は Delta-lactoferrin に対する応答配列を有していることも報告されている(Mariller C et al 2012)。また、一部のセレノプロテインの発現はセレンウム濃度の影響を受けることが知られていることから(Stoytcheva ZR and Berry MJ 2009)、セレンウム濃度との関連も指摘されている。最もよく研究されているセレノプロテインの一つである Gpx1 のラット肝臓での発現は低セレンウム給餌によって低下し、セレンウム過剰給餌で増加する一方、Gpx4 の発現はセレンウム濃度の影響を受けにくい(Saedi MS et al 1988, Lei XG et al 1995, Sun X et al 2001)。また、低セレンウム給餌によってマウス肝臓および腎臓で *SelH* mRNA の発現が低下するという報告がある(Sunde RA et al 2009)。

エピジェネティクス

エピジェネティクスは、細胞世代を超えて受け継がれる塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現調節の機構に対する学問領域である(Russo U et al 1996)。個体は数百という種類の様々な機能を持つ細胞から成るが、一部の例外を除いてそれらは全て同じゲノム配列を持つ。受精卵から胎児発生を経て、個体が形成される過程あるいは幹細胞からの分化誘導過程において、それぞれの細胞種に必要な遺伝子をオンとし、不要な遺伝子をオフとする使い分けを行う必要がある。さらに分化した細胞では、一度オフとした不要な細胞系列の遺伝子の記憶を引き継いでいく必要がある。エピジェネティックな制御機構は、核内におけるこのような遺伝子情報の使い分けのための仕組みであり、細胞分裂後も世代を超えて引き継がれる細胞の記憶装置である。全ゲノムにおけるエピジェネティック情報の総体をエピゲノムと言い(Murrell A et al 2005)、細胞の分化はエピゲノム

の変化であると言える。エピジェネティック制御系には、ヒストン修飾、DNA のメチル化修飾、ヒストンバリエーションの使い分け、non coding RNA などが存在する(Henikoff S et al 2004, Shiotani K 2004, Costa FF 2007)。これらのエピジェネティック修飾はクロマチン構造に影響を与え、遺伝子発現を制御する(図 0B)。

ヒストン修飾

ヒストン修飾はヌクレオソームを形成するヒストンが受ける化学修飾である。ヒストン修飾の種類としてはアセチル化、メチル化、リン酸化、ユビキチン化など様々な修飾が知られている(Jenuwein T and Allis CD 2001)。ヒストンのリジンのメチル化修飾は最も広範に認められるヒストン修飾の一つである。ヒストンのメチル化は主に、ヒストン H3 の N 末端から 4 番目(H3K4)、9 番目(H3K9)、27 番目(H3K27)、36 番目(H3K36)、79 番目のリジン(H3K79)およびヒストン H4 の N 末端から 20 番目のリジン(H4K20)に認められる。一般に、H3K4、H3K36、H3K79 のメチル化はクロマチンを弛緩させ、遺伝子発現を促進し、H3K9、H3K27、H4K20 のメチル化はクロマチンを凝集させ、遺伝子発現を抑制する(Sims RJ 3rd et al 2003)。ヒストンのリジンのメチル化には、転位されるメチル基の数によって、モノメチル(me1)、ジメチル(me2)、トリメチル(me3)の 3 つの形態が存在する。

ヒストン H3K4 のメチル化は mixed-lineage leukemia (Mll) ファミリーである Mll1、Mll2、Mll3、Mll4、Set1a、Set1b が行う(Vastenhouw NL and Schier AF 2012, Dou Y et al 2006)。Mll は Wdr5、Rbbp5、Ash2l、Dpy30 から成る Mll complex を構成する(Jiang H et al 2011, Ang YS et al 2011, Ernst P and Vakoc CR 2012, Ernst P and Vakoc CR 2012)。また、ヒストン H3K4 の脱メチル化はヒストン脱メチル化酵素である Kdm1a、Kdm1b、Kdm5b によって行われる(Shi Y et al 2004, Fang R et al 2010, Iwase S et al 2007)。H3K4 のメチル化修飾は発生において重要で、Mll1 のノックアウトマウスは胚性致死となる(Yu BD et al 1995)。H3K4me3 修飾を受ける遺伝子のプロモーター領域の多くには、H3K9 および H3K14 のアセチル化修飾が認められ、その下流域には H3K36、H3K79 のメチル化修飾が認められる(Guenther MG et al 2007)。また、H3K4me3 修飾は H3K27me3 修飾を行う PRC2 を阻害することが知られている(Schmitges FW et al 2011)。

H3K27 のメチル化修飾は PRC2 (polycomb repressive complex 2) によってヒストンに付与される(Schuettengruber B et al 2007, Cao R et al 2002, Müller J et al 2002)。Ezh2、Suz12、Eed は PRC2 の主な構成タンパク質である(Margueron R et al 2008, Pasini D et al 2004, Cao R and Zhang Y 2004, Ketel CS et al 2005)。H3K27 のメチル化修飾も発生において重要な役割を果たし、Eed のノックアウトマウスは胚性致死を示す(Faust C et al 1995)。一方、H3K27 のメチル化修飾は Jmjd3 および Utx によって脱メチル化される(Hong S et al 2007)。PRC2 は、Jarid2 および Aebp2 にリクルー

トされ、これらの因子は非メチル化状態にある CpG 配列を認識して DNA と結合する (Kim H et al 2009, Peng JC et al 2009)。また、PRC2 は H3K36me3 修飾を認識する Pcl2 によってもリクルートされる (Walker E et al 2010, Brien GL et al 2012)。さらに、H3K27me3 修飾は H3K4 のメチル化を行う Mll complex の阻害をすることが報告されているなど (Kim DH et al 2013)、ヒストン修飾は互いに影響を与え合っている。

DNA のメチル化修飾

DNA はシトシン、グアニンと連続する配列 (CpG 配列) のシトシンがメチル化され、一般にメチル化された DNA はクロマチンを凝集させ、遺伝子の発現抑制を行う (Shiota K 2004)。組織や細胞種によって DNA メチル化状態の異なる領域を T-DMR (tissue-dependent and differential methylation region) といい、ゲノム上には数千ヶ所の T-DMR が確認されており、T-DMR の DNA メチル化状態は遺伝子発現と相関する (Shiota K 2004, Yagi S et al 2008, Rakyan VK et al 2008)。DNA のメチル化修飾は DNA メチル基転位酵素 Dnmt 群によって付与される。Dnmt1 はヒストン H3K9 のメチル化酵素である G9a やヘテロクロマチン結合タンパク質である HP1 と相互作用している (Estève PO et al 2006, Smallwood A et al 2007)。DNA の脱メチル化は、DNA の複製時にメチル基が娘鎖に引き継がれないことによる受動的脱メチル化に加え、tet methylcytosine dioxygenase (Tet) によるヒドロキシルメチル化を介した能動的脱メチル化によって起きる (Ito S et al 2010, Nabel CS et al 2012, Kohli RM and Zhang Y 2013)。

クロマチンリモデリング

クロマチンは核内における DNA とタンパク質の複合体であり、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 をそれぞれ 2 つずつ含むヒストン八量体に DNA が巻き付いたヌクレオソームを基本構造とする (Burlingame RW et al 1985, Luger K et al 1997)。クロマチンはその凝集の度合いにより、凝集した領域であるヘテロクロマチンと弛緩したユークロマチンに分類される。ヘテロクロマチン領域では、DNA への転写因子のアクセスは構造的・機能的に阻害され、一般的には遺伝子発現は抑制される。ヘテロクロマチンはその構成タンパク質 HP1 を介して核膜の Lamin と結合することが知られている (Ye Q and Worman HJ 1996, Nielsen AL et al 2001)。そのため、ヘテロクロマチン領域は核辺縁の核膜直下に認められることが多い (Reddy KL et al 2008)。また、核膜とクロマチンの結合においては H4K20 のメチル化修飾に関わることも報告されている (Hirano Y et al 2012)。本研究室における近年の研究で、ヒト臍帯血中濃度の 10 倍程度である 100 ppb という低濃度のセレンウムが ES 細胞のヘテロクロマチン構造に変化をもたらすことが示された (Arai Y et al 2011)。

クロマチンリモデリングは、ヒストンと DNA の結合を緩め、ヌクレオソーム構造を

変化させることで起こる、クロマチンの再構築である。クロマチンリモデリングは SWI/SNF complex や RSC complex などのクロマチンリモデリング因子によって、ATP 依存的に行われる (Saha A et al 2002, Zhang Y et al 2006)。RSC はヌクレオソームを構成する DNA の位置を平均で 35 bp 移動させる (Sirinakis G et al 2011)。さらに 2 つの隣接するヌクレオソームから、1 つのヒストン八量体を除外してヌクレオソームを一つ除去する反応も知られている (Dechassa ML et al 2010)。また、クロマチンリモデリング因子はヌクレオソームの位置や数を変えるだけでなく、ヒストンの入れ替えを介してヒストンバリエントの使いわけにも関与する。クロマチンリモデリング因子 Swr1 はヒストン H2A をそのバリエントであるヒストン H2AZ に置き換える (Mizuguchi G et al 2004)。また、クロマチンリモデリング因子はヒストン H3 のアセチル化によってリクルートされ、ヌクレオソームの移動や除去を行うことが報告されている (Chatterjee N et al 2011)。

本研究の目的

CXXC motif の繰り返しから成る CXXC domain は、DNA 結合ドメインとしての機能も有している (Hashimoto H et al 2010)。CXXC domain は非メチル CpG に結合するドメインであり、ヒストン H3K4 メチル化酵素である Mll やヒストン H3K4 メチル化酵素 Set1 の結合タンパク質 Cfp1、ヒストン脱メチル化酵素の Kdm2a、DNA メチル基転位酵素の Dnmt1、メチル化 DNA のヒドロキシル化酵素である Tet1 などのエピジェネティック因子に共通する (Hashimoto H et al 2010, Lee JH and Skalnik DG 2005)。

SelH は CXXU モチーフに加えて、核移行シグナルと AT hook モチーフを有している (Panee J et al 2007)。先の研究においても、NIH3T3 細胞において、GFP と融合させた SelH は核内に局在することが示された (Panee J et al 2007)。AT hook は Hmga や Baf250 などのクロマチンリモデリング因子に共通する DNA 結合モチーフであり、AT 密度の高い DNA の副溝に結合する (Aravind L and Landsman D 1998)。Hmga は ES 細胞において発現が高く、クロマチン凝集を起こすリンカーヒストン H1 と置き換わり、クロマチンを弛緩させることが知られている (Reeves R and Beckerbauer L 2001)。また、Baf250 は SWI/SNF 複合体を形成するタンパク質であり、ES 細胞の特徴的なクロマチン状態の維持に必須である (Yan Z et al 2008, Gao X et al 2008, Kidder BL et al 2009)。

セレノシステインに変異を加えた組み換え SelH を用いた結合タンパク質探索実験から、SelH はヒストンメチル化酵素と複合体を形成する Rbbp5 やヒストンシャペロンである Nucleolin と結合することが示されている (Novoselov SV et al 2007)。

Rbbp5 はヒストン H3K4me3 修飾を行う Mll complex の構成因子の一つであり、H3K4 のメチル化酵素である Mll に結合し、H3K4me3 修飾に必須な因子である (Dou Y et al 2006, Steward MM et al 2006)。さらに、Rbbp5 は H3K27me3 修飾の脱メチル

化酵素である Jmjd3 と結合することが報告されている(De Santa F et al 2007)。

Nucleolin はヒストン H2A-H2B 二量体の輸送を介したヒストン八量体の形成およびヌクレオソーム中の H2A-H2B 二量体の代謝を行うヒストンシャペロンである(Angelov D et al 2006)。Nucleolin はクロマチンリモデリング因子である SWI/SNF や ACF 複合体の活性を促進し、クロマチンリモデリングを促進する(Angelov D et al 2006)。蛍光 H2B を用いた蛍光退色後回復測定 (fluorescence recovery after photobleaching : FRAP) 法の結果から、Nucleolin はクロマチン動態を制御することが示されている(Gaume X et al 2011)。また、Nucleolin はヒストンバリエントの使い分けにも関与しており、ヒストン H2A-H2B 二量体の代謝に際して、クロマチンリモデリングを阻害するヒストンバリエント macroH2A のクロマチンリモデリングを促進する一方で、転写活性の高いクロマチンに存在するヒストンバリエント H2ABbd のクロマチンリモデリングには関与しない(Angelov D et al 2006, Chadwick BP and Willard HF 2001, Angelov D et al 2003)。Nucleolin は macroH2A を抑制することで rDNA のヒストン H3 修飾の維持、転写を脱抑制していることが示されている(Cong R et al 2013)。また、非常に興味深いことに、Nucleolin は SECIS element に結合し、セレノプロテインの翻訳に関与することも報告されている(Miniard AC et al 2010)。

以上のことから、SelH は核内におけるクロマチン構造の調節因子としての役割を有することが考えられる(図 0C)。本研究では、SelH のゲノム調節機能を明らかにすることを目的として、ES 細胞を用いて研究した。第一章ではまず、SelH ノックダウン ES 細胞および SelH 発現 ES 細胞の樹立を試みた。そして、SelH がヘテロクロマチン状態に与える影響の解析を行った。第二章では、SelH ノックダウン ES 細胞を利用した、多分化能マーカー遺伝子の発現解析と胚葉体形成実験から、SelH の ES 細胞の多分化能における機能を解析した。第三章では、SelH の有する分化制御機能を神経分化に焦点を当てて解析した。

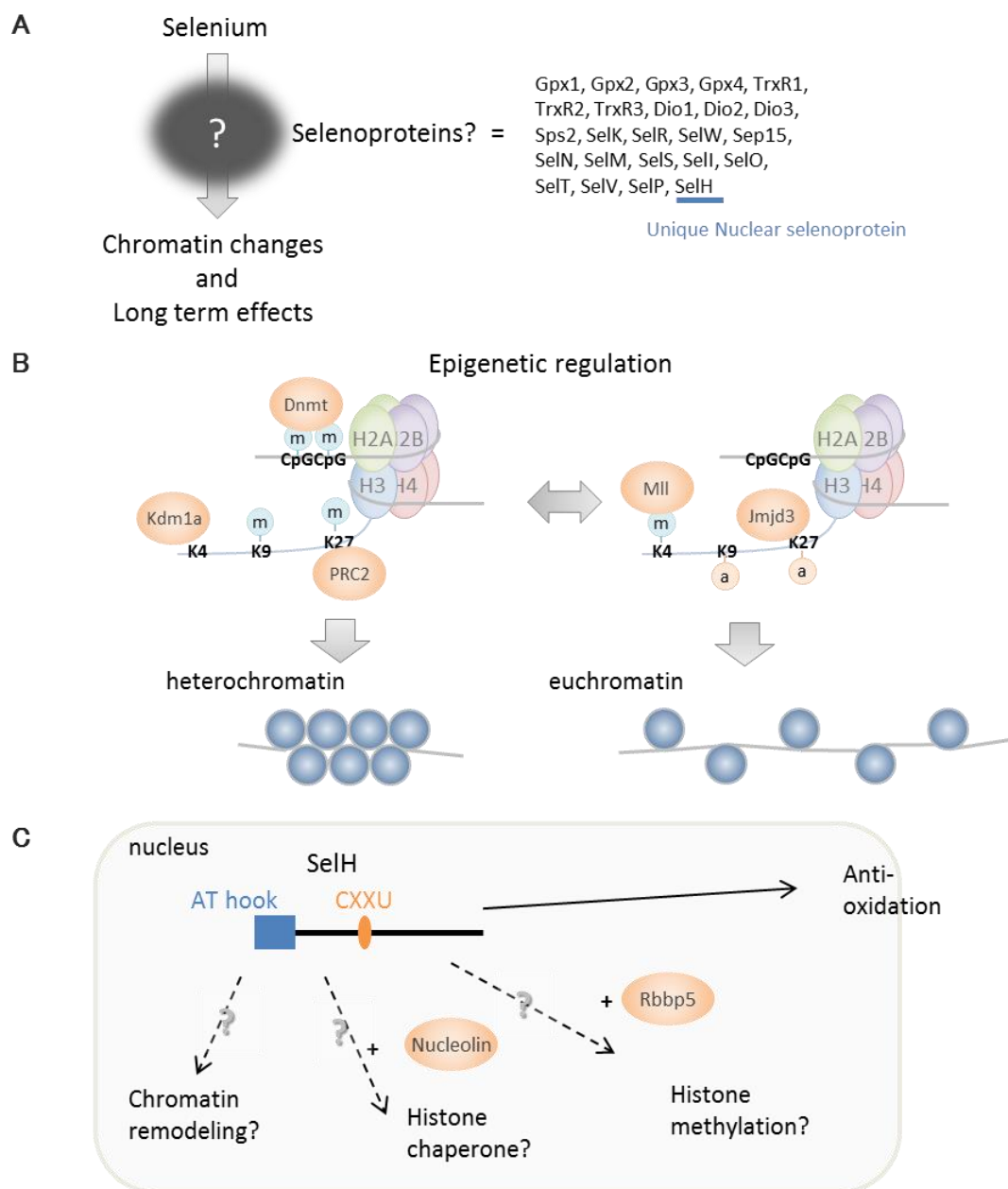


図0 SelHとエピジェネティクス

- A) セレニウムは核内のクロマチンの変化や長期・持続的变化を引き起こすが、そのメカニズムは不明である。生体におけるセレニウムは、主にセレノプロテインとして存在している。その中で、核内タンパク質はSelHのみである。
- B) DNAやヒストンはエピジェネティックな修飾を受ける。DNAのメチル化、ヒストンH3K9、H3K27のメチル化はクロマチンを凝集させる。一方、ヒストンH3K4のメチル化、ヒストンのアセチル化はクロマチンを弛緩させる。
- C) SelHはその機能として、抗酸化作用が知られている。しかし、その構造や結合タンパク質から、核内においてクロマチンリモデリングやヒストンシャペロン、ヒストンのメチル化修飾などに関与することが疑われる。

第一章

SelH ノックダウン ES 細胞の樹立 およびクロマチン状態の解析

序論

胚性幹細胞 (Embryonic stem cell : ES 細胞) は胚盤胞期の内部細胞塊 (inner cell mass : ICM) から樹立された細胞であり、無限に増殖する自己複製能と成体を形成する全ての細胞種に分化することができる多分化能を有する (Smith AG 2001, Kashyap V et al 2009, Nakai-Futatsugi Y and Niwa H 2013)。マウス ES 細胞のヘテロクロマチン領域を染色すると、分化後の細胞と分布が異なり、ヘテロクロマチン領域は少数のドット状の領域として観察される (Meshorer E et al 2006)。ヒト ES 細胞では分化後の細胞と比較して、第 6 染色体の分布する領域が広く、HP1 の凝集領域が少ない (Bártová E et al 2008)。また、FRAP 法による解析から、ES 細胞のヒストン H2A、H2B やヘテロクロマチン構成タンパク質である HP1 の動態は、分化後の細胞に比べて高い運動性を有することが示されており (Bhattacharya D et al 2009)、ES 細胞は特徴的なクロマチン構造を有し、全体的にクロマチン構造が弛緩していると考えられている。

SelH mRNA は初期胚および ES 細胞で発現が高いことが報告されている (Novoselov SV et al 2007, Huang Z et al 2009)。また、ゼブラフィッシュの初期発生において、*SelH* は必須であることが示されている (Amsterdam A et al 2004)。そのため、*SelH* は初期胚やそのモデルである ES 細胞において重要な役割を果たしていることが示唆されている。

セレノシステインは終止コドンでもある UGA コドンにコードされており、その mRNA は nonsense-mediated decay (NMD) による分解が起き、セレノプロテイン発現は翻訳段階においても調節される (Moriarty PM et al 1998)。そのため、セレノプロテインの解析においては mRNA のみでなく、抗体を用いたタンパク質解析が重要である。UGA における NMD のために、セレノプロテインの強制発現は野生型のままでは困難である。先に行われている *SelH* の機能解析に関する研究においても、野生型の *SelH* の強制発現は困難であり、セレノシステインをコードする UGA で翻訳が停止した不完全なタンパク質ばかりが大量に発現してしまうことが示されている (Novoselov SV et al 2007)。そのため、*SelH* の研究における強制発現ではセレノシステインをシステインに変えた変異型の *SelH* が用いられている (Panee J et al 2007, Novoselov SV et al 2007)。

第一章では、*SelH* の ES 細胞のクロマチン状態に与える影響を解明することを目的とし、ノックダウン ES 細胞の樹立を試みた。この時、*SelH* は ES 細胞の維持や増殖に必須であることも考えられ、ES 細胞における *SelH* のノックアウトやノックダウンは困難であり、生存や未分化状態を維持できないことも十分に考えられる。さらに、*SelH* 抗体の作成、セレノシステインをシステインに変異させ、EGFP タグをそれぞれ N 末端と C 末端に付加した変異型 *SelH* の強制発現細胞株の樹立を試みた。

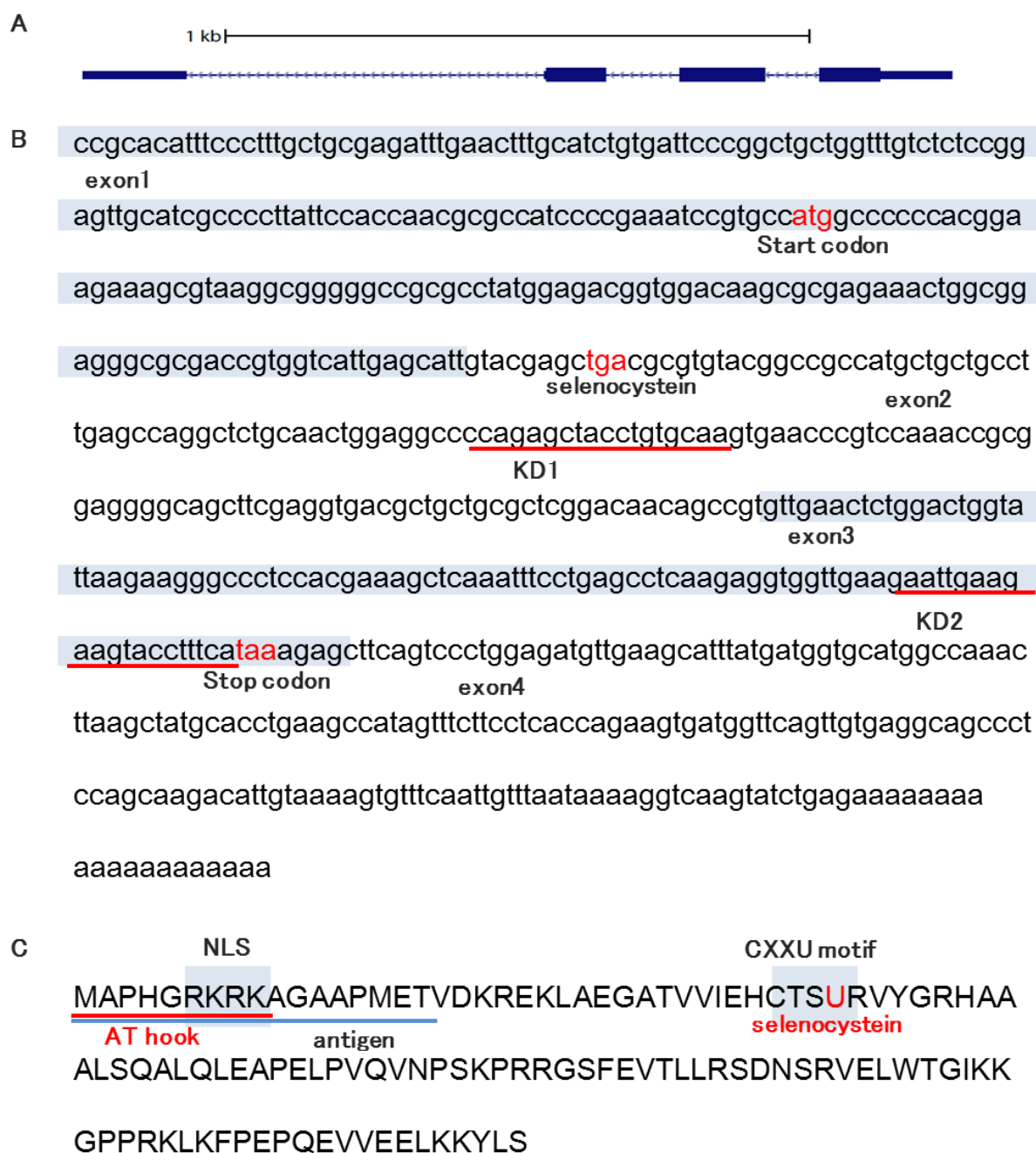


図1-1 マウスSelH遺伝子情報

- A) SelHの遺伝子領域: 太いブロックはタンパク質コード領域、細いブロックはUTR、線はイントロンを表す。矢印は転写される方向を表す。
- B) SelHのmRNA: 青い領域はエキソン1及び3、白い領域はエキソン2および4を表す。赤字は開始コドン、終止コドンおよびセレノシステインをコードするコドン、赤線はノックダウンのターゲット配列を表す。
- C) SelHのアミノ酸配列: 青い領域は核移行シグナル(NLS)およびCXXUモチーフ、赤線はAT hookモチーフを表す。赤字はセレノシステインを表し、青線は抗体の抗原に用いた配列を表す。

材料と方法

試薬は特に記載のない限り和光純薬工業株式会社より購入した。プライマーは SIGMA GENOSYS JAPAN より購入した。使用したプライマー配列は表 1-1 に示す。

SelH 抗体(SelH-TB13)の作成

SelH 抗体の作成は、SelH アミノ酸の N 末端から 17 アミノ酸にシステインを付加した MAPHGRKRKAGAAPMETC ペプチドを用いた。アジュバンドとして、システインの SH 基に keyhole limpet hemocyanin を結合させ、抗原とした(Jerry DJ et al 1993)。免疫動物はウサギ(Japanese White Rabbit)を用いた。ウサギへの免疫は計 8 回行った。初めの免疫から 2、3、4、5、6、8、9 週間後にそれぞれ追加免疫を行い、10 週間後に全血採取して回収した。

抗血清は抗原ペプチドを結合したセファロースカラムで精製した (Bar-Peled M and Raikhel NV 1996)。セファロースカラムはセファロースゲル 0.3 g を coupling buffer (0.5 M NaCl, 0.1 M NaHCO₃ pH 8.3)で膨潤させ、1,000 g 室温で 2 分間遠心分離した。遠心分離は、微量高速冷却遠心機 (TOMY, cat. MX-307)で行った。MAPHGRKRKAGAAPMETC ペプチドを 0.5 mg/ml となるように coupling buffer に溶解し、2 ml をゲルに加え 4℃で一晩反応させた。1,000 g 室温で 2 分間遠心分離し、10 ml の coupling buffer で 2 回洗浄した。その後、acetate buffer (0.1 M 酢酸, 0.5 M NaCl pH 4.0) で 1 回、coupling buffer でさらに 2 回洗浄した。ゲルをカラム(Bio-Rad, cat. 731-1550)に加え、血清 10 ml を 4℃で一晩反応させた。カラムは洗浄 buffer (20mM Tris-HCl, 1 M NaCl 1% Triton X-100 pH 7.6) で 1 回、TBS (20 mM Tris-HCl, 0.15 M NaCl pH 7.6) で 2 回洗浄した。その後溶出 buffer (0.1 M グリシン-HCl pH 2.5)で溶出した。その後、Snakeskin dialysis tubing (Thermo scientific, cat. 68035)で透析し、バッファーを 50%グリセロール/PBS に置換した。これらのペプチド合成、ウサギ免疫、抗体精製は医学生物学的研究所に委託して行った。

未分化 ES 細胞の培養

129S4/SvJae マウスから樹立された ES 細胞(株名、J1)を用いた。培養は先の報告(Li E et al 1992) を一部改編して行った。ES 細胞はゼラチン (SIGMA, cat.G2500)でコートした 10 cm 培養皿 (Fast Gene, cat. FG-2090)上で培養した。15% FBS (BIOWEST, cat.S-1820-50, lot.SO599351820)、1× MEM Non-Essential Amino acids solution(Life Technologies, cat.11140)、100 μM 2-mercaptoethanol (Life Technologies, cat.21985)、50 U/ml penicillin & 50 μg/ml streptomycin (Life Technologies, cat.15070)、1 mM Sodium Pyruvate (Life Technologies, cat.11360)、2 mM L-glutamine (Life Technologies, cat.25030)、1000 U/ml ESGRO (Millipore,

cat.ESG1107) を添加した DMEM (ES 細胞用培地)を用い、37℃、5% CO₂存在下で培養した。培養は CO₂ インキュベータ (SANYO, cat. MCO-5AC)で行った。培地は1日おきに交換した。細胞回収時には、0.05% Trypsin/EDTA (Life Technologies, cat.25200)で 37℃ 3 分間処理した後、ES 細胞用培地を加えて酵素反応を停止させ、3,000 rpm 室温で 3 分間遠心分離して細胞を回収した。遠心分離には、HIMAC (HITACHI, cat. CF7D2)を用いた。回収した細胞は直ちに液体窒素で凍結し、使用するまで-80℃で保存した。今回の研究では継代数 39~54 の ES 細胞を用いた。

ウエスタンブロッティング

細胞からの核タンパク質の抽出は、先の報告を元に Nuclear Complex Co-IP kit (Active Motif, cat.54001)を用いて行った(Dignam JD et al 1983)。1×10⁷の細胞ペレットに対して、500 µl の Hypotonic buffer (10 mM HEPES pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl) でペレットを溶解し、氷上で15分間インキュベートした。25 µl の Detergent (10% IGEPAL) を加えて混合した後、10,000 g 4℃で 30 秒間遠心分離した。ペレットとなったタンパク質を 100 µl の complete digestion buffer (20 mM HEPES pH 8.0, 1.5 mM MgCl₂, 0.42 M NaCl) に混合し、0.5 µl の enzymatic shearing cocktail を加えて、37℃に 10 分間反応させた。その後 2 µl の EDTA を加えて反応を停止した後、10,000 g 4℃で 10 分遠心分離し、上清を核タンパク質として回収、ウエスタンブロッティングに使用した。タンパク質濃度は BCA protein assay kit (Pierce cat. 23225)を用いて行い、総量 5 µg のタンパク質をウエスタンブロッティングに用いた。

タンパク質は lane marker reducing sample buffer (Thermo Scientific, cat.39000)を加えて、95℃で 3 分間処理した。泳動はミニプロティアン Tetra セル(BioRad, cat. 165-8004)およびパワーパック HC (BioRad, cat. 164-5052)を用いた。15%アクリルアミドゲル (15% アクリルアミド, 375 mM Tris-HCl pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05%過硫酸アンモニウム, 0.05% TEMED および 5% アクリルアミド, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05%過硫酸アンモニウム, 0.05% TEMED)で、泳動 buffer (0.25 M Tri-HCl pH 7.6, 1.92 M グリシン, 1% SDS)を用いて、定電圧 200 V で 45 分間泳動した。transfer buffer (0.25 M Tri-HCl pH 7.6, 1.92 M グリシン, 10% メタノール, 1% SDS)中で、イモビロン-P トランスファー メンブレン(Millipore, cat.IPVH304F0)に定電圧 15 V で 50 分間、セミドライ式トランスファー装置(BIO CRAFT, cat. BE-330)を用いてトランスファーした。トランスファー済みのメンブレンは 5% スキムミルク, 0.1% Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate を添加した TBS (blocking buffer)を用いて、室温で 1 時間ブロッキングした。使用した一次抗体と濃度は表 1-2 に記す。二次抗体はヤギ抗ウサギ IgG (H+L) HRP 抗体 (Jackson ImmunoResearch, cat.111-035-003) もしくはロバ抗ヤギ IgG(H+L)HRP 抗体 (Jackson ImmunoResearch, cat.705-035-147)を 0.1% Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate を添加した TBS

(TBS-T)中に 0.2 µg/ml 加えて室温で 1 時間反応させた。検出は SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, cat. 34080)を用いて、GenGnome System (Syngene, cat. CGNOMEXP-HR-5)で検出した。SelH 抗体の評価の際のタンパク質サイズの測定は、11 kDa、17 kDa、20kDa のタンパク質マーカの位置から、指数近似曲線を描いて求めた。タンパク質マーカはプレステインタンパク質サイズマーカー (WAKO, cat. 230-02461)を用いた。3 回の実験の平均値を示した。

一過性 SelH 強制発現ベクターの作成

ベクター作成は図 1-2A のフローチャートに示した。SelH 翻訳領域(ORF)の 5' 末端に NheI (Takara, cat.1162A)の認識配列、3' 末端に NotI (Takara, cat. 1166A)の認識配列を設けたプライマー (SelH-NheI、SelH-NotI) を設計した。このプライマーを用いて、ES 細胞の cDNA を鋳型として、SelH の ORF を PCR で増幅した。PCR は 20 µl のスケールで行い、酵素として LA-Taq DNA Polymerase (Takara, cat. PR02BG)を用いた。PCR は 95°C で 3 分間変性させた後、[94°C・30 秒、60°C・30 秒、72°C・1 分]を 1 サイクルとし、30 サイクル行った後 72°C で 2 分間反応させた。PCR 産物は 2%アガロースゲルで電気泳動し、UV 照射下で目的のバンドを切り出し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega, cat. A9282) で精製した。その後、PCR 産物を pGEM-T Easy Vector System (Promega, cat. A1360) を用いてクローニングし、BigDye Terminator v3.1 Sequencing Standard (Life Technologies, cat.4337455) で DNA を標識・増幅し、Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザ(Life Technologies, cat. 3130xl)で塩基配列を確認した。

SelH のセレノシステインをシステインに置換する変異は、セレノシステインをコードする ACT を ACA に変換したプライマー (SelH-M1, SelH-M2) を作成し、QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE, cat.200523) を用いて、SelH の ORF を組み込んだ pGEM-T Easy Vector に対して PCR を行い、点変異を導入した。配列の確認は上記と同様にシーケンス解析を行った。

ベクター作成には CAG プロモーターを有する pCAG-EGFP/RFP-int ベクター (Addgene, cat. 19818)、IRES-Venus を有する MSCV PIG ベクター(Addgene, cat. 18751)、Zeocin 耐性遺伝子を有する pcDNA4/TO ベクター(Life Technologies, cat. V1020-20)を用いた。MSCV PIG ベクターを XhoI (Takara, cat.1094A)で処理して、pPGK-Puro-IRES-Venus 配列を切り出した。切り出した配列を XhoI で処理した pCAG-EGFP/RFP-int ベクターの XhoI サイトに導入した。次にこのベクターの puromycin 耐性遺伝子を NheI と NsiI (NEB, cat. R0127S)で切り出した。Zeocin 耐性遺伝子の N 末端に NheI サイト、C 末端に NsiI サイトを付加するプライマーを作成し (Zeo-NheI, Zeo-NsiI)、pcDNA4/TO ベクターから Zeocin 耐性遺伝子をクローニングした。この Zeocin 耐性遺伝子を先に作成したベクターの NheI、NsiI サイトに導入した。

このベクターを *EcoRI* (Takara, cat. 1040A) で切断し、T4 DNA Polymerase (Promega, cat. M4211) で平滑化した後、*NotI* で切断した。SelH 配列を組み込んだ pGEM-T Easy Vector を *NheI* で切断し、T4 DNA Polymerase で平滑化した後、*NotI* で切断した。そしてこのベクターの平滑化断面・*NotI* サイトに切り出した SelH insert を導入した。

SelH ノックダウンベクターの作成

実験の流れは図 1-2B に示した。shRNA ベクターを利用し、それぞれ第 2 エクソン、第 3 エクソンをそれぞれターゲットとした shRNA を発現する SelH ノックダウンベクター(KD1 および KD2)を作成した(図 1-2A)。コントロールは LacZ mRNA に対する shRNA を用いた。SelH ノックダウンベクターは、pSingle-tTS-shRNA ベクター (Clontech, cat. 630933)を *XhoI* および *HindIII* (Takara, cat. 1060A)で切断し、合成した shRNA 配列を *XhoI* および *HindIII* サイトに組み込むことで作成した。同様に、LacZ mRNA をターゲットとした shRNA 配列を pSingle-tTS-shRNA ベクターに *XhoI* および *HindIII* サイトに組み込むことで、コントロールベクターを作成した。shRNA 配列および作成に使用したプライマーの配列情報は表 1-1 に記した。

野生型 SelH 強制発現ベクターの導入

実験の流れを図 1-4A に示した。8×10⁵ 個の ES 細胞をゼラチンでコートした 10 cm 培養皿(Fast Gene, cat. FG-2090)に播種した。翌日に Lipofectamine 2000 (Life Technologies, cat.11668)を用いてトランスフェクションを行った。Opti-MEM I (Life Technologies, cat.31985) 1.5 ml で Lipofectamine 60 µl とベクター24 µg を結合させ、ES 細胞用培地に加えて、37℃で 4 時間培養し、その後培地を交換した。18 時間後、細胞を 0.05% Trypsin/EDTA ではがし、新しい培養皿に播種し、6 時間培養した。その後、zeocin (Life Technologies, cat. R25001)を終濃度 400 µg/ml になるように加えた。その後 1 日おきに培地交換、2 日おきに継代、3 日おきに同様にトランスフェクションを行い、9 日後に 0.05% Trypsin/EDTA で細胞をはがして回収した。この時、トランスフェクションを行っていないコントロールの細胞が zeocin によって死滅していることを確認した。

免疫蛍光染色

細胞に 4%パラホルムアルデヒドを添加した PBS (SIGMA, cat. P4417)を加え、室温で 20 分間固定した。細胞を PBS で洗った後に、0.2% Polyoxyethylene (10) Octylphenyl Ether /PBS を加え 37℃で 1 時間透過処理を行った。その後、0.05% Goat Serum (コスモバイオ, cat. CL1200)、0.02% Albumin from Bovine Serum (SIGMA, cat. P49418)、0.1% Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate を添加した PBS (Blocking Buffer)を加えて 4℃で一晩ブロッキングした。一次抗体を表 1-2 の割合で Blocking Buffer に

混ぜ、4℃で一晩反応させた。その後 0.1% Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate /PBS (PBS-T) で一次抗体を洗い、二次抗体を 1 µg/ml の割合で加えた PBS-T で、室温 1 時間反応させた。二次抗体は、Alexa Fluor 594 goat anti rabbit IgG (Life Technologies, cat. A11012)、Alexa Fluor 488 goat anti rabbit IgG (Life Technologies, cat. A11034)、Alexa Fluor 594 goat anti mouse IgG (Life Technologies, cat. A11032) を用いた。その後 PBS で洗い、1 µg/ml DAPI solution (DOJINDO, cat. 28718-90-3) を加えた PBS で、室温で 10 分間反応させた。その後 PBS で洗い、Biozero 蛍光顕微鏡 (KEYENCE, cat. BZ8000) および一体型共焦点レーザー顕微鏡 FLUOVIEW (OLYMPUS, cat. FV1000) で観察した。

SelH ノックダウン ES 細胞株の樹立

実験の流れは図 1-4B に示した。ES 細胞をゼラチンコートした 6-well 培養皿 (Falcon, cat. 353004) に播種し、約 50%コンフルエント状態で、Lipofectamine 2000 と 5 µg のベクターを加えた。4 時間後に培地を交換し、18 時間後、細胞を 0.05% Trypsin/EDTA ではがし、新しい培養皿に播種し、さらに 6 時間培養した。その後、puromycin (Clontech, cat. 631305) を終濃度 5 µg/ml になるように加えた。その後、毎日培地を交換し、1 週間セクションを続けた。培養皿に残ったコロニーを 96 コロニー分ピックアップして、0.05% Trypsin/EDTA 処理をした後、ゼラチンコートした 96-well 培養皿 (Nunc, cat. 167008) 上に播種した。その後、EGFP の蛍光を発する細胞株を SelH ノックダウン ES 細胞株として 6 および 8 細胞株回収した。回収した細胞株は RT-PCR によって SelH 発現量を解析して、最も SelH 発現が低下していた細胞株を利用した。

RT-PCR

RNA 抽出は Chomczynski と Sacchi によって報告された、フェノールとグアニジンイソチオシアネートを含んだ溶液によるシングルステップ RNA 単離法を一部改変して行った (Chomczynski P and Sacchi N 1987)。回収した細胞 5×10^6 に対して 500 µl の TRIzol Reagent (Life Technologies, cat. 15596-018) を用いて溶解し、100 µl のクロロホルムを加えて RNA を単離した後、2-propanol 沈殿、ethanol 沈殿を行い、抽出した。

得られた Total RNA 1 µg から Oligo (dT)₂₀ Primer (Life Technologies, cat. 18418-020) と Superscript III (Life Technologies, cat. 18080-051) を用いて逆転写反応を行い、cDNA を合成した。PCR は LA taq DNA polymerase と付属のバッファーを用いて 2 U LA taq, 0.25 µM each primer, 1×GC buffer, 100 µM each dNTP, RNA 1 µg から作成した cDNA の 1/25 量で計 20 µl の系で行った。PCR 条件は 95℃で 3 分間変性した後、[95℃-30 秒、60℃-30 秒、72℃-1 分]を 1 サイクルとし、22-30 サイクル行った。PCR はサーマルサイクラー (Bio-Rad, cat. 170-8720) を用いて行った。PCR

後のサンプルはアガロースゲルで電気泳動を行い、エチジウムブロマイドで染色して、ケミルミイメーシングシステム (VILBER LOURMAT, cat. 04-13502)で撮影した。

アルカリフォスファターゼ染色

アルカリフォスファターゼ染色は、ブロモクロロインドリルリン酸とニトロブルーテトラゾリウム存在下でアルカリフォスファターゼが反応するとホルマザン色素が生成され、青紫色を呈する反応を用いて行った(Thomson JA et al 1998)。試薬は Alkaline Phosphatase staining kit II (STEMGENT, cat. 00-0055)を用いて行った。ゼラチンコートした 6 cm 培養皿に播種した ES 細胞に固定液を加えて、5 分間固定した。その後、PBS で洗浄し、基質を加えて 12 分間反応させた。PBS で洗浄後、顕微鏡 (OLYMPUS, cat. CKX41)で観察、撮影した。

DAPI 染色によるヘテロクロマチン構造解析

ES 細胞のヘテロクロマチン解析のためにゼラチンコートした培養皿上で 2 日間培養した ES 細胞を 0.05% Trypsin/EDTA で剥がし、固定液 (エタノール: 酢酸=3:1) で固定した細胞をスライドガラス (MATSUNAMI, cat. 0523) 上に塗抹した。その後、1 μ g/ml DAPI /PBS で、室温で 10 分間反応させた。PBS で洗い、PermaFluor Aqueous Mounting Medium (Thermo Scientific, cat. TA-006-FM) を加えてスライドを作成し、Biozero 蛍光顕微鏡で撮影した。各サンプルにつき 10 から 15 視野撮影した。画像は画像解析ソフトウェア (KEYENCE, AZ analyzer) で蛍光ボケ除去処理を行った。ヘテロクロマチン領域の計算は、Cell Profiler (<http://www.cellprofiler.org/>) を用いて行い、核一つあたりの DAPI 濃染色ドット数および濃染色領域の面積を算出した。Cell Profiler による解析においては、初めに RGB 画像を grayscale に変換し、Otsu method (Otsu N 1979) によって、蛍光強度から細胞核を認識した。さらに蛍光強度 0.25、サイズ 3 を閾値として、ヘテロクロマチンシグナルを認識し、数を計測した。各サンプルで 80 から 150 の細胞を計測し、Wilcoxon test.で有意差検定を行った。

変異型 SelH 強制発現ベクターの作成

変異型 SelH 強制発現ベクターは CMV プロモーターを有する pEGFP-N3 (Clontech, cat. 6080-1) を鋳型として作成した。EGFP 発現ベクターは pEGFP-N3 ベクターを用いた。ベクター作成の流れは図 1-3AB に示した。

初めに SelH の C 末端に EGFP を結合させた変異型 SelH 強制発現ベクターを作成した。SelH の終止コドンに TAA を変換し、3'末端側に HindIII 認識配列を設けたプライマー (SelH-taa-HindIII) を作成した。変異型 SelH PCR 産物を鋳型に、SelH-taa-Hind、SelH-NheI プライマーを用いて変異型 SelH の 5'UTR とタンパクコード領域を LA-Taq DNA Polymerase を用い PCR で増幅した。次に、SelH の 3'UTR

の 5' 末端に XhoI 認識配列を設けたプライマー (SelH-XhoI) を作成した。変異型 SelH PCR 産物を鋳型に、SelH-XhoI、SelH-NotI プライマーを用いて SelH の 3'UTR を LA-Taq DNA Polymerase を用い PCR で増幅した。また、EGFP の 5' 末端に Hind III 認識配列、3' 末端に XhoI 認識配列を設けたプライマー (EGFP-HindIII、EGFP-XhoI) を作成した。EGFP 発現ベクターを鋳型に EGFP-HindIII、EGFP-XhoI プライマーを用いて、EGFP 領域を LA-Taq DNA Polymerase を用い PCR で増幅した。それぞれの PCR 産物を 2%アガロースゲルで電気泳動し、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System で精製した。その後、T4 DNA ligase で結合させ、変異型 SelH-EGFP 配列を作成した。EGFP 発現ベクターから EGFP を NheI と XhoI で切り抜き、代わりに変異型 SelH-EGFP 配列を T4 DNA ligase で結合させた。

次に SelH の N 末端に EGFP を結合させた変異型 SelH 強制発現ベクターを作成した。SelH のタンパクコード領域の 5' 末端側に HindIII 認識配列を設けたプライマー (SelH-Hind) を作成した。変異型 SelH PCR 産物を鋳型にプライマー SelH-Hind、SelH-NotI を用いて変異型 SelH のタンパクコード領域と 5'UTR を、LA-Taq DNA Polymerase を用い PCR で増幅した。また、EGFP の 5' 末端に NheI 認識配列、3' 末端 EGFP の終止コドンに TAA を変換し、3'末端側に HindIII 認識配列を設けたプライマー (EGFP-taa-Hind)および EGFP の 5' 末端側に NheI 認識配列を設けたプライマー (EGFP-NheI)を作成した。EGFP 発現ベクターを鋳型に EGFP-taa-Hind、EGFP-NheI プライマーを用いて、EGFP 領域を LA-Taq DNA Polymerase を用い PCR で増幅した。その後、T4 DNA ligase で結合させ、EGFP-変異型 SelH 配列を作成した。EGFP 発現ベクターから EGFP を NheI と XhoI で切り抜き、代わりに変異型 SelH-EGFP 配列を結合させた。

変異型 SelH 強制発現 ES 細胞株の樹立

実験の流れは図 1-4C に示した。ES 細胞を ES 細胞用培地に懸濁し、 2×10^6 個 をゼラチンでコートした 10 cm 培養皿に播種した。翌日に Lipofectamine 2000 を用いてトランスフェクションを行った。Opti-MEM I 1.5 ml 中で Lipofectamine 50 μ l とベクター 20 μ g を結合させ、10 ml の ES 細胞用培地に加えて、37°C で 4 時間培養し、その後培地を交換した。翌日、ES 細胞用培地に G418 (Life Technologies, cat. 10131035) を終濃度 300 μ g/ml となるように加えた培地に交換し、セクションを行った。その後、毎日培地を交換し、1 週間セクションを続けた。この時、トランスフェクションを行っていないコントロールの細胞が G418 によって死滅していることを確認した。培養皿に残ったコロニーを 60 コロニーピックアップして、0.05% Trypsin/EDTA 処理をした後、ゼラチンコートした 96-well 培養皿に播種した。その後、EGFP の蛍光を発する細胞株を 8-10 株回収した。回収した細胞株は RT-PCR によって SelH 発現量を解析して、最も SelH 発現が増加していた細胞株を利用した。

A 一過性SelH強制発現ベクター

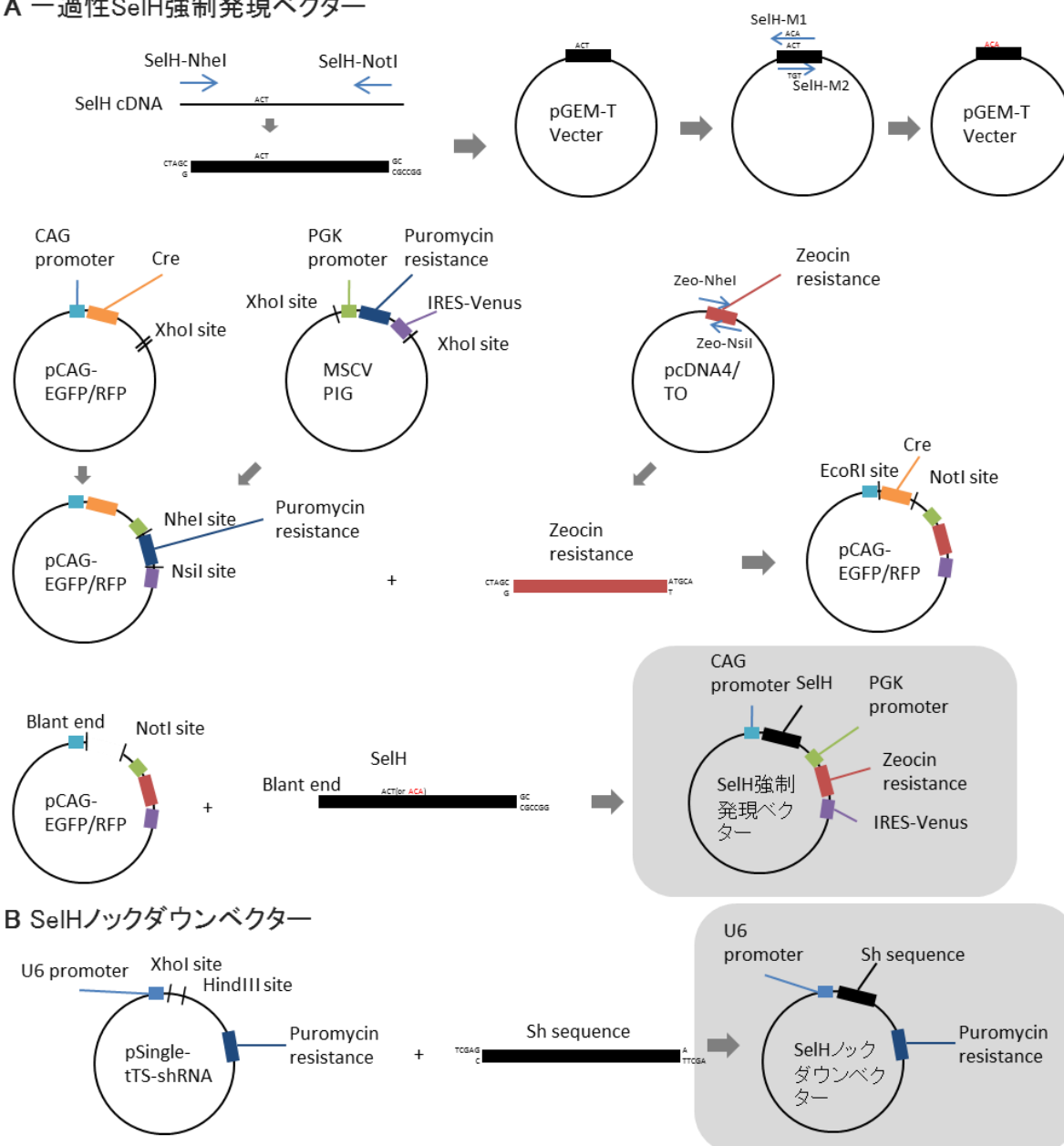


図1-2 ベクター作成の流れ

- A) 一過性SelH強制発現ベクター: SelH cDNAからSelH配列をクローニングし、pGEMベクターに導入した。一部はセレノシステインのシステイン変換を行った。ベクターはpCAG-EGFP/RFPを元に、MSCV PIGから、PGK-puro-IRES-Venusを導入し、pcDNA4/TOからクローニングしたzeoをpuroと入れ替えた。その後、pCAG-EGFP/RFPのCreをSelHと入れ替えて一過性SelH強制発現ベクターを作成した。
- B) SelHノックダウンベクター: pSingle-tTS-shRNAを元に、そのXhoIおよびHindIIIサイトにそれぞれの配列を加えた、sh配列を導入することで作成した。
- ブロックは遺伝子、プロモーター配列、青矢印はプライマー、円はベクター、黒線は制限酵素認識配列を示す。

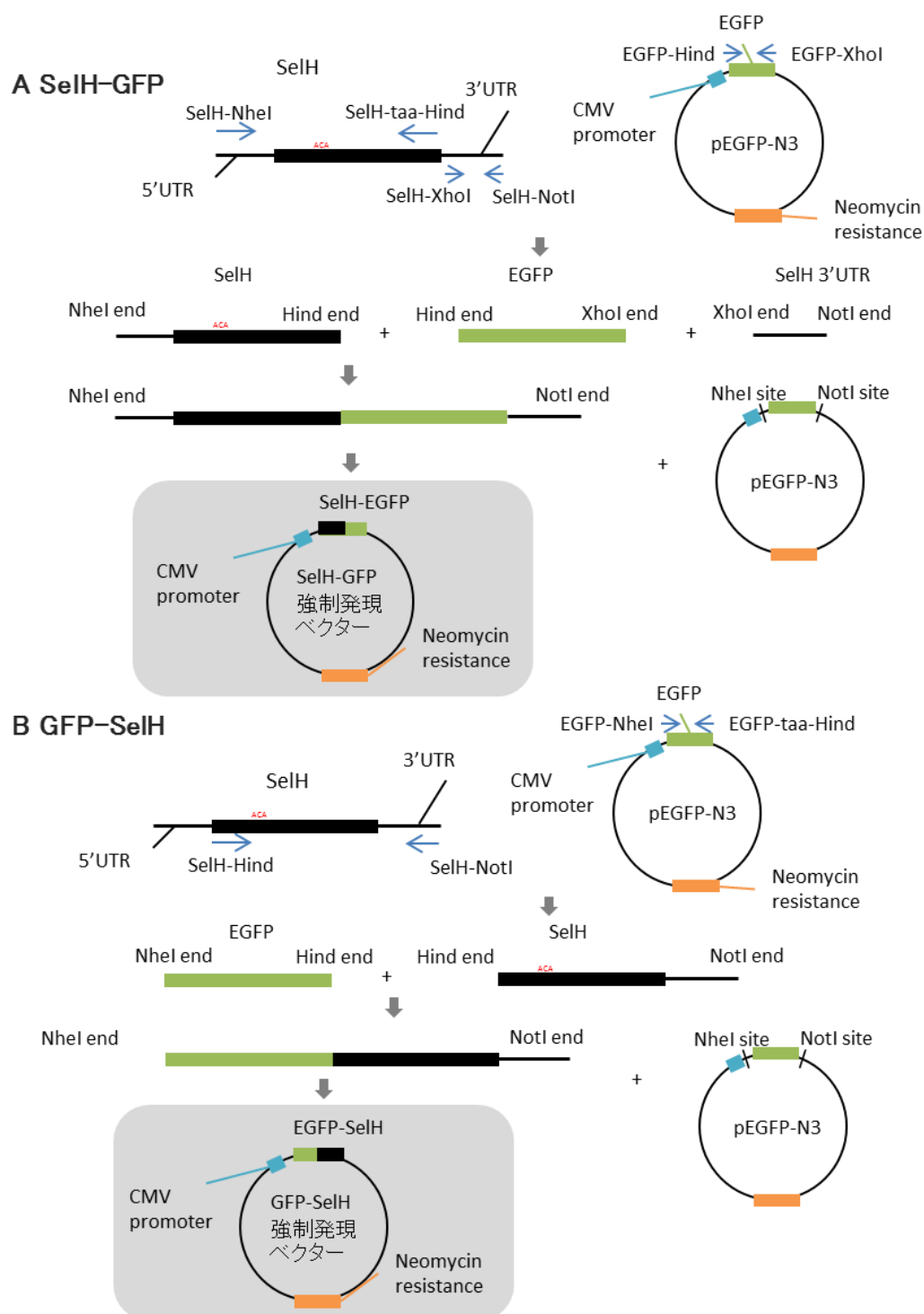


図1-3 ベクター作成の流れ

- A) C末端にEGFPを結合したSelH強制発現ベクター: 点変異を起こしたSelH配列から5' UTR+SelHタンパク質コード配列および3' UTRをそれぞれクローニングし、pEGFP-N3ベクターからEGFPをクローニングした。5' UTR+Sタンパク質コード配列、EGFP、3' UTRの順に結合させ、pEGFP-N3ベクターのEGFP配列と交換して導入した。
- B) N末端にEGFPを結合したSelH強制発現ベクター: 点変異を起こしたSelH配列からSelHタンパク質コード配列+3' UTRを、pEGFP-N3ベクターからEGFPをクローニングした。それらを結合させ、pEGFP-N3ベクターのEGFP配列と交換して導入した。

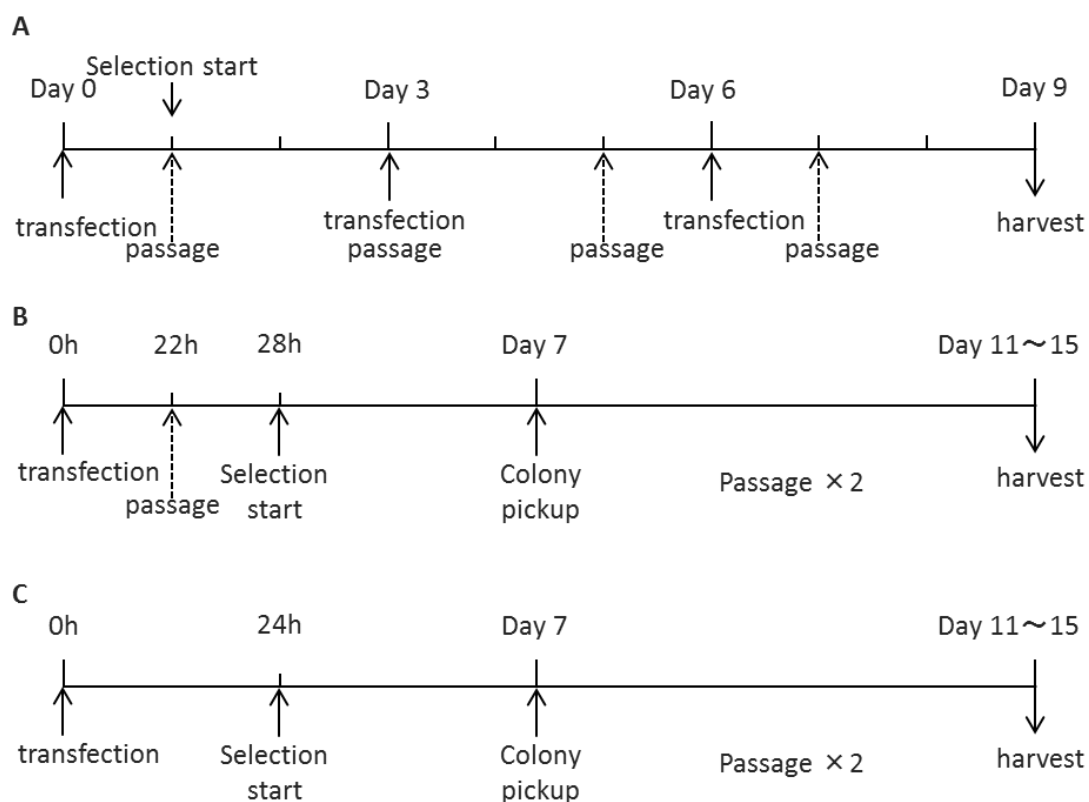


図1-4 遺伝子導入実験の流れ

- A) 一過性SelH強制発現のタイムライン: 3日おきにSelH発現ベクターを導入し、2日おきに継代して、9日後に回収、解析した。
- B) 恒常的SelHノックダウン細胞株の樹立: トランスフェクション後、28時間後に薬剤によるセレクションを開始し、一週間継続した。一週間後、残ったコロニーをピックアップして継代した。その後、EGFPの蛍光を発する細胞株のみを継代、回収した。
- C) 恒常的SelH強制発現細胞株の樹立: トランスフェクション後、1日後に薬剤によるセレクションを開始し、一週間継続した。一週間後、残ったコロニーをピックアップして継代した。その後、EGFPの蛍光を発する細胞株のみを継代、回収した。

表1-1 プライマー配列

RT-PCR		
SelH(total)	gaccgtgggtcattgagcatt	ttggacgggttcacttgc
Actb	ggatgcagaaggagattactgc	ccaccgatccacacagagta
SelH(5'-exon)	ctctccggagttgcatcg	cccgcttacgctttctt
SelH(exon-3')	gcctcaagaggtggttgaag	gcctcacaactgaacctca

野生型SelHクローニング用

SelH-NheI	gctagcccttctgctgcgagattga
SelH-NotI	gcggccgcccagatacttgacctttattaacaattg

システイン変換用

SelH-M1	ggctcattgagcattgtacgagctgtcgctgtacggcccatgc
SelH-M2	gcatggcgccgtacacgcgacagctcgtacaatgctcaatgacc

Zeocin耐性遺伝子クローニング用

Zeo-NheI	
Zeo-Nsil	

shRNA配列

KD1	tcgaggccagagctacctgtgcaagtggtcaagagacacttgacaggtagctctggttttttacgcgta ccggtctcgatggacacgttcacaagttctgtgaacgtgtccatcgagacaaaaaatgcgcattcga
KD2	tcgagggaattgaagaagtacctttcattcaagagatgaaaggtacttcttcaattcttttacgcgta cccttaacttctcatggaagtaagttctactttccatgaagaagttaagaaaaaatgcgcattcga

C末端EGFP結合SelH作成用

SelH- Hind III	aagcttttgtgaaaggtacttcttcaattc
SelH-XhoI	ctcgagagaggttggaagagtcct
EGFP- Hind III	aagcttatggtgagcaaggcgaggag
EGFP-XhoI	ctcgagttactgtacagctcgtccatgcc

N末端EGFP結合SelH作成用

SelH- Hind III	aagcttatggccccccacggaagaaag
EGFP- Hind III	aagcttttctgtacagctcgtccatgcc
EGFP-NheI	gctagcatggtgagcaaggcgaggag

表1-2 抗体

ウエスタンブロッティング

抗体	品名	品番	終濃度	購入元	lot
SelH-TB13	-	-	100 ng/ml	自作	-
Lamin B	Lamin B(C-20)	sc-6216	1 $\mu\text{g/ml}$	Santa Cruz	H2410

免疫染色

抗体	品名	品番	終濃度	購入元	lot
SelH-TB13	-	-	100 ng/ml	自作	-
GFP	Rabbit polyclonal to GFP	ab290	1 $\mu\text{g/ml}$	abcam	514983

結果

SelH 抗体(SelH-TB13)の評価

SelH はそのアミノ酸配列より 13.94 kDa と計算される。野生型 SelH を強制発現させた ES 細胞の核タンパク質に対して、SelH 抗体 (SelH-TB13)を用いてウエスタンブロッティングを行った。その結果、強制発現された SelH (13.9 ± 0.3 kDa)を検出した(図 1-5A)。また、ES 細胞から抽出した核タンパク質を用いたウエスタンブロッティングでは、SelH 由来の 13.9 kDa のバンドおよび 43.5 kDa の非特異バンドが検出された(図 1-5B)。SelH-TB13 を用いて 100 ng/ml の希釈条件において ES 細胞に免疫染色を行った。その結果、細胞質に比べ、核内が強く染色された(図 1-5C)。

SelH ノックダウン ES 細胞の樹立

SelH mRNA の 2 か所を標的に shRNA を用いた SelH ノックダウン ES 細胞 KD1 および KD2 の樹立を試みた(図 1-6A)。RT-PCR およびウエスタンブロッティングによって SelH の mRNA およびタンパク質の発現量を定量した結果、mRNA、タンパク質ともに SelH 発現量の顕著な低下が認められた(図 1-6B,C)。また、SelH-TB13 による免疫染色によっても、SelH の減少が認められた(図 1-6D)。この時、KD1 と KD2 は mRNA 発現の差は認められなかったが、タンパク質では KD2 において、より顕著な発現量の低下が認められた。

未分化マーカーである細胞表面のアルカリフォスファターゼ活性について、KD1 および KD2 はその活性を持つという結果が得られ(図 1-6F)、2 種類の SelH ノックダウン ES 細胞株 KD1 および KD2 が樹立された。作成した SelH ノックダウン ES 細胞 KD1 および KD2 はコントロールと形態的な差異は認められず、10 回以上の継代後も増殖を続けた。また、KD1 および KD2 はコントロール細胞と比べ、僅かに増殖能が高く、倍加時間はそれぞれコントロールの 0.7 および 0.6 倍であった(図 1-6E)。

SelH ノックダウン ES 細胞のヘテロクロマチン解析

DAPI 染色によって観察されるヘテロクロマチンシグナルの数を、SelH ノックダウン細胞 KD1 および KD2 において測定した(図 1-7A)。各サンプルについて、80-120 細胞に対しサイズ 3 pixel、蛍光強度 0.25 を閾値にしてヘテロクロマチンシグナルの数を解析した。結果、SelH ノックダウン細胞 KD1 および KD2 において、コントロールと比較してヘテロクロマチンシグナルの数が有意に少ないことが明らかとなった(図 1-7B,C)。この時、それぞれの SelH ノックダウン ES 細胞は核あたりのヘテロクロマチン領域全体も減少傾向を示した。KD2 は KD1 に対しても有意に、ヘテロクロマチンシグナルの数が低下していた。このように、SelH ノックダウンはクロマチン構造に影響を与えることが示された。

変異 SelH 強制発現 ES 細胞の樹立

SelH のセレノシステインをシステインに置換して、2 種類の SelH 強制発現 ES 細胞株の樹立を試みた。EGFP タグを C 末端に結合した変異型 SelH(SelH-GFP)と N 末端に結合した変異型 SelH(GFP-SelH)の 2 種類の強制発現 ES 細胞株を図 1-8A に示した。コントロールは EGFP のみの強制発現 ES 細胞株(GFP)とした。セレノシステインは SelH において CXXU motif を構成しており、その機能が予想される。また、13.9 kDa と比較的小さなタンパク質である SelH にとって 26.9 kDa の EGFP の結合はその機能へ影響が大きいことも考えられる。

これらの細胞株について、SelH の発現を RT-PCR およびウエスタンブロッティングによって解析した。2 つの変異型 SelH 強制発現 ES 細胞株ともに、*SelH* mRNA の発現量の増加が認められた(図 1-8B)。この時、SelH-GFP の内在性 *SelH* 発現 (図 1-8B の上から 2 段目)および GFP-SelH の内在性 *SelH* 発現 (図 1-8B の上から 3 段目)はともに低下が認められ、SelH-GFP でより顕著な発現低下が認められた。ウエスタンブロッティング解析では、外来性の変異型 SelH の非常に高い発現が認められ、逆に内在性の SelH 発現は著しく減少していた(図 1-8C)。特に SelH-GFP の変異型 SelH の発現は、GFP-SelH 変異型 SelH の発現よりも顕著に高かった。

図 1-8D に示すように、作成した変異型 SelH 強制発現 ES 細胞の増殖速度は SelH-GFP、GFP-SelH とともにコントロールとの差は認められなかった。また、これらの細胞株はアルカリフォスファターゼ活性を持つことが認められた(図 1-8E)。さらに、抗 GFP 抗体を用いて、強制発現させた変異型 SelH の局在を免疫染色で観察したところ、コントロールの EGFP が細胞質を含めた細胞全体に分布しているのに対して、変異型 SelH は核に局在していることが認められた(図 1-8F)。以上のように、変異型の SelH を過剰発現した 2 つの変異型 SelH 強制発現 ES 細胞を樹立した。

作成した変異型 SelH 強制発現 ES 細胞は、外来性の変異型 SelH 発現が過剰である一方、内在性の野生型 SelH は減少していた。そのため、この変異型 SelH 強制発現 ES 細胞の結果は変異の影響を注意深く考慮する必要がある。

SelH 強制発現 ES 細胞のヘテロクロマチン解析

樹立した変異型 SelH 強制発現 ES 細胞の 2 つの細胞株について DAPI 染色によるヘテロクロマチンシグナルの解析を行った(図 1-9A)。その結果、SelH-GFP ではヘテロクロマチンシグナルの増加が認められた(図 1-9B)。この時、ヘテロクロマチンシグナルの大きさの増加傾向も認められた。一方で、GFP-SelH ではコントロールと比較して差が認められなかった。

考察

本研究では恒常的な SelH ノックダウン ES 細胞を樹立した。樹立した SelH ノックダウン ES 細胞は 10 回以上の継代後も増殖を継続し、未分化のマーカーの一つであるアルカリフォスファターゼも発現していた。一方で、樹立できた SelH ノックダウン ES 細胞のノックダウン効率は mRNA で 5~6 割であり、それ以上の効率の SelH ノックダウン ES 細胞を樹立することはできず、SelH を一定量以上欠損した ES 細胞は生存できない可能性がある。その中で、今回樹立した SelH ノックダウン ES 細胞はクロマチン状態の変化という影響を受けており、SelH の機能を解析する上で有効な系であると考えられる。

ES 細胞から分化させた神経前駆細胞では、ヘテロクロマチンを表す DAPI 染色によるシグナルは小さく、数は増加する(Meshorer E et al 2006)。また、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤であるトリコスタチン A を添加された ES 細胞はヘテロクロマチンシグナルが減少する(Arai Y et al 2011)。DAPI によって観察されるヘテロクロマチン構造の変化は、分化やヒストン修飾の変化といった、ES 細胞のエピジェネティック状態の変化を表している。本研究で SelH は ES 細胞において、主に核内に存在していること、SelH ノックダウンによって ES 細胞のクロマチン状態の変化が認められた。これまで、ES 細胞における SelH の役割について不明であったが、SelH が ES 細胞の核内構造に関与していることが示された。

本章で樹立した変異型 SelH 強制発現 ES 細胞では、外来性 SelH の発現に伴って、内在性の SelH の mRNA およびタンパク質の発現低下が認められた。SelH のプロモーター領域においては、フィードバック機構が存在し、その発現を調節している可能性がある。一方で過去の研究では、マウス海馬由来 Ht22 細胞におけるヒト SelH の強制発現は、内在性のマウス *SelH* mRNA 発現を増加させることが報告されている(Panee J et al 2007)。細胞種による、SelH 自身の *SelH* mRNA 発現制御の違いであるとも考えられる一方で、本来 SelH は自身の発現を促進するが、今回の変異型 SelH は、変異や EGFP によって野生型 SelH のドミナントネガティブとして機能して、内在性の SelH 発現を抑制した可能性も否定できない。そのため、変異型 SelH 強制発現 ES 細胞のヘテロクロマチンに対する解析結果については、変異が与える SelH 機能に対する影響をさらに解析する必要がある。

EGFP を C 末端に結合した SelH の強制発現 ES 細胞ではヘテロクロマチンシグナルの増加が認められ、EGFP を N 末端に結合した SelH の強制発現 ES 細胞ではそのような変化は認められなかった。SelH は N 末端側に AT hook と核移行シグナルを有することが示されている(Panee J et al 2007)。そのため、SelH のクロマチン状態の制御機能においては、N 末端側にある AT hook および核移行シグナルが重要な機能を有しており、EGFP を N 末端に結合した SelH ではそれらのモチーフが機能しなかったこと

も考えられるが、免疫染色の結果からは、EGFP を N 末端に結合した SelH も核内に存在することが示されており、核移行シグナルはこの変異型 SelH においても機能していると考えられる。2 つの変異型 SelH 強制発現 ES 細胞は発現量が異なり、EGFP を C 末端に結合した SelH の強制発現 ES 細胞の方が、EGFP を N 末端に結合した SelH の強制発現 ES 細胞に比べて SelH の発現量が高かった。そのため、ヘテロクロマチンシグナルに見られた 2 つの細胞の違いは SelH の発現量による可能性がある。

以上のように第一章では、SelH の機能解析に有用な SelH ノックダウン ES 細胞を樹立した。そして SelH のクロマチン制御への関与が示された。さらに変異型 SelH 強制発現 ES 細胞株も樹立した。この細胞株については、外来性 SelH のセレノシステインの変異および EGFP の結合が存在し、内在性 SelH の減少が認められることから、さらなる検証が必要であると言える。

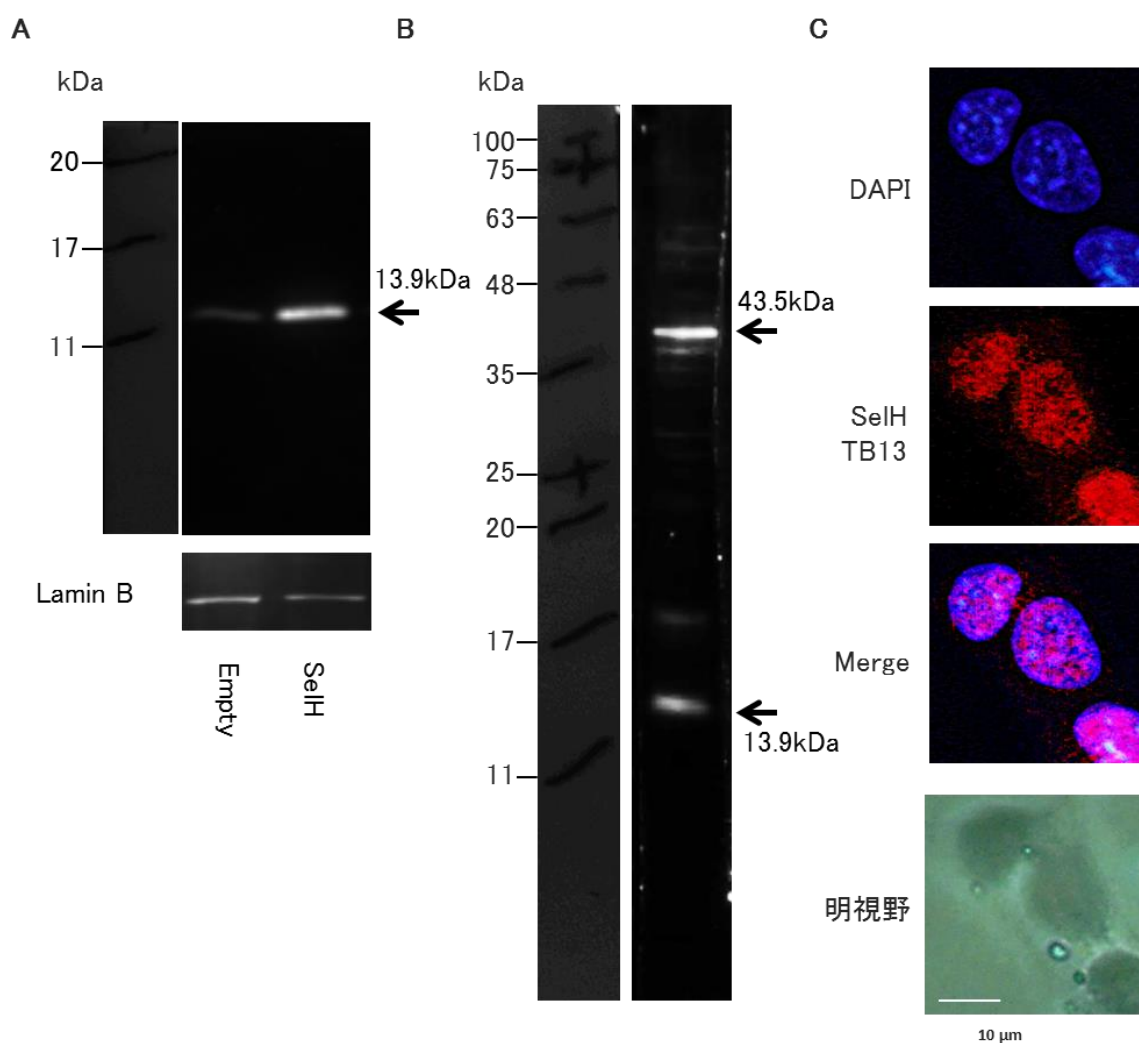


図1-5 抗SelH抗体の作成

- A) SelH 過剰発現ES細胞に対するウエスタンブロッティング: SelH発現ベクターを導入してSelHを過剰発現させたES細胞に対してSelH抗体を用いて、ウエスタンブロッティングを行った。SelHはSelH発現ベクター導入ES細胞、Emptyはコントロールとして用いた、空ベクター導入ES細胞を表す。
- B) ES細胞核タンパク質に対するウエスタンブロッティング: 作成したSelH抗体を用いて、ES細胞の核タンパク質に対してウエスタンブロッティングを行った。矢印はSelHと予想されるタンパク質。
- C) ES細胞に対する免疫染色: 作成したSelH抗体を用いて、ES細胞に対して、免疫染色を行った。スケールバーは10 μ mを表す。

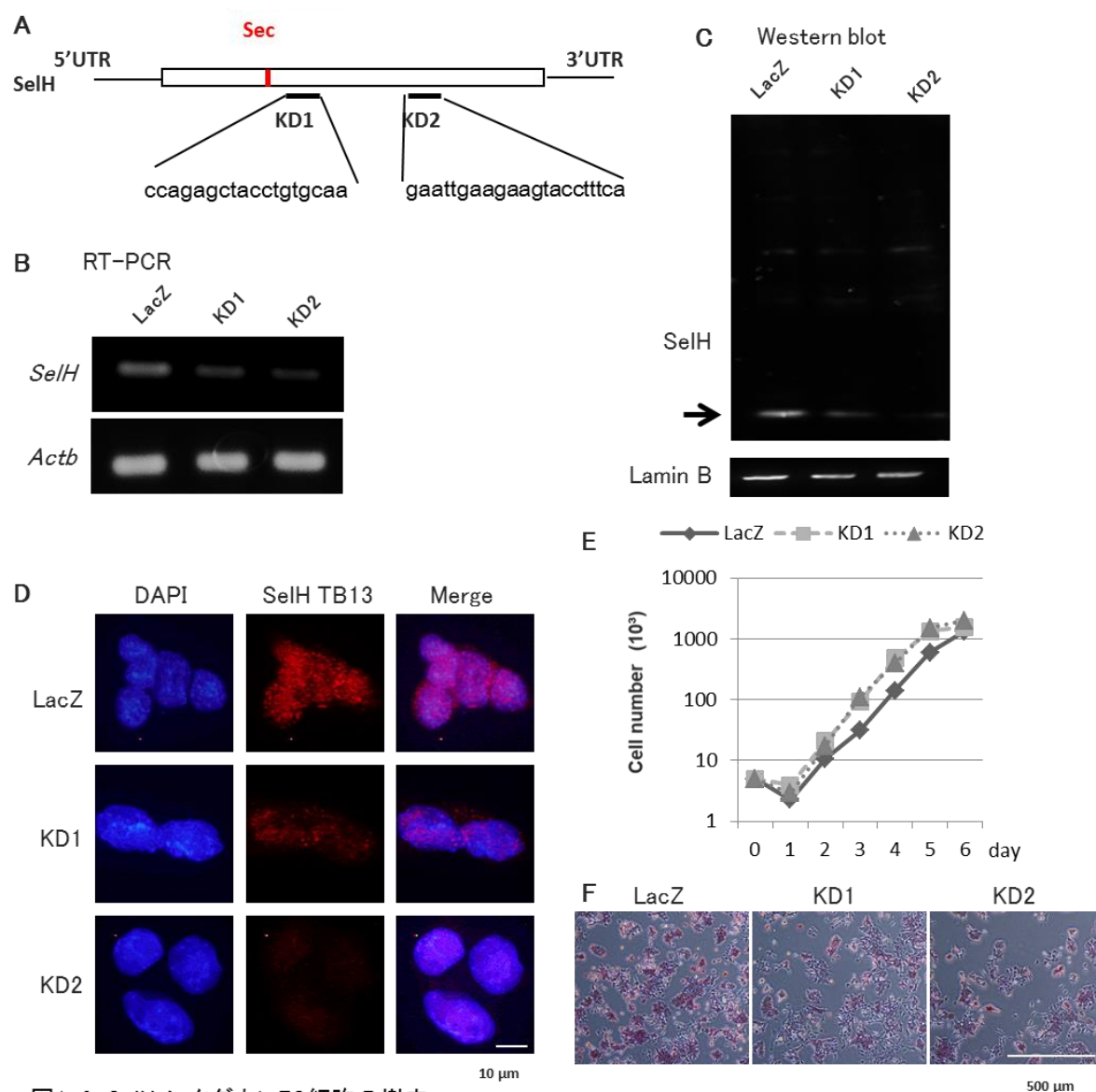


図1-6 SelHノックダウンES細胞の樹立

- A) 作成したSelHノックダウンshRNA:KD1、KD2のそれぞれのターゲット領域を下線で表す。Secはセレノシステイン。
- B) RT-PCR: 作成したSelHノックダウンES細胞の*SelH*mRNA発現量を解析した。
- C) ウェスタンブロッティング: SelHノックダウンES細胞のSelHタンパク質発現量を解析した。
- D) 免疫染色: SelHノックダウンES細胞に対して、SelHの免疫染色を行った。スケールバーは10 μ mを表す。
- E) 増殖曲線: SelHノックダウンES細胞の増殖能を6日間観察した。
- F) アルカリフォスファターゼ染色: SelHノックダウンES細胞のアルカリフォスファターゼ活性を観察した。スケールバーは500 μ mを表す。
- LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はそれぞれSelHノックダウンES細胞を表す。

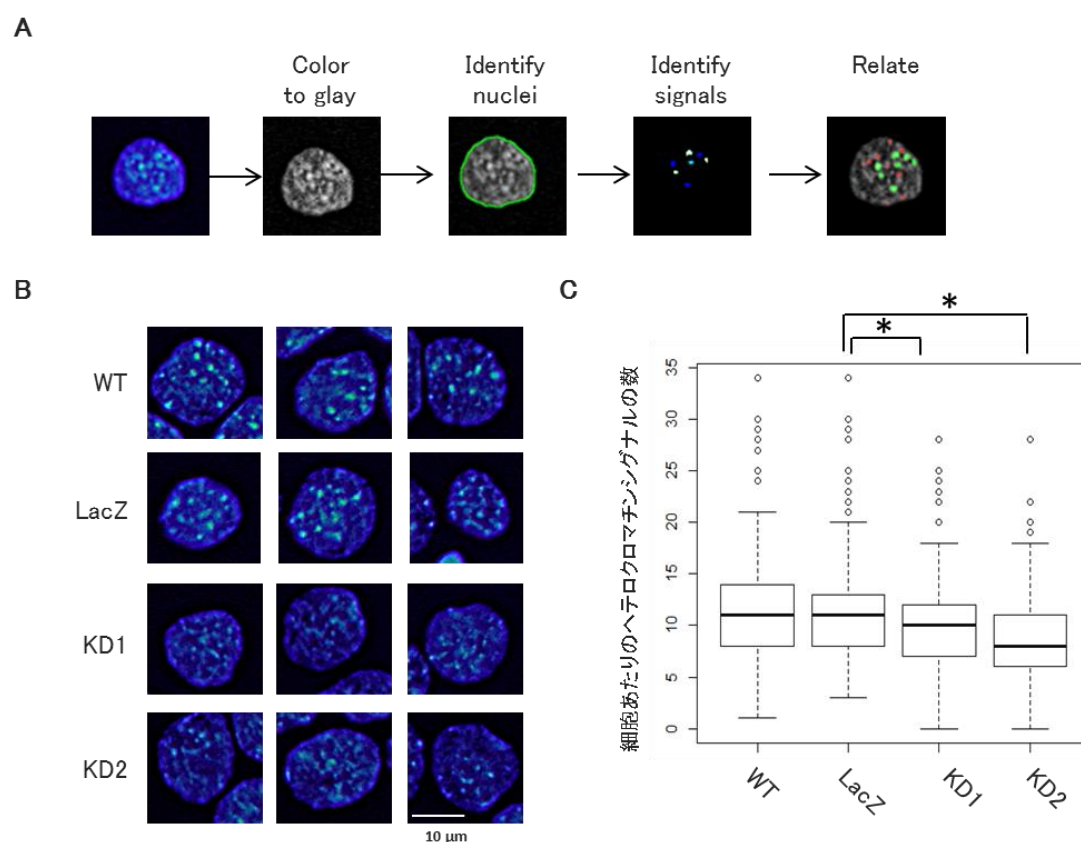


図1-7 SelHノックダウンES細胞のヘテロクロマチン解析

- A) ヘテロクロマチンシグナル画像解析概念図: 画像解析の流れを表す。撮影した画像を白黒に変換し、核を認識する。その後、蛍光強度0.25を閾値にしてヘテロクロマチンシグナルを認識し、核と関連付けして個数を数える。ヘテロクロマチンシグナルはサイズ3以上のもののみをカウントした。
- B) DAPI染色像: DAPI染色によるSelHノックダウンES細胞の核を表す。DAPIで濃染色されるドット状のシグナルを、ヘテロクロマチンシグナルとして画像解析ソフトを用いて測定した。スケールバーは10 μ mを表す。
- C) ヘテロクロマチンシグナル数: SelHノックダウンES細胞の細胞一つ当たりのヘテロクロマチンシグナル数を箱ヒゲ図で示す。太線は中央値、箱は25%範囲、75%範囲をバーで表す。統計処理はwilcoxon検定で行い、*は $p < 0.01$ を表す。LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はそれぞれSelHノックダウンES細胞を表す。WTは野生型ES細胞を表す。

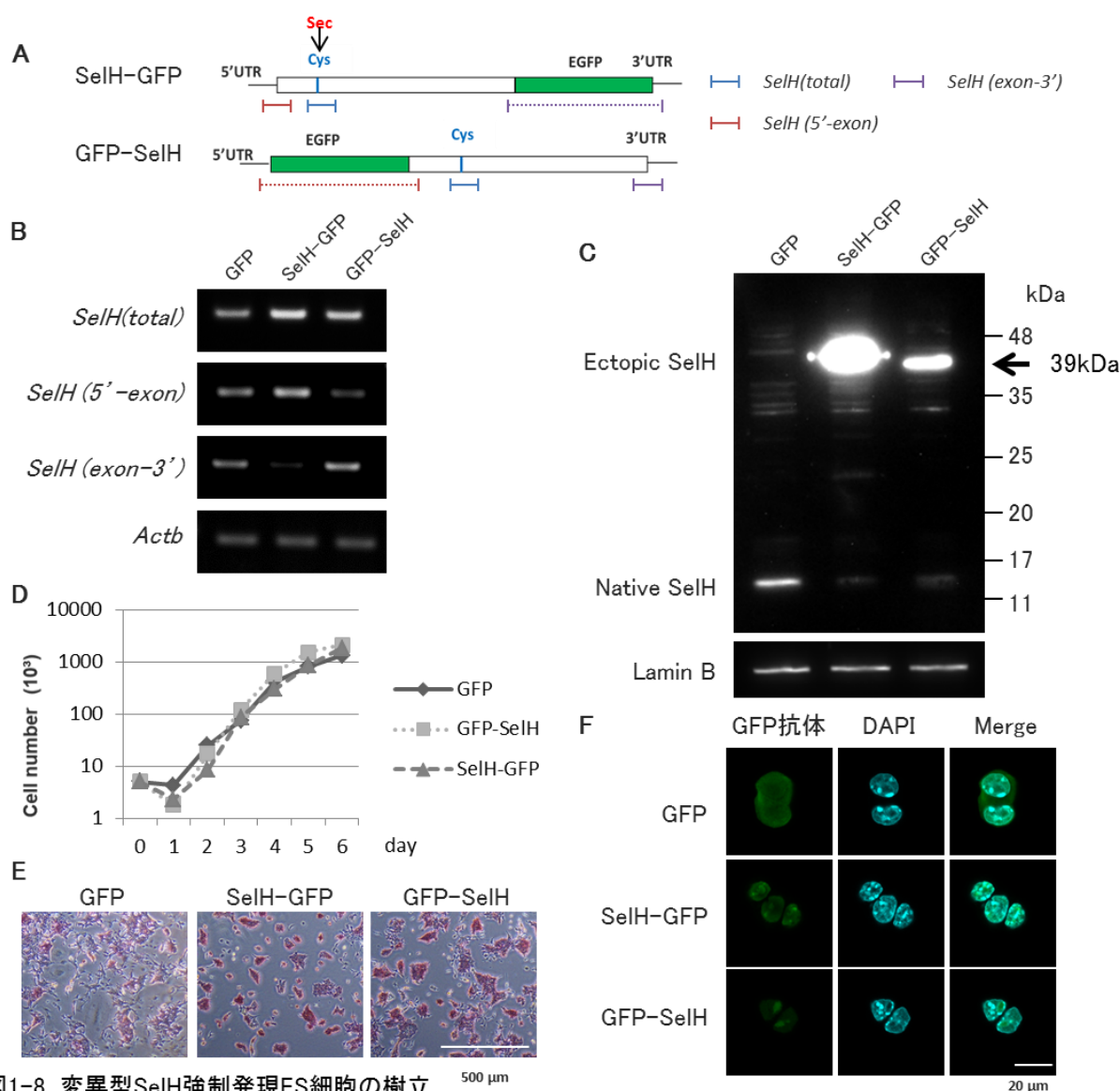


図1-8 変異型SelH強制発現ES細胞の樹立

- A) 変異型SelHの構造: SelH-GFPはC末端にEGFPを付加し、GFP-SelHはN末端にEGFPを付加した。Cysはセレノシステインから変換したシステインを表す。バーはBで使用したプライマー領域を表す。
- B) RT-PCR: 作成したSelH強制発現ES細胞のSelH mRNA発現量を解析した。SelH(total)は内在性・外来性含めた全SelH mRNAを認識する。SelH(5'-exon)はGFP-SelHの外来性SelHを認識しない配列で、GFP-SelHでは内在性のSelHのみを認識する。一方、GFP、SelH-GFPでは全SelHを認識する。SelH(exon-3')は逆にSelH-GFPの外来性SelHを認識しない配列で、SelH-GFPでは内在性のSelHのみを認識する。
- C) ウェスタンブロッティング: SelH強制発現ES細胞のSelHタンパク質発現量を解析した。15kDa付近が内因性SelH、40kDa付近が外因性SelHを表す。
- D) 増殖曲線: SelH強制発現ES細胞の増殖能を6日間観察した。
- E) アルカリフォスファターゼ染色: SelH強制発現ES細胞のアルカリフォスファターゼ活性を観察した。スケールバーは500 μmを表す。
- F) 外来性SelHの局在: SelH強制発現ES細胞をGFP抗体を用いて免疫染色した。スケールバーは20 μmを表す。

GFPはコントロールのEGFP強制発現ES細胞を表し、SelH-GFP・GFP-SelHはそれぞれC末端・N末端にEGFPを付加した変異型SelH強制発現ES細胞を表す。

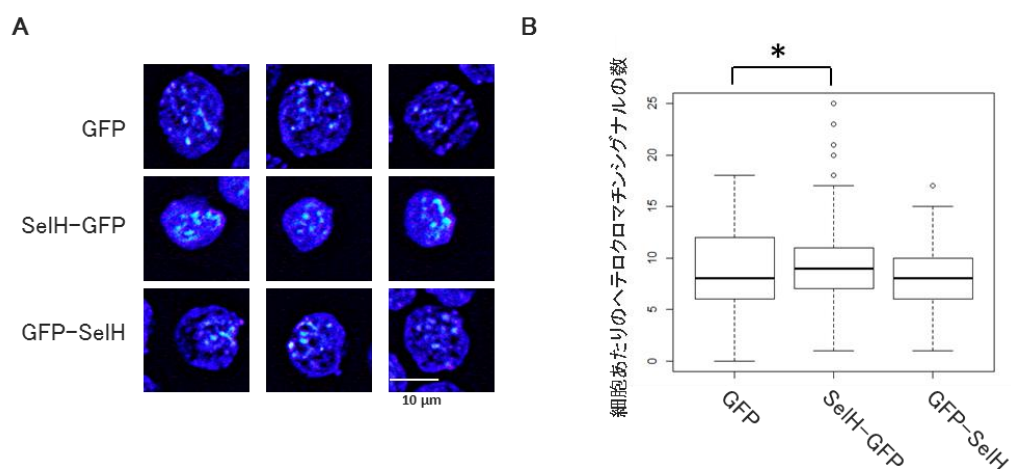


図1-9 変異型SelH強制発現ES細胞のヘテロクロマチン解析

A) DAPI染色像: DAPI染色による変異型SelH強制発現ES細胞の核を表す。DAPIにより濃染色されるドット状のシグナルを、ヘテロクロマチンシグナルとして画像解析で測定した。スケールバーは10 μ mを表す。

B) ヘテロクロマチンシグナル数: 変異型SelH強制発現ES細胞の細胞一つ当たりのヘテロクロマチンシグナル数を表す。太線は中央値、箱は25%範囲、75%範囲をバーで表す。

統計wilcoxon検定で行い、*は $p < 0.01$ を表す。

GFPはコントロールのEGFP強制発現ES細胞を表し、SelH-GFP・GFP-SelHはそれぞれC末端・N末端にEGFPを付加した変異型SelH強制発現ES細胞を表す。

第二章

ES 細胞の多分化能における SelH の機能解析

序論

クロマチン構造はクロマチンリモデリング因子やリンカーヒストン、核膜のラミンによって制御されるが、それらの因子の働きにはヒストン修飾や DNA メチル化状態が関与している(Jenuwein T and Allis CD 2001, Nielsen AL et al 2001, Smallwood A et al 2007, Chatterjee N et al 2011)。ES 細胞の多分化能の維持にはエピジェネティックな制御が重要な役割を果たしている(Sato S et al 2010, Azuara V et al 2006, Bernstein BE et al 2006)。たとえば ES 細胞ではヒストン H3K27 のメチル化を行う Eed のノックアウトにより、多分化能を失う(Boyer LA et al 2006, Chamberlain SJ et al 2008, Shen X et al 2008)。そのため、ES 細胞におけるクロマチン構造の変化は、ES 細胞の多分化能に影響を与えることが予想される。

ES 細胞は Oct3/4 や Nanog といった特徴的な転写因子群を発現しており、それらの転写因子群が ES 細胞の自己複製能と多分化能を維持している(Nichols J et al 1998, Botquin V et al 1998, Mitsui K et al 2003, Chambers I et al 2003, Boiani M and Schöler HR 2005)。これらの転写因子の欠損は、ES 細胞の未分化状態維持できなくするとともに分化異常を起こし、ES 細胞の多分化能を失わせる(Niwa H et al 2000, Mitsui K et al 2003)。これらの転写因子は未分化状態の維持に関わる遺伝子をターゲットとしてその発現を促進し、逆に分化を誘導する遺伝子発現を抑制する(Boiani M and Schöler HR 2005, Loh YH et al 2006, Pan G et al 2006, Chen X et al 2008)。

Oct3/4 および Nanog 発現は、転写開始点近傍の T-DMR のメチル化状態に依存しており、ES 細胞では脱メチル化されており、ヒストンは促進修飾である H3 のアセチル化及び H3K4me3 修飾を受けている(Hattori N et al 2004, Hattori N et al 2007)。逆に Oct3/4、Nanog を発現していない栄養膜幹細胞では DNA は高メチル化状態でヒストンは抑制系の修飾である H3K9me3 および H3K27me3 修飾を受けている(Hattori N et al 2007)。Oct3/4 や Nanog といった ES 細胞の多分化能の維持に関わる遺伝子発現はエピジェネティックな制御を受けていることが知られている(Hattori N et al 2004, Hattori N et al 2007, Kashyap V et al 2009)。

ES 細胞は培養条件により様々な細胞種へと分化する。広く用いられる培養系である胚葉体(Embryoid body : EB)は ES 細胞を LIF 非存在条件で浮遊培養することで作成され、内胚葉・中胚葉・外胚葉の三胚葉すべての細胞を含む細胞塊である(Keller GM 1995, Kurosawa H 2007)。ES 細胞の EB 分化において、Oct3/4、Nanog といった特徴的な転写因子は分化開始後に発現が低下し、それに代わって内胚葉マーカーである Gata6、中胚葉マーカー T、外胚葉マーカー Nes など遺伝子の発現が増加する(Niwa H et al 2005, Nakai-Futatsugi Y and Niwa H 2013, Boiani M and Schöler HR 2005)。さらに、各胚葉分化を誘導するマーカー遺伝子群もエピジェネティックな発現制御を受けており、ES 細胞においてはその発現は抑制されている(Yagi S et al 2008, Sato S et al 2010,

Vastenhouw NL and Schier AF 2012)。

第一章では SelH ノックダウン ES 細胞はヘテロクロマチン領域の変化、すなわちエピジェネティック状態の変化が認められた。SelH ノックダウン ES 細胞は多分化能を維持できない可能性もある。

第二章では SelH が ES 細胞の多分化能に与える影響を解明することを目的に、SelH ノックダウンおよび変異型 SelH 強制発現 ES 細胞を用いて、多分化能関連遺伝子の発現解析を行い、それらの遺伝子領域のエピジェネティック解析を行った。さらに EB への分化誘導を行うことで、各胚葉への分化能を解析した。

材料と方法

RT-PCR、SelH 強制発現、cDNA 合成は第一章と同様に行った。使用したプライマーと抗体は表 2-1,2-2 に示した。試薬は特に記載のない限り和光純薬工業株式会社より購入した。プライマーは SIGMA GENOSYS JAPAN より購入した。

定量 RT-PCR

1 μ g の RNA から合成した cDNA の 1/25 量を THUNDERBIRD qPCR Mix (TOYOBO, cat. QPS-201) を用いて、Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies, cat.7500-01) で PCR を行った。20 μ l の系で行い、0.25 μ M each の primer 濃度で反応を行った。PCR は 95°C で 1 分間変性させた後、[95°C-15 秒、60°C-1 分]を 1 サイクルとし、40 サイクル行った。各サンプルにつき 3 回ずつ PCR を行い、その平均値を用いた。発現量は得られた Ct 値から検量線法によって相対濃度を求め、*Actb* の発現量で補正した。各プライマーの検量線の式は表に示した。値はコントロールを 1 としたときの相対値で表した。

Nuclease sensitivity assay

Nuclease sensitivity assay は特定領域の DNA の nuclease に対する感受性を検出する手法であり、クロマチンの凝集・弛緩を検出する(Elgin SC 1981)。本研究では EpiQ Chromatin Analysis Kit (Bio-Rad, cat.172-5400)を用いて行った。トリプシンを用いて培養皿から分離した 2×10^6 の ES 細胞を nuclease で 1 時間処理した。その後付属カラムで DNA を精製した。検出は定量 PCR を用いて上記と同様に行った。精製した DNA の定量は NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, cat. ND-1000)を用いて行い、各定量 PCR に 100 ng の DNA を供した。nuclease 処理サンプルおよび nuclease 未処理サンプルを定量 PCR で計測し、nuclease 処理サンプルの値を nuclease 未処理サンプルの値で割ることで、nuclease sensitivity を求めた。

ChIP (クロマチン免疫沈降)

ChIP アッセイは Solomon らによって報告された手法を元に、ChIP-IT Express Kit (Active Motif, cat.53009)を用いて行った(Solomon MJ et al 1988)。 1×10^7 の ES 細胞を 9 ml の ES 細胞用培地に懸濁し、1 ml の 10% ホルマリン溶液を加えて、30 分間室温で反応させた。反応停止後、500 μ l の Lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8.0, 10 mM EDTA, 1% SDS) に懸濁し、氷上で 30 分間静置し、5,000 rpm で 10 分間遠心分離した。遠心分離は、微量高速冷却遠心機 (TOMY, cat. MX-307) で行った。ペレットを 500 μ l の digestion buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 167 mM NaCl) に懸濁後、超音波式ホモ

ジナイザー (TAITEC, cat. VP-30S) でソニケーションした (power:9, 10 秒)。その後、enzymatic shearing cocktail を加えて、37°C で 10 分間反応させた。15,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清をクロマチン溶液として回収した。

抗体反応は、100 μ l のクロマチン溶液に 25 μ l の Magnetic beads、3 μ g の抗体を加え 4°C で 4 時間反応させた。用いた抗体は表 2-2 に示す。Wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100) でビーズを洗浄した後、ビーズに Elution buffer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 300 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.5% SDS) を加えて、65°C で 4 時間反応させ、溶出した。DNA は DNA Clean & Concentrator Kit (Zymo Research, cat. D4004) を用いて精製した。検出は上記と同様に、定量 PCR を用いて行った。一回の PCR に 5×10^4 細胞分の DNA を使用した。抗体による反応を行わないサンプル (Input) も同時に PCR を行い、値は各抗体の沈降サンプルを Input で割って求めた。

DNA 抽出

DNA 抽出は Molecular Cloning, (third edition) Chapter 6, 6-4 (Sambrook and Russell, Cold Spring Harbor Laboratory press) を一部改変して行った。Lysis buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 100 μ g/ml Proteinase K (MERCK, cat. 71049-3CN)) を細胞約 1×10^6 個あたり 100 μ l 加えて、55°C で 2 時間転倒混和した。その後、PCI (Phenol : Chloroform : Isoamylalcohol = 25:24:1) を用いて DNA を抽出し、RNase, DNase-free (Roche, cat. 11119915001) を 5 μ g/ml となるように加え、37°C で 30 分反応させた。再度 PCI で抽出し、ethanol 沈殿を行った後、TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8.0)) に溶解した。

バイサルファイトシークエンス法

バイサルファイト反応は以下の論文で紹介された方法を一部改変して行った (Olek A et al 1996)。4 μ g のゲノム DNA を HindIII で消化した。ethanol 沈殿後 32 μ l の水で溶解し、1 μ l の 10 N NaOH を加え、42°C で 30 分間反応させた。その後、2.5 M の Sodium Bisulfate を 200 μ l と 10 mM hydroquinone を 12.5 μ l 加えて 250 μ l にした。反応は [95°C-30 秒、55°C-15 分] を 1 サイクルとし、20 サイクル行ったあと 55°C で 8 時間反応させた。その後 QIAquick Gel extraction kit (QIAGEN, cat. 28704) でゲノムを精製し、終濃度 0.3 M となるように 10 N NaOH を加え 37°C で 30 分間反応させた。その後、ethanol 沈殿を行い、TE に溶解した。

バイサルファイト反応済みのゲノム DNA を BIO Taq HS Polymerase (BIOLINE, cat. BIO-21040) を用いて PCR で増幅させた。反応は 0.2 mM each dNTP, 1.5 mM $MgCl_2$, 0.1 μ M each primer, 1 U Polymerase, 1 \times Immo buffer で行った。PCR は 95°C で 10 分変性させた後、[94°C-30 秒、60°C-30 秒、72°C-1 分] を 1 サイクルとし、43 サイクル

行った後 72℃で 10 分間反応させた。PCR 産物は pGEM-T Easy Vector System を用いてクローニングし、BigDye Terminator v3.1 Sequencing Standard で DNA を標識・増幅し、Applied Biosystems 3130xl ジェネティックアナライザで塩基配列を解析した。

ES 細胞の Embryoid Body(EB)分化

EB は Feeder 細胞を分離し、ゼラチンコートディッシュ上で 2 日間培養した ES 細胞を 0.05% Trypsin/EDTA で剥がし、10cm 低接着ディッシュ (IWAKI, cat.4020-800) 1 枚につき 5×10^6 個の ES 細胞を 15% FBS、1× MEM Non-Essential Amino acids solution、100 μ M 2-mercaptoethanol、50 U/ml penicillin & 50 U/ml streptomycin、1 mM sodium pyruvate、2 mM L-glutamine を添加した DMEM 中で浮遊培養した (Kurosawa H 2007)。2 日ごとに培地を交換し、培養 4 日目および 10 日目のものを回収した。また、2 日ごとに細胞を撮影し、画像解析ソフト(Image J, NIH)を用いて、EB のサイズを計測した。

表2-1 プライマー配列

RT-PCR		
Klf4	Cgggaagggagaagacact	gagttcctcacgccaacg
Dppa2	gcctggagactttcaacgag	ttgcgtagcgtagtctgtgtt
Dppa4	gctgaggtcagaggtctttg	gctcttctgcgctccact
Gdf3	tggtcgtgggaacctgct	gccatcttggaaggtttctg
Myc	cctagtgtgcatgaggaga	tccacagacaccacatcaatt
Oct3/4	cacgagtggaaagcaactca	gctttcatgtcctgggactc
Nanog	gcctccagcagatgcaag	ggttttgaaaccaggtcttaacc
Sox2	gtggttacctcttctccact	aatctctccccttctccagttc
Dppa3	gatgcacaacgatccagattt	tggaaattagaacgtacatactcaa
Nodal	ccaacatgcctacatcca	cacagcacgtggaaggaac
Sall4	gcagcctcagcagctacc	ggggagttcactggagca
定量RT-PCR		
Nanog	gcctccagcagatgcaag	ggttttgaaaccaggtcttaacc
Dppa3	gatgcacaacgatccagattt	tggaaattagaacgtacatactcaa
Nodal	ccaacatgcctacatcca	cacagcacgtggaaggaac
Gata4	ggaagacacccaatctcg	catggccccacaattgac
Gata6	ggtctctacagcaagatgaatgg	tggcacaggacagtccaag
T	cgaccacaaagatgtaatggag	ccagcaccaggaacaagc
Kdr	gtccttgcatcagaagagctga	gtacacggtggtgtctgtgtca
Nes	ctgcaggccactgaaaagtt	tctgactctgtagacctgtctc
Ascl1	tctcctgggaatggactttg	cgttggcgagaaactactaaag
Oct3/4	cacgagtggaaagcaactca	gctttcatgtcctgggactc
Klf4	cgggaagggagaagacact	gagttcctcacgccaacg
Dppa2	gcctggagactttcaacgag	ttgcgtagcgtagtctgtgtt
Dppa4	gctgaggtcagaggtctttt	gctcttctgcgctccact
Gdf3	tggtcgtgggaacctgct	gccatcttggaaggtttctg
Myc	cctagtgtgcatgaggaga	tccacagacaccacatcaatt
Sox2	gtggttacctcttctccact	aatctctccccttctccagttc
Sall4	gcagcctcagcagctacc	ggggagttcactggagca
SelH	gaccgtggtcattgagcatt	ttggacgggttacttgc
Actb	ggatgcagaaggagattactgc	ccaccgatccacacagagta
Nuclease sensitivity assay & ChIP		
Nanog	ggttagagtgccttactcac	gctggcttcagacttactgc
Dppa3	tccgcctaaaggtgtagctc	gggggtctggttctcttta
Nodal	gtttttggatgaactggagagg	gatgagctagaggtgtgtgga

表2-1 プライマー配列

バイサルファイトシーケンス

Nanog	上流側	ttgtgtagagttttatatgggaga	ccaaacttatctaccaccataccc
Nanog	下流側	gggtatggtagataagtttg	cctcatttcactttattcatcttt
Dppa3	上流側	ttttgtgtgtgtgtgtttt	caaacttcacctaaactacacctt
Dppa3	下流側	aaaggtgtagtttaggtgaagttgt	ctccctaatactccactaaatcaa
Nodal	上流側	taggtttggagagtgattgagatg	atctcaccaaccaacaataaat
Nodal	下流側	atttattgttgggttggtgagat	cccaaaaccacaataataactcc

表2-2 抗体

ChIP						
抗体	品名	品番	量	購入元	lot	
H3K4me3	Anti-trimethyl HistoneH3 (Lys4), mouse monoclonal antibody	307-34813	3 µg	モノクローナル抗体研究所	11004	
H3K9Ac	Anti-acetyl HistoneH3 (Lys9), mouse monoclonal antibody	MA305B	3 µg	モノクローナル抗体研究所	11001	
H3K9me3	Anti-trimethyl HistoneH3 (Lys9), mouse monoclonal antibody	301-34833	3 µg	モノクローナル抗体研究所	13012	
H3K27me3	Anti-trimethyl HistoneH3 (Lys27), mouse monoclonal antibody	301-95253	3 µg	モノクローナル抗体研究所	11001	
IgG	Mouse Control UgG2a (MOPC-173) -ChIP Grade	ab18413	3 µg	abcam	GR22641-5	

結果

SelH ノックダウン ES 細胞の多分化能関連遺伝子発現解析

SelH ノックダウン ES 細胞を用いて、ES 細胞で高発現な多分化能関連遺伝子群を発現解析した。図 2-1A に示すように、コントロール ES 細胞では全てのマーカー遺伝子 *Nanog*、*Dppa3*、*Nodal*、*Oct3/4*、*Klf4*、*Sox2*、*Sall4*、*Dppa4*、*Myc*、*Gdf3*、*Dppa2* を高発現している。一方、SelH ノックダウン ES 細胞 KD1・KD2 では、*Nanog*、*Dppa3*、*Nodal* の発現量の低下が認められ、*Klf4* の増加が認められた。

定量 RT-PCR による解析では、SelH ノックダウン ES 細胞において、未分化状態の維持に関わる遺伝子の中でも、コントロールと比較して *Nanog* 発現量が 20%程度、*Dppa3* 発現量が 90%程度、*Nodal* の発現量が 40%程度、それぞれ有意に低下していることが認められた(図 2-1B)。

SelH ノックダウン ES 細胞のレスキュー実験

SelH ノックダウン ES 細胞で認められた *Nanog*、*Dppa3* および *Nodal* 発現における SelH の影響を確認するため、SelH ノックダウン ES 細胞に対して、野生型 SelH およびセレノシステインをシステインに置換した SelH (SelH cys) を強制発現させた。これらの細胞において野生型・変異型含めた *SelH* mRNA 発現はコントロールと比較して増加した(図 2-2A)。

野生型 SelH を強制発現した SelH ノックダウン ES 細胞において *Nanog*、*Dppa3* および *Nodal* 発現を解析した結果、KD1 では *Nanog*、*Dppa3* の発現が回復し、KD2 では *Nanog*、*Nodal* の発現が回復した(図 2-2B)。また、変異型 SelH の強制発現によっては、KD1 では *Nanog*、*Dppa3* の発現が回復し、KD2 では *Nanog*、*Dppa3*、*Nodal* の発現量の回復が認められた(図 2-2C)。

以上のことから、SelH は ES 細胞において、多分化能関連遺伝子である *Nanog*、*Dppa3* および *Nodal* の発現を維持する働きがあることが明らかとなった。また、セレノシステインをシステインに置換した SelH においても、野生型と同様に多分化能関連遺伝子の発現制御機能を有することが明らかとなった。従って、第一章で樹立した変異型 SelH 強制発現 ES 細胞株は、野生型 SelH の発現が増加した細胞として取り扱うことが可能と考えられる。

変異型 SelH 強制発現 ES 細胞の多分化能関連遺伝子発現解析

変異型 SelH 強制発現 ES 細胞 SelH-GFP および GFP-SelH においても、多分化能関連遺伝子群の発現解析を行った。その結果、両変異型 SelH 強制発現 ES 細胞 SelH-GFP および GFP-SelH において、コントロールと比較して、*Nanog*、*Klf4* 発現量の増加が認められた(図 2-3A)。一方で、*Dppa3*、*Nodal* の発現量の変化は認められなかった。定

量 RT-PCR による解析では、SelH-GFP でコントロールの 1.5 倍、GFP-SelH で 1.3 倍の *Nanog* 発現量の増加が認められた(図 2-3B)。

SelH ノックダウン ES 細胞のクロマチン状態の解析

SelH ノックダウンで発現が低下する *Nanog*、*Dppa3* および *Nodal* 領域について、エピジェネティック状態の解析を行った。*Nanog*、*Dppa3* および *Nodal* は転写開始点近傍に有している T-DMR におけるクロマチンの凝集を nuclease sensitivity assay を用いて解析した。この解析では nuclease への感受性により対象領域のクロマチン状態を検知し、クロマチンが凝集しているほど PCR での増幅量が増加する(図 2-4A)。その結果、*Nanog*、*Dppa3* 領域について、SelH ノックダウン ES 細胞 KD1・KD2 で nuclease sensitivity の増加が認められ(図 2-4B)、これらの領域におけるクロマチンが凝集していることが明らかになった。

SelH ノックダウン ES 細胞のヒストン修飾解析

Nanog、*Dppa3* および *Nodal* 領域について、クロマチン免疫沈降法(ChIP 法)によってヒストン修飾を解析した。その結果、それらの領域について SelH ノックダウン ES 細胞 KD1・KD2 では、促進系の修飾である H3K4me3 および H3K9Ac の低下が認められた(図 2-4C)。さらに、*Nanog*、*Dppa3* 領域では抑制系の修飾である H3k9me3 の増加が認められた。KD2 では、*Dppa3* 領域の H3K27me3 修飾の増加も認められた。一方、*Nodal* 領域では H3k9me3 および H3K27me3 の変化は認められなかった。

SelH ノックダウン ES 細胞の DNA メチル化解析

Nanog、*Dppa3* および *Nodal* の T-DMR は ES 細胞において低メチル化状態にあることが知られている(Hattori N et al 2007, Kashyap V et al 2009)。*Nanog*、*Dppa3* および *Nodal* 領域について、バイサルファイトシーケンス法を用いて、SelH ノックダウン ES 細胞の DNA メチル化状態を解析した。*Nanog* 領域についてはクロマチンの凝集が認められた領域周辺の DNA メチル化状態が、KD1 で 65.6%、KD2 で 48.6%とコントロールの 22.7%に比較して高メチル化状態になっていた(図 2-5A)。*Dppa3* 領域では転写開始点下流で、コントロールの 1.4%とほとんどメチル化されていなかったが、KD1 で 85%、KD2 で 22.7%とコントロールと比較して高メチル化状態になっていた(図 2-5B)。*Nodal* 領域については、特に転写開始点直上流の 2 つの CpG で、コントロールと比較して SelH ノックダウン ES 細胞で高メチル化状態になっていた(図 2-5C)。

以上のことから、SelH は ES 細胞において、*Nanog*、*Dppa3* および *Nodal* のクロマチン状態、ヒストン修飾、DNA メチル化状態を保つ働きがあることが明らかとなった。

SelH ノックダウン ES 細胞の胚葉体誘導解析

SelH ノックダウン ES 細胞の EB への分化実験を行った。その結果、図 2-6A に示すように、SelH ノックダウン ES 細胞 KD1・KD2 は EB 形成に異常が見られ、コントロールに比べて小さいことが確認された。分化開始 6 日および 8 日目においては、SelH ノックダウン ES 細胞から形成された EB はコントロールの約半分ほどの大きさであった(図 2-6B)。この時点での *SelH* mRNA 発現量を RT-PCR により解析した結果、分化 4 日目および 10 日目の時点では *SelH* 発現に差は認められなかった(図 6C)。

さらに、SelH ノックダウン ES 細胞から形成した EB について、各胚葉の分化マーカー遺伝子の発現を分化 4 日目および 10 日目の時点で解析した。その結果、SelH ノックダウンでは内胚葉分化マーカー遺伝子である *Gata4*、*Gata6* および中胚葉分化マーカー遺伝子である *T*、*Kdr* の発現がコントロールと比較して低発現であった(図 2-7A,B)。 *Gata4* および *T* はコントロール細胞では分化 4 日目の時点で発現が高くなるが、SelH ノックダウンでは分化 4 日目で発現が低く、分化 10 日目では差は認められなかった。 *Gata6* および *Kdr* は分化 4 日目と分化 10 日目の両方で、コントロール細胞と比較して SelH ノックダウンで発現低下が認められた。一方、外胚葉分化マーカー遺伝子である *Nes*、*Ascl1* については、SelH ノックダウンでコントロールと比べ高発現であった(図 2-7C)。 *Nes* は SelH ノックダウンでは発現が最も高くなる分化 4 日目で発現がコントロールと比べて高く、分化 10 日目では KD1 でのみ発現が高かった。 *Ascl1* は分化 10 日目で発現が最も高くなり、その時点で SelH ノックダウンにおいてコントロールと比べて発現が高かった。これらの結果より SelH ノックダウンが内胚葉・中胚葉分化を抑制し、外胚葉分化を促進することが明らかとなった。

以上の結果から、SelH は ES 細胞の多分化能に関わり、内胚葉・中胚葉分化能を保持し、逆に外胚葉分化を阻止する役割を担っていることが示唆された。

変異型 SelH 強制発現 ES 細胞の胚葉体誘導解析

変異型 SelH 強制発現 ES 細胞 SelH-GFP および GFP-SelH の EB 分化解析を行った。SelH 強制発現によって、EB は分化 2 日から 6 日目まではコントロールと比較してサイズが大きくなったが、SelH-GFP でのみ、それ以降は EB のサイズの増加がほとんど見られず、分化 8 日、10 日目においてはコントロールよりも小さかった(図 2-8A,B)。分化時の SelH の発現は増加が見られず、分化 4 日目においては逆にコントロールよりも低発現であった。さらに、SelH 強制発現 ES 細胞から作成した EB の三胚葉マーカーの発現を解析したところ、SelH-GFP においてのみ SelH ノックダウンとは逆に内胚葉・中胚葉分化マーカー遺伝子の発現がコントロールと比較して低く、外胚葉分化マーカー遺伝子の発現が増加していた(図 2-9A,B,C)。特に分化 4 日目において *Gata4*、*Gata6*、*T*、*Kdr* の発現がコントロールと比較して高発現だった。分化 10 日目では *Gata6* および *Kdr* はコントロールと比較して低発現だった。外胚葉マーカー遺伝子の *Nes* はコン

トロールで発現が最も高くなる分化 4 日目、*Ascl1* は分化 10 日目で SelH-GFP では低発現であった。一方で、GFP-SelH から形成した EB のマーカー遺伝子発現はコントロールとの差異は認められなかった。

考察

本章の研究によって、SelH は ES 細胞の多分化能に関与し、三胚葉分化の方向性の制御を行うことが示された。

Nanog、Dppa3、Nodal は ES 細胞の多分化能において重要な遺伝子である。Nanog は ES 細胞の未分化状態の維持を行い、Nanog の強制発現 ES 細胞は LIF なしでも未分化状態を維持する(Mitsui K et al 2003, Chambers I et al 2003, Wang SH et al 2003)。Nanog ノックアウト胚は初期の胚性致死であり、ES 細胞における Nanog ノックダウンは ES 細胞の分化を誘導し、胚体外胚葉への分化を誘導する(Mitsui K et al 2003, Hyslop L et al 2005, Torres J and Watt FM 2008, Hough SR et al 2006)。Dppa3 は始原生殖細胞と ES 細胞で高発現な遺伝子であり(Sato M et al 2002)、Dppa3 を完全に欠損したマウス胚は正常な分化ができず、胚盤胞形成および着床能が著しく低下する(Payer B et al 2003)。Nodal は胚発生において、最も初期の運命決定因子の一つで、左右軸の形成や内胚葉、中胚葉分化誘導に必須であり、神経分化を抑制する(Shen MM 2007, Quail DF et al 2013)。また、Nodal はヒト ES 細胞の維持に必須であることも知られている(James D et al 2005)。SelH はこれらの遺伝子の発現制御をしており、ES 細胞の多分化能を維持していることが示された。

今回、SelH ノックダウン ES 細胞で発現低下が認められた Nanog、Dppa3、Nodal はエピジェネティック制御を行うことが報告されている。たとえば、Nanog は未分化状態の ES 細胞で発現の高い遺伝子群をターゲットとして発現を促進するだけでなく、未分化状態で発現が抑制されている分化誘導に関わる遺伝子群もターゲットとしており、そのターゲット遺伝子はヒストン H3K27me3 修飾を行う PRC2 のターゲットと高い相関を示し(Boyer LA et al 2006, Ku M et al 2008, Mikkelsen TS et al 2007)、Nanog は PRC2 をターゲットの分化誘導遺伝子領域にリクルートし、H3K27me3 修飾を行うことが予想されている(Aloia L et al 2013)。また、Dppa3 は初期胚発生において、RanBP5 と結合し、インプリント遺伝子の DNA メチル化を脱メチル化から保護する機能がある(Nakamura T et al 2007)。Dppa3 はヒストン H3K9me2 修飾を認識し、メチル化 DNA を酸化してヒドロキシルメチル化する酵素である Tet から、メチル化 DNA を保護する(Nakamura T et al 2012)。さらに、Dppa3 欠損マウス成熟卵では、核小体周辺へのヘテロクロマチン領域の凝集が弱く、異常なヘテロクロマチン領域が観察され、Dppa3 が正常なヘテロクロマチンの形成に必要であることが示されている(Liu YJ et al 2012)。Nodal もその Nodal passway を介して、ES 細胞において H3K27me3 の脱メチル化酵素である Jmjd3 をリクルートすることで、未分化維持に関わる遺伝子領域の H3K27me3 修飾を低下させる(Dahle Ø et al 2010)。この時、Nodal 遺伝子領域自身も Nodal のターゲットであり、ヒストン H3K27me3 の脱メチル化を受ける(Dahle Ø et al 2010)。これらのため、SelH ノックダウンによるエピジェネティック状態の変化は

Nanog、*Dppa3*、*Nodal* の発現変化を介して起きた可能性も存在する。しかし、SelH ノックダウンおよび変異型 SelH 強制発現の EB 分化において、そのノックダウンおよび強制発現効果は分化 4 日後においては認められなかったにもかかわらず、EB のマーカー遺伝子の発現に影響を与えていた。これは、未分化状態における SelH 発現量の変化がその後の EB 分化の異常を引き起こしたことを示している。つまり、SelH ノックダウン ES 細胞は未分化の状態が多分化能を失っており、SelH は分化後に遺伝子発現を制御することで分化制御したのではなく、分化前の ES 細胞の多分化能維持を行っていると考えられる。エピジェネティックな修飾は、現在の遺伝子の発現状態を制御するだけでなく、将来的な発現可能性も規定している。SelH ノックダウンは *Nanog* 遺伝子領域などのエピジェネティック状態を制御していた。*Gata4* や *T*、*Nes* など各胚葉のマーカー遺伝子の発現も、エピジェネティックな制御を受けている(Yagi S et al 2008, Vastenhouw NL and Schier AF 2012)。そのため、SelH は未分化の ES 細胞におけるエピジェネティック因子であり、遺伝子のエピジェネティック状態を制御することで、遺伝子発現や分化能に影響を与えていることが示唆される。

過去の SelH 研究においてセレノシステインを置換した変異型の SelH が用いられてきた(Novoselov SV et al 2007)。今回の研究において、SelH ノックダウンによる *Nanog*、*Dppa3*、*Nodal* の発現低下について、変異型 SelH の強制発現によっても、野生型と同様にこれらの遺伝子発現の回復が認められた。これは、SelH の *Nanog*、*Dppa3*、*Nodal* の発現制御機能においては、セレノシステインは必須でないことを示している。第一章において、セレノシステインを含まない変異型 SelH がヘテロクロマチン状態の変化を引き起こし、第二章でも変異型 SelH が *Nanog* の発現と EB への分化能の変化を引き起こした。さらに、*Nanog* の発現制御においては、C 末端に結合した SelH の強制発現 ES 細胞 SelH-GFP と同様に、EGFP を N 末端に結合した SelH の強制発現 ES 細胞 GFP-SelH でも発現の増加が認められた。これは、EGFP を N 末端に結合した SelH もその機能を完全に失っているわけではないことを示しており、今回作成した変異型の SelH は内在性の SelH と同様の機能を果たしていると考えられる。本章 EB 分化の結果においても、SelH-GFP と GFP-SelH の差異が認められたが、これは SelH 発現量の差であると考えられる。以上のように、SelH-GFP と GFP-SelH は SelH の強制発現の解析として有用であると言え、得られたヘテロクロマチンの変化、*Nanog* 発現、EB 分化の結果は SelH ノックダウンで得られた結果を支持すると言える。

SelH の強制発現によって SelH ノックダウンによる *Nanog*、*Dppa3*、*Nodal* の発現が回復し、これらの遺伝子発現の変化における SelH の寄与が確認された。一方で、細胞株によって回復が認められないものも存在し、KD1 における *Nodal* の発現は野生型および変異型 SelH の強制発現によっても回復せず、KD2 における *Nodal* の発現は野生型 SelH の強制発現では回復が認められなかった。これらの細胞について SelH がタンパク質発現量としては十分に回復していない可能性がある。また *Nanog* の発現はど

の細胞についても回復していたことから、*Dppa3*、*Nodal*の発現制御は SelH の間接的なターゲットであり、*Nanog* に比べてその回復に時間がかかった可能性もある。また、変異型 SelH の強制発現では *Dppa3*、*Nodal* の発現の変化は認められなかった。これらの差は SelH は ES 細胞において高発現であり、発現増加よりもノックダウンの方がより影響を与えやすいためと考えられる。

ES 細胞の *Nanog*、*Dppa3*、*Nodal* 遺伝子領域の H3K4me3 修飾は SelH ノックダウンによって低下した。先の研究において、LCC1 細胞において、SelH は Rbbp5 と結合することが示唆されている (Novoselov SV et al 2007)。Rbbp5 は H3K4me3 修飾を行う Mll complex の構成因子の一つである (Dou Y et al 2006, Steward MM et al 2006)。Rbbp5 の欠損は H3K4me3 の低下を起こすが、ES 細胞の未分化状態の維持には関与しない一方で (Jiang H et al 2011, Dou Y et al 2006, Steward MM et al 2006)、Rbbp5 ノックダウンは ES 細胞の分化を抑制することが知られている (Jiang H et al 2011)。SelH は Rbbp5 と共役してヒストンの H3K4me3 修飾を行う因子であり、今回認められた H3K4me3 の低下は Rbbp5 を介した機能である可能性がある。また、*Nanog* および *Dppa3* 領域では、H3K27me3 修飾の増加も認められた。H3K4me3 修飾は H3K27 メチル化の阻害作用が知られている (Schmitges FW et al 2011)。このため、H3K4me3 修飾を介して、H3K27me3 修飾に影響を与えたことが考えられ、SelH のエピジェネティック制御機能は少なくとも H3K4me3 修飾に関するものである。

Nodal 領域では *Nanog*、*Dppa3* 領域と異なり、SelH ノックダウンによるクロマチン状態の凝集やヒストンの H3K4me3、H3K9me3、H3K27me3 修飾の変化は認められず、ヒストン修飾も H3K4me3 のみの変化が認められた。*Nodal* 領域では DNA メチル化の変化も極めて限られた CpG においてのみ起きており、今回クロマチン状態やヒストン修飾を解析した領域と、DNA メチル化の変化が認められた領域は異なるため、別の領域では *Nanog*、*Dppa3* 領域のような変化が起きていることも考えられる。また、*Nodal* 領域の H3K9me3、H3K27me3 修飾はもともと非常にわずかであったため、影響を受けにくかった可能性もある。

以上のように、第二章では SelH は ES 細胞の多分化能維持に重要な役割を果たすことが示され、ES 細胞においてエピジェネティック制御因子として機能することが示唆された。そこで、第三章では、SelH の分化調節機能をさらに詳細に解明するために、外胚葉分化の一つである神経分化に焦点を当てた解析を行う。

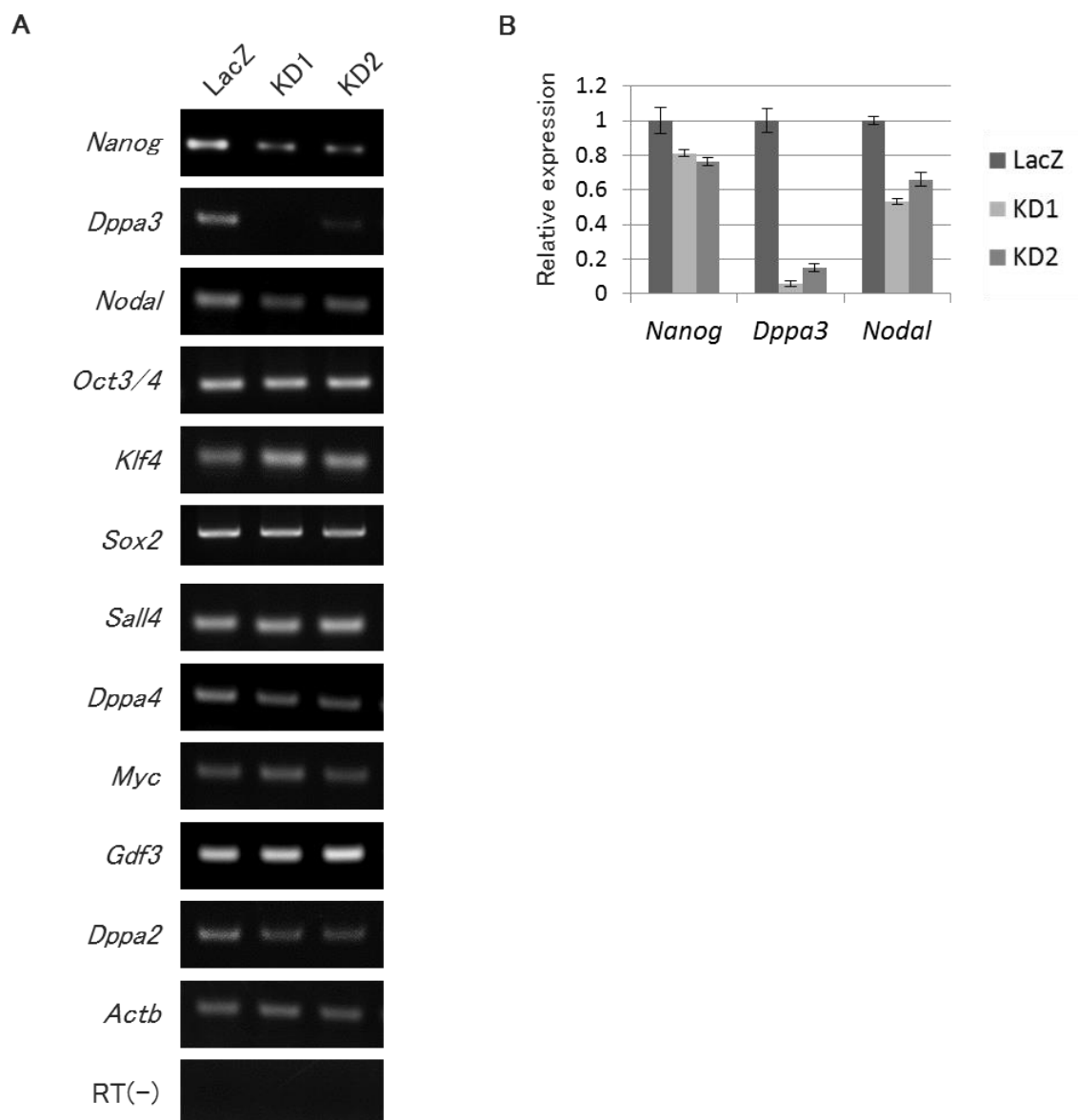


図2-1 SelHノックダウンES細胞のES細胞マーカー遺伝子発現

A) RT-PCR: SelHノックダウンES細胞に対して、ES細胞のマーカー遺伝子群の発現解析を行った。

B) 定量的RT-PCR: SelHノックダウンES細胞に対して、RT-PCRで差の認められた *Nanog*, *Dppa3*, *Nodal* の発現を定量的に解析した。

LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はそれぞれSelHノックダウンES細胞を表す。エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

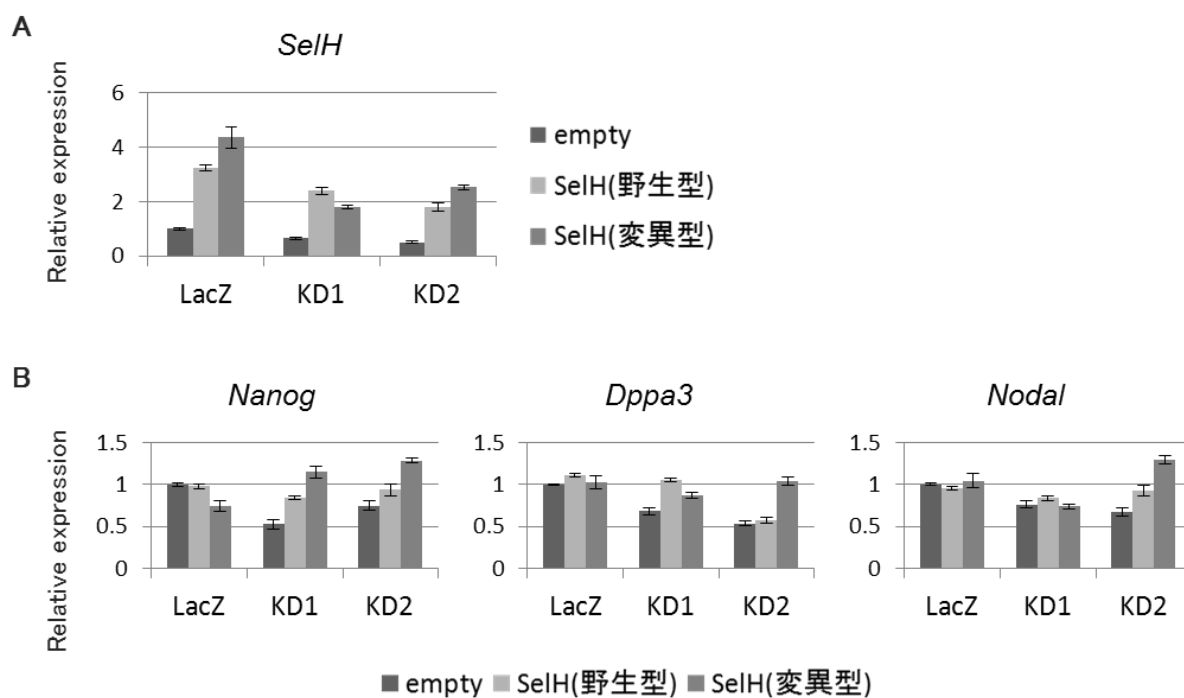


図2-2 SelHノックダウンES細胞におけるSelH強制発現

A) SelH発現: レスキュー実験のSelH発現を定量RT-PCRで解析した。値は空ベクターを導入したコントロールES細胞の発現を1とした時の発現量を表す。

B) ES細胞マーカー遺伝子発現: *Nanog*, *Dppa3*, *Nodal*の発現を定量RT-PCRで解析した。

LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。

SelH(野生型)は野生型SelH発現ベクター導入細胞、SelH(変異型)はシステイン変異のSelH発現ベクター導入細胞、emptyはコントロールの空ベクター導入細胞を表す。

エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

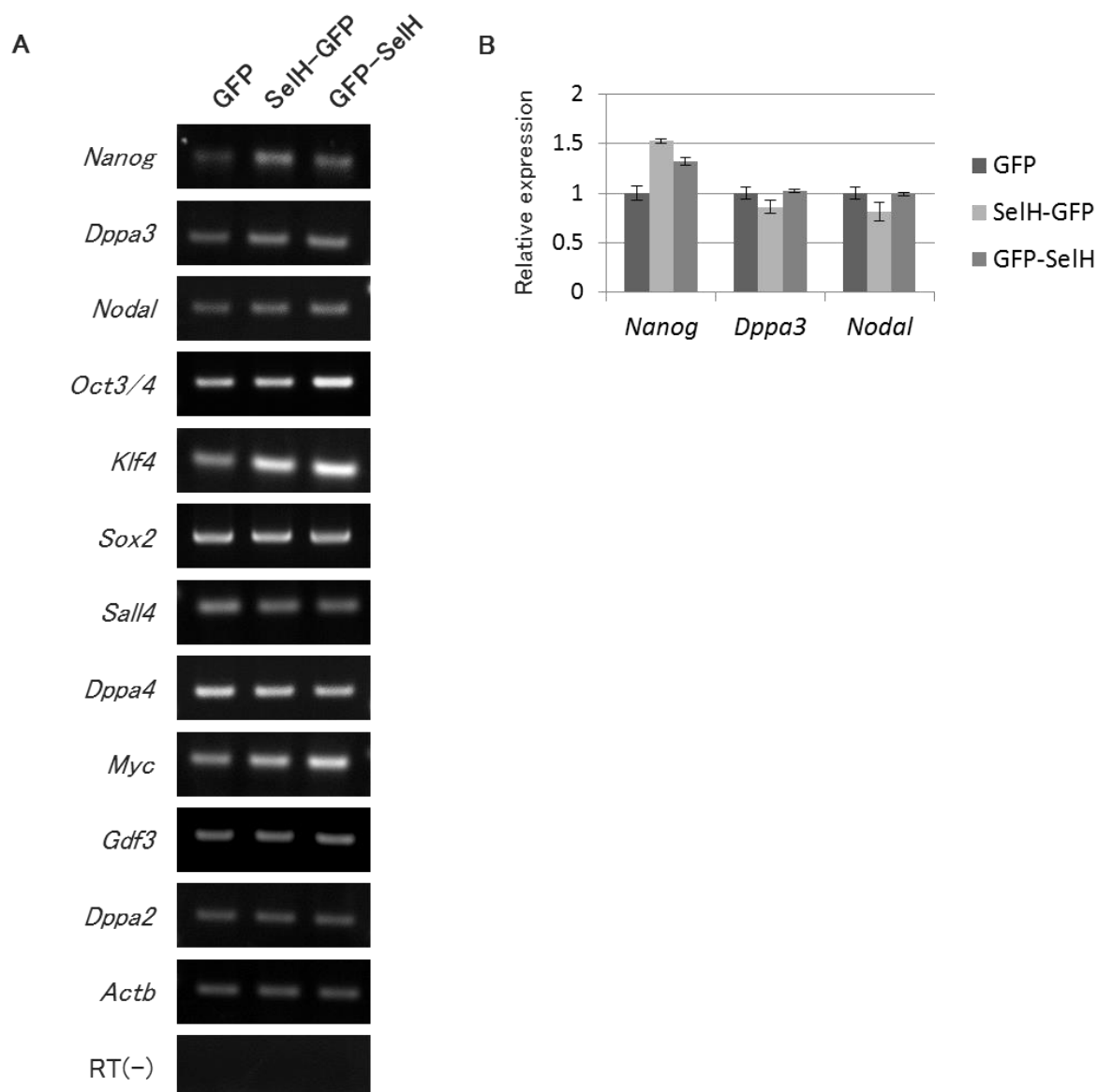


図2-3 変異型SelH強制発現ES細胞のES細胞マーカー遺伝子発現

A) RT-PCR : ES細胞マーカー遺伝子の発現状況を表す。

B) 定量的RT-PCR: *Nanog*, *Dppa3*, *Nodal*の発現を定量的に解析した。

GFPはEGFP強制発現ES細胞を表しSelH-GFP・GFP-SelHはそれぞれC末端・N末端にEGFPを付加した変異型SelH強制発現ES細胞を表す。

エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

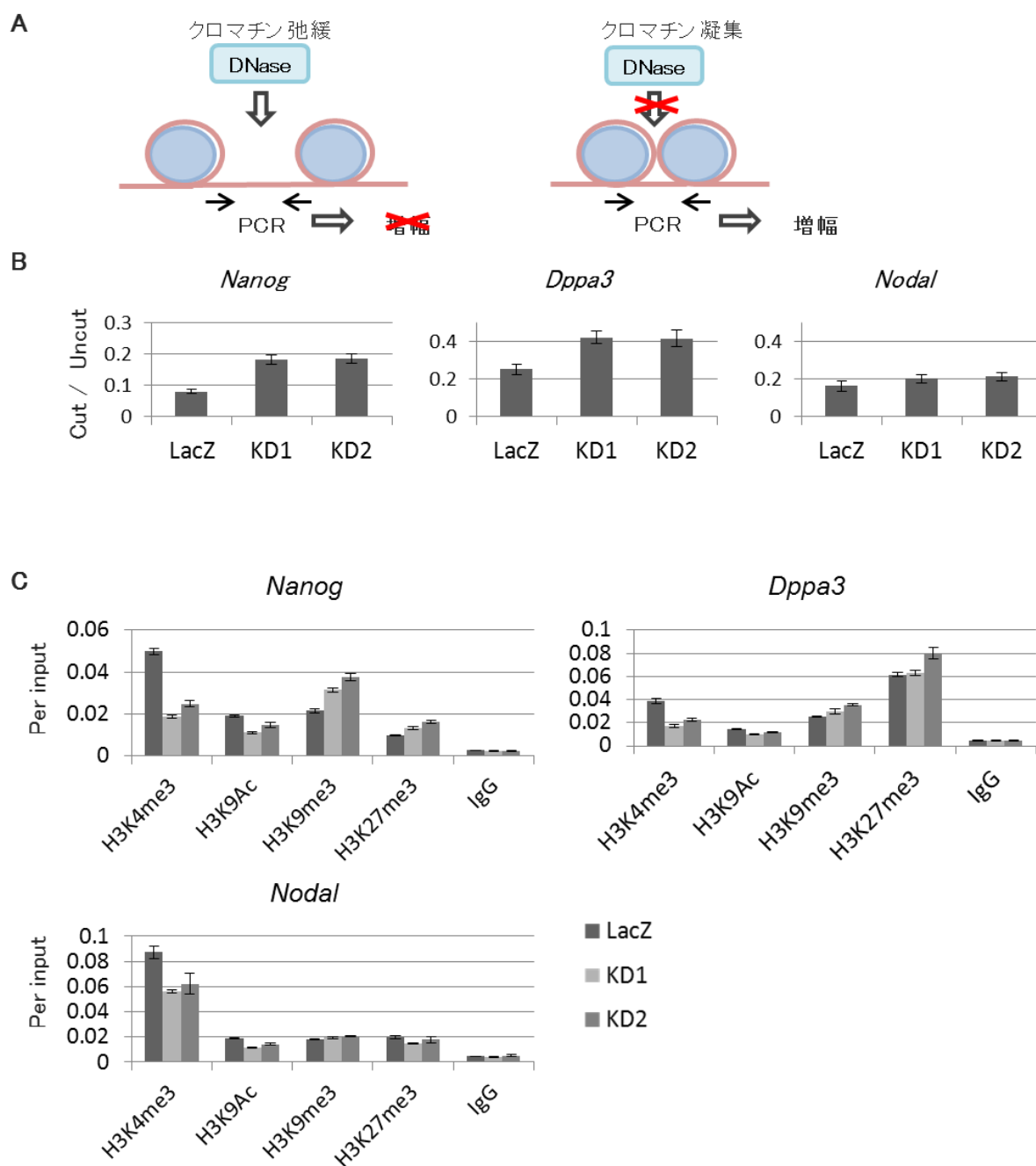


図2-4 SelHノックダウンES細胞のクロマチン状態

A) Nuclease sensitivity assayの概念図：クロマチンが弛緩状態にあると、DNaseがDNAにアクセス可能となり、DNAは切断され、PCRで目的の領域は検出されない。一方でクロマチンが凝集状態にあると、DNaseがDNAにアクセス出来ず、DNAは切断されずに、PCRで目的の領域は検出され、定量PCRでシグナルが高くなる。

B) Nuclease sensitivity assay : SelHノックダウンES細胞を定量PCRで解析した。

C) ChIP assay : SelHノックダウンES細胞のヒストン修飾状態を解析した。

LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。

エラーバーは標準誤差 (SE)を表す。

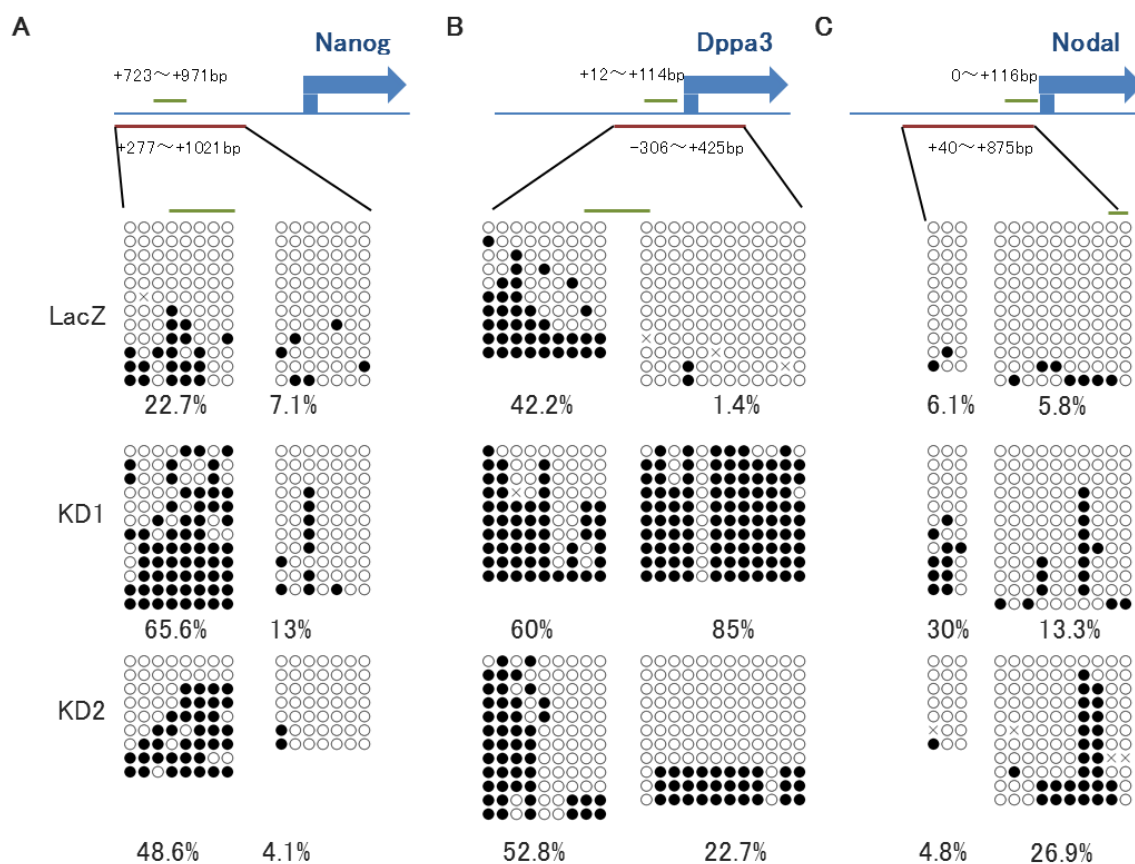


図2-5 SelHノックダウンES細胞のDNAメチル化状態

A) *Nanog*領域のDNAメチル化状態

B) *Dppa3*領域のDNAメチル化状態

C) *Nodal*領域のDNAメチル化状態

青矢印は転写開始点、赤線はDNAメチル化状態解析領域、緑線はヒストン修飾解析領域を表す。数字は転写開始点からの距離を表し、+は上流、-は下流を表す。

白丸は非メチル化CpG、黒丸はメチル化CpGを表す。下部の数字は領域ごとのメチル化率を表す。LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。

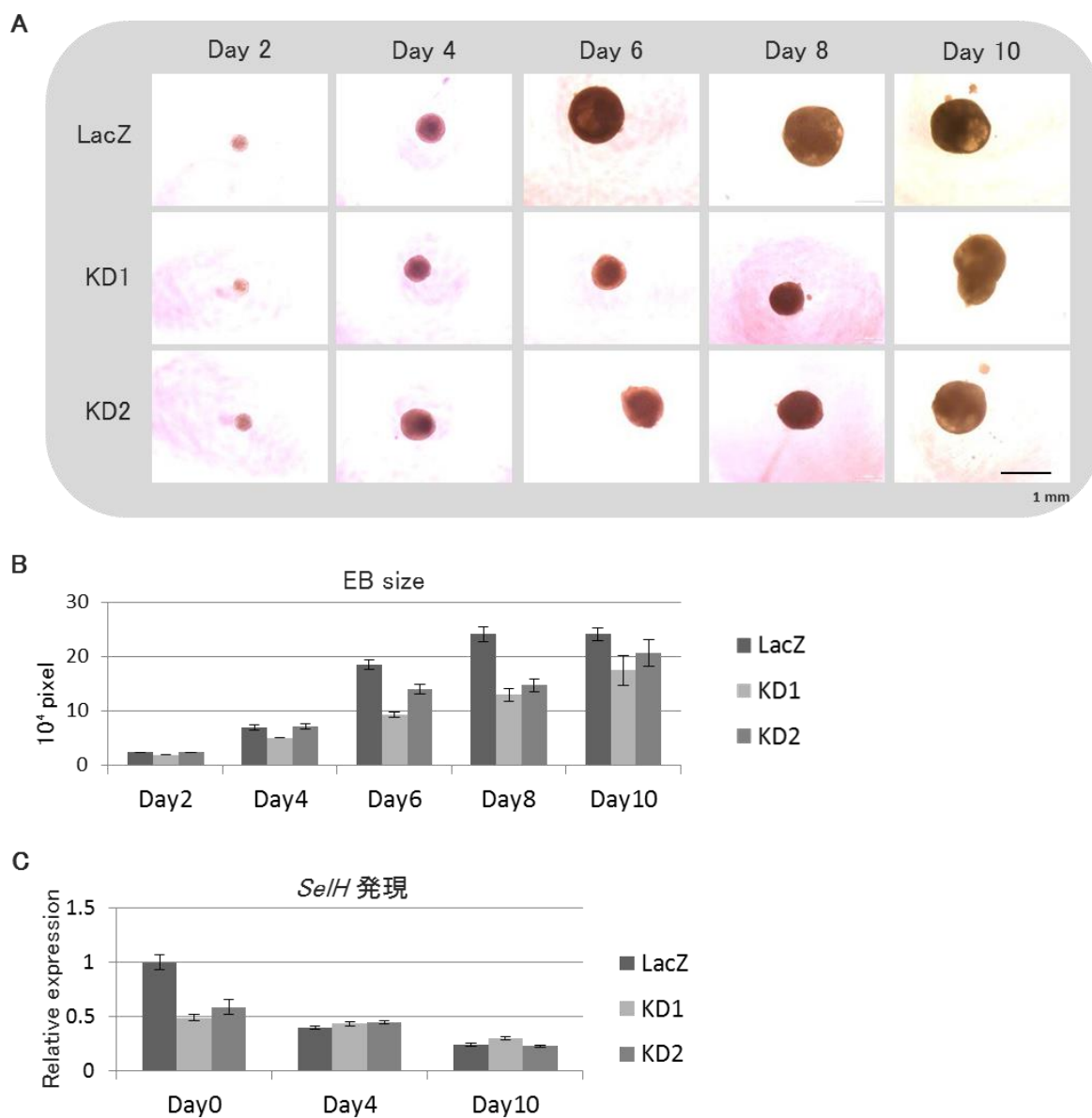


図2-6 *SelH*ノックダウンES細胞のEB分化

A) EBの形態: *SelH*ノックダウンES細胞から分化させたEBの代表的な形態を2日おきに撮影した。スケールバーは1mmを表す。

B) EBの大きさ: *SelH*ノックダウンES細胞から分化させたEBについてその大きさを画像解析によって定量した。

C) *SelH*発現: *SelH*ノックダウンES細胞から分化させたEBの*SelH*発現を定量RT-PCRで解析した。値は未分化状態(day0)のコントロールES細胞の発現を1とした時の発現量を表す。

LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2は*SelH*ノックダウンES細胞を表す。

エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

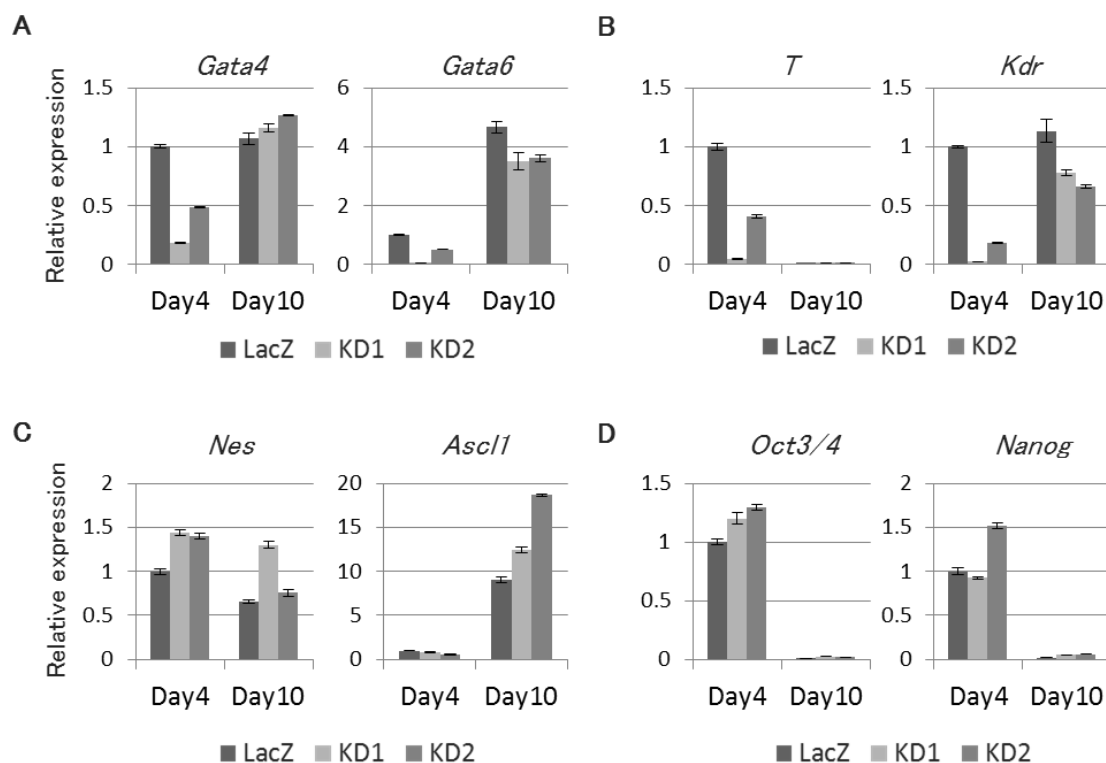


図2-7 分化SelHノックダウンES細胞の分化マーカー遺伝子発現

A) 内胚葉分化マーカー遺伝子の発現

B) 中胚葉分化マーカー遺伝子の発現

C) 外胚葉分化マーカー遺伝子の発現

D) 未分化マーカー遺伝子の発現

SelHノックダウンES細胞から分化させたEBの各分化マーカー遺伝子の発現を、分化4日目および分化10日目の時点で、定量RT-PCRで解析した。

LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。

エラーバーは標準誤差 (SE) を表す。

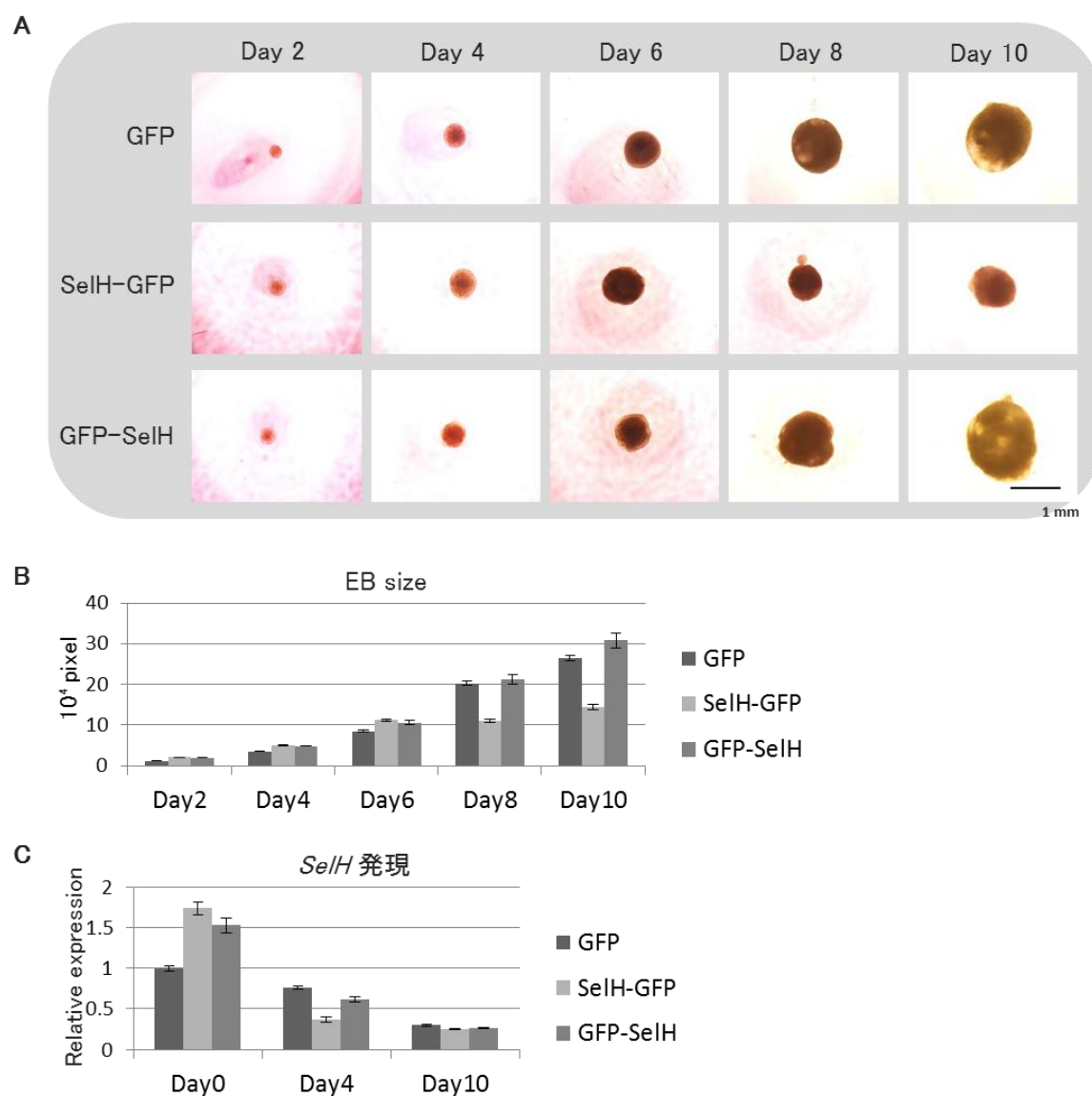


図2-8 変異型SelH強制発現ES細胞のEB分化

- A) EBの形態: 変異型SelH強制発現ES細胞から分化させたEBの代表的な形態を2日おきに撮影した。スケールバーは1mmを表す。
- B) EBの大きさ: 変異型SelH強制発現ES細胞から分化させたEBについてその大きさを画像解析によって定量した。
- C) SelH発現: 変異型SelH強制発現ES細胞から分化させたEBのSelH発現を定量RT-PCRで解析した。値は未分化状態(day0)のコントロールES細胞の発現を1とした時の発現量を表す。GFPはEGFP強制発現ES細胞を表しSelH-GFP・GFP-SelHはそれぞれC末端・N末端にEGFPを付加した変異型SelH強制発現ES細胞を表す。エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

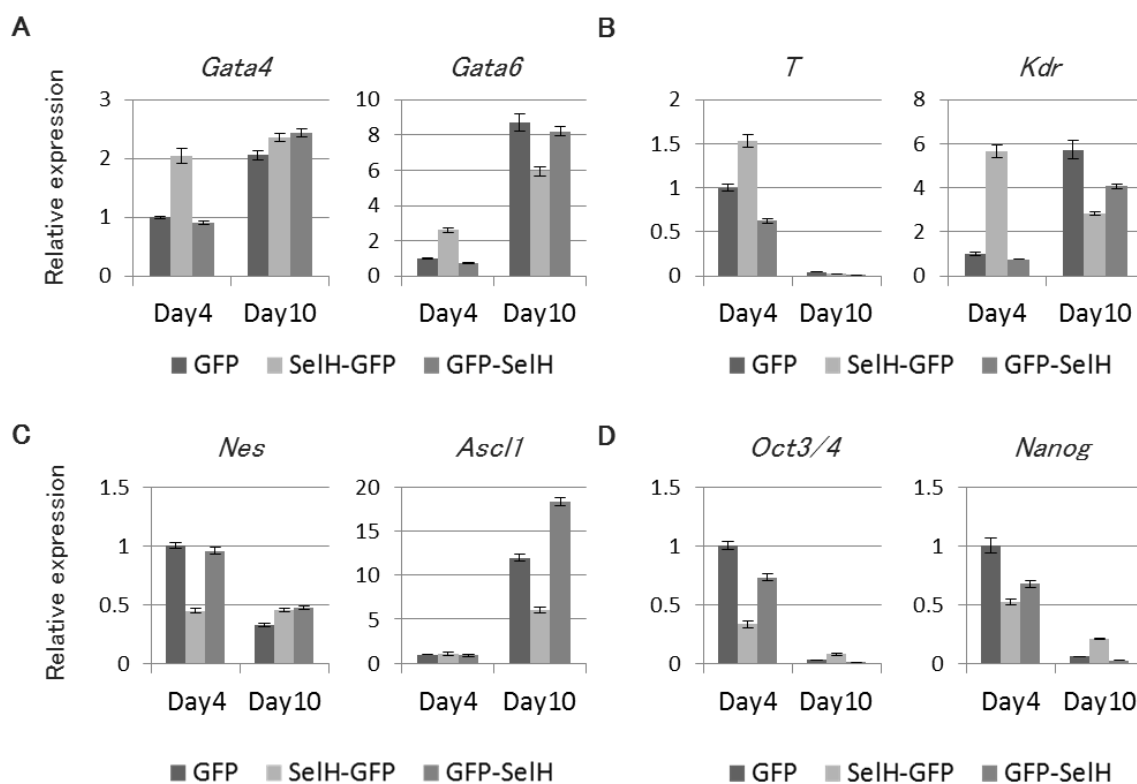


図2-9 EB分化した変異型SelH強制発現ES細胞の分化マーカー遺伝子発現

A) 内胚葉分化マーカー遺伝子の発現

B) 中胚葉分化マーカー遺伝子の発現

C) 外胚葉分化マーカー遺伝子の発現

D) 未分化マーカー遺伝子の発現

変異型SelH強制発現ES細胞から分化させたEBの各分化マーカー遺伝子の発現を、分化4日目および分化10日目の時点で、定量RT-PCRで解析した。

GFPはEGFP強制発現ES細胞を表し、SelH-GFP・GFP-SelHはそれぞれC末端・N末端にEGFPを付加した変異型SelH強制発現ES細胞を表す。

エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

第三章

ES 細胞の神経分化における SelH の機能

序論

マウスの神経発生は、原腸陥入胚期に外胚葉に由来する神経前駆細胞が現れ、中枢神経系の原器となる神経板が形成されることから始まり、胚性 9 日から 10 日目に神経前駆細胞から神経細胞が分化し始める(Mohamed Ariff I et al 2012, Martynoga B et al 2012)。この時点では神経前駆細胞からグリア細胞への分化は抑制されており、グリア細胞への分化は胚性 14 日から 15 日目に始まる(Mohamed Ariff I et al 2012, Martynoga B et al 2012, Rowitch DH and Kriegstein AR 2010)。ES 細胞は無血清条件下において、間質系の細胞である PA6 細胞と共培養することで神経細胞へ分化する(Kawasaki H et al 2000, Cai C and Grabel L 2007, Kawasaki H et al 2002)。このような In vitro の培養系においても、ES 細胞から神経前駆細胞、神経細胞、グリア細胞という順にマーカー遺伝子を発現し、細胞分化が起きる(Cai C and Grabel L 2007, Kawasaki H et al 2002)。

ES 細胞から分化させた神経前駆細胞では、ヘテロクロマチンシグナルは小さく、多数になる(Meshorer E et al 2006)。さらに、Nuclease assay および FRAP 法によって、発生においても、神経前駆細胞は分化が進むにしたがって、クロマチンが凝集することが知られている(Kishi Y et al 2012)。これらのように神経分化とクロマチン状態には、関連が見受けられる。

ES 細胞では、分化誘導を行う遺伝子は促進系のヒストン修飾であるヒストン H3K4me3 修飾と抑制系のヒストン修飾である H3K27me3 修飾の両方の修飾を受けている(Vastenhouw NL and Schier AF 2012, Bernstein BE et al 2006, Mikkelsen TS et al 2007, Ku M et al 2008)。H3K4me3 修飾と H3K27me3 修飾の両方を持つ遺伝子は bivalent (バイバレント)遺伝子と呼ばれる。未分化状態において、バイバレント遺伝子である神経分化誘導遺伝子 *Ngn1* の発現は H3K27me3 修飾によって抑制されており、神経分化開始時にそれらの H3K27me3 修飾は低下する一方、H3K4me3 修飾は維持されて、速やかに発現が開始される(Vastenhouw NL and Schier AF 2012)。その一方で、内胚葉分化誘導を行うバイバレント遺伝子 *Gata4* は、神経分化開始後も H3K27me3 修飾が維持されることで発現は抑制され続け、H3K4me3 修飾は減少する。また、*Oct3/4* や *Nanog* などの ES 細胞の未分化維持に関わる遺伝子領域には、分化開始後に H3K27me3 修飾が付与され、その発現が抑制されることで分化が進行する(Aloia L et al 2013)。

ES 細胞の分化において、H3K4me3 修飾および H3K27me3 修飾は重要であり、ES 細胞や胚発生におけるこれらの修飾の欠損は分化・発生の異常を示す(Yu BD et al 1995, Glaser S et al 2006, Pasini D et al 2007, Boyer LA et al 2006, Chamberlain SJ et al 2008)。ES 細胞における H3K4me3 修飾複合体の構成因子 Wdr5、Rbbp5、Ash2l のノックダウンはそれぞれ、H3K4me3 修飾の低下を引き起こし、ES 細胞の分化を抑制す

る(Jiang H et al 2011, Ang YS et al 2011, Dou Y et al 2006, Steward MM et al 2006)。一方で、H3K27me3 修飾を行う Eed や Ezh12 のノックアウトにおいても分化は抑制される(Shen X et al 2008, O'Carroll D et al 2001)。Eed および Ezh12 ノックアウトによる分化抑制は、分化開始後の Oct3/4 や Nanog といった未分化状態維持に関わる遺伝子群に対して、H3K27me3 修飾による発現抑制が起こらないためと考えられている。

第一章では SelH はクロマチン状態に関与することが示された。また、第二章において SelH は ES 細胞の多分化能維持に重要であり、ノックダウンは EB 分化異常を引き起こした。SelH は ES 細胞の多分化能をどのように制御しているのだろうか。各胚葉分化を誘導する遺伝子はバイバレントなヒストン修飾を受けており、SelH はそれらに関与する可能性がある。

第三章では、外胚葉分化の一つである神経分化に焦点を当てることで、SelH の分化制御における機能について詳細に解明することを目的とした。第二章で示したように、SelH は ES 細胞では外胚葉への分化を阻止していることが示唆された。そこで、SelH ノックダウン ES 細胞の神経分化誘導を行い、神経前駆細胞、神経細胞、グリア細胞のマーカー遺伝子発現の段階的な解析を行った。

また、SelH について、低セレンウム給餌によって、マウス肝臓および腎臓でその mRNA 発現が低下するなど(Sunde RA et al 2009)、その発現制御についてはセレンウムとの関連が示唆されている。最後に、セレンウムと SelH 発現の関連を調べるために、ES 細胞にセレンウムを暴露し、SelH 発現を解析した。

材料と方法

定量 RT-PCR、免疫染色、ChIP、ウエスタンブロッティングは第一章および第二章と同様に行った。使用したプライマーは表 3-1、抗体は表 3-2 に示した。試薬は特に記載のない限り和光純薬工業株式会社より購入した。プライマーは SIGMA GENOSYS JAPAN より購入した。

神経分化用 Feeder 細胞の培養

神経分化の Feeder 細胞として用いた PA6 細胞は理化学研究所バイオリソースセンターから分与されたものを用いた。PA6 細胞は 10% FBS、50 U/ml penicillin & 50 U/ml streptomycin を添加した DMEM を用いて培養した(Kawasaki H et al 2000)。10 cm 培養皿を用いて培養し、継代は 3 日ごとに行った。

ES 細胞の神経細胞分化

神経分化は川崎らによって報告された方法で行った(Kawasaki H et al 2000)。ゼラチンコートディッシュ上で培養した ES 細胞を 0.05% Trypsin/EDTA で剥がし、PA6 細胞がコンフルエントになった 6 cm 培養皿あたり 4×10^4 個、4-well 培養皿あたり 3×10^3 個の ES 細胞を、10% KNOCK OUT SR (Life Technologies, cat.10828028)、1 × MEM Non-Essential Amino acids solution、100 μ M 2-mercaptoethanol、50 U/ml penicillin & 50 U/ml streptomycin を添加した Glasgow Minimum Essential Medium (Life Technologies, cat. 11710035) に懸濁して、播種して培養した。分化開始 4 日、6 日、8 日、10 日、12 日、14 日目に培地を交換し、分化開始 3 日、5 日、10 日、15 日目に回収した。

マウス

本章で使用したマウスは C57BL/6N 系統であり、日本チャールズリバー社から購入した。成体マウスは、オスの 13 週齢を用いた。胎児マウスは、14.5 日齢のオスを用いた。胎児マウスの日齢は、メイティングの翌朝にプラグが確認された時間を胚性 0.5 日齢として計測した。マウスは 12 時間明暗周期、常時給餌にて飼育した。組織の回収は、東京大学動物実験マニュアルに定められた指針を遵守して行った。

ES 細胞へのセレンウム暴露

2.5%の HNO_3 に溶解させた 0.1% セレンウム硝酸塩は愛知医科大学の近藤文雄准教授より分与していただいたものを使用した。セレンウムを終濃度 100 ppb となるように ES 細胞用培地に加えて、ES 細胞を 4 日間培養した後、回収した。コントロールの細胞は同濃度の溶媒を加えて培養を行った。

表3-1 プライマー配列

定量RT-PCR

Tubb3	gcgcatcagcgataactacaa	catggttccaggttccaagt
Th	cccaagggtcttcagaagag	gggcatcctcgtatgagact
Lmx1b	ggtttcagaaccaaagagcaa	atgcgggttgacagaacct
Gad1	atacaacctttggctgcatgt	ttccgggacatgagcagt
Mtap2	tggctcacttgacaatgctc	gatctcagccccgtgatcta
Pax6	agtgaatgggagggttatg	acttgacgggaactgacac
Ngn2	gacattcccggacacacac	cccagcagcatcagtacctc
Sox1	agacagcgtgcctttgattt	tgggataagacctgggtgag
Syt1	aagttccgttcgagcaaatc	agcatgtctgaccagtgtcg
S100B	ggtgacaagcacaagctgaa	gtccagcgtctccatcatt
Ngn1	gcttcagaagacttcacctatgg	gtgtggagcaggtctttgg
Gfap	acagactttctcaacctccag	ccttctgacacggatttgg
Cldn11	gcctggagtgccaagta	agatgggtggcgacaatgg
Gpx1	ggtttcccgtgcaatcagt	tcggacgtacttgagggaat
Gpx2	gttctcggcttcccttgc	ttcaggatctcctgttctga
Gpx3	ggcttcccttccaaccaa	cccacctgggtcgaaatact
Gpx4	ccgtctgagccgcttactta	ctgagaattcgtgcatggag
Sep15	ctggatcctgtttgagagg	tttcatcccgagacttcaa
Dio1	gcctctcaggacagaagtgc	ctgcaaagttaacaccag
Dio2	ctgcgctgtgtctggaac	ggaattgggagcatcttcac
Dio3	tcgaactgacagcttgtcc	tggagacctggtgtcagaag
Sell	cctgacatacttcgaccctga	caaaccagtcaggacat
SelK	cggaggggaagatggtttaca	cccagaagaagtctgttaggaa
SelM	ctaccgaccgattggaac	cacctcctttaggcgattca
SepN	gacgaccagtctgtctgag	gggaccaggtactgatgaagc
SelO	ctgcagcgcaagaacaga	acctccttctccttgtcg
SelP	cgtccgtcttccctcagac	gctctctgctcctccatagg
SelR	gctcactgaagttcgtcccta	tcgcagtcctatgtcctagt
SelS	aaatctgacaaaaagccttgc	tccaggagcaggttccac
Sps2	ctacctcggggagcctct	cagaggctgcgttggat
SelT	atgaggctcctgctgcttc	ggtggcgtactgcatcttaat
Tr1	tctgaagaaaaagccgtagagaa	ttccaatggccaaaagaaac
Tr2	gggaatccaggagataaaga	aagaagcgcctacgactaatgt
Tr3	tggaatcacaagtgcacacatc	gcaggtccaaccaccaac
SelV	caggaggaagcatgcaaga	tggtttggcagcatttcag
SelW	agctgccttggctcagt	gacatttcagtccttctgtca

表3-1 プライマー配列

ChIP		
Nes	gggtcctcgtcgtatcagc	ccacgctctccagctcttc
Ascl1	tcgtttctcccctctccttt	actctccatcttgccagagc
Pax6	ccgcaccctagacagaagag	gcccagccctcacttaaac
Gfap	ctccgcctggtagacatcag	gcttcctggaacagcaaac
Ngn1	ctctcgtgagcgaattaggg	tagcgtgttgagaccattg
Sox1	atgaaggaacacccggatta	gccagcgagtacttgcctt
Neurog2	ccagcgacactttaccctgt	cccagcagcatcagtacctc
Tubb3	cctgttcctttgttgagga	agtcggctttgttctgtgtc
Mtap2	cctctccagatgtcacacca	accctagcctgaaccgaagt
intergenic	atactgggatgacccgcata	ggcttgagcttctaccatgc
Mgea5	aggcatctctcgggactaag	cagatttgcggaggaggag
Wnt8b	ccccctctaaatccctcttg	gacatagcaaatcccctcca
T	gctgttgggtagggagtgcaa	cagggtgtccactcgggtact
Gata4	gaactctcggggaaggaaag	ggacgtggaccactgagagt
Kdr	gagtgggcttcttaccacaca	gacggagaaggagtctgtgc

表3-2 抗体

免疫染色					
抗体	品名	品番	終濃度	購入元	lot
Tubb3	Monoclonal antibody against Neural ClassIII β -tubulin	MMS-435P	2 μ g/ml	COVANCE	10198GF
Nes	Anti-Nestin antibody (401)	ab11306	10 μ g/ml	abcam	GR66704-1
Th	rabbit anti-TYROSINE HYDROXYLASE affinity purified polyclonal antibody	AB152	10 μ g/ml	MILLIPORE	LV1573151
Gfap	GFAP antibody -Astrocyte Marker	NB300-141	1 μ g/ml	Novus Biologicals	M2
S100B	Anti-S100 beta antibody (SH-B1)	ab66028	10 μ g/ml	abcam	GR16338-17

ウエスタンブロッティング					
抗体	品名	品番	終濃度	購入元	lot
H3K27me3	Anti-trimethyl HistoneH3 (Lys27), mouse monoclonal antibody	301-95253	1 μ g/ml	モノクローナル抗体研究所	11001

結果

SelH ノックダウン ES 細胞の神経分化

SelH ノックダウン ES 細胞を用いて神経分化誘導を行い、免疫染色法によって各神経マーカーの発現コロニーの割合を解析した。各マーカーは、神経前駆細胞の *Tubb3* と *Nes*、神経細胞の *Th*、グリア細胞の *Gfap* と *S100B* を解析した。

コントロール細胞は分化 5 日目に *Tubb3* と *Nes* が発現を始め、それぞれ 18.5%と 9.3%のコロニーに発現が認められた(図 3-1A)。分化 10 日目にそれらの発現はピークを迎え、それぞれ 100%、40%のコロニーに発現が確認された。分化 10 日目には *Th* も 50%のコロニーが発現を開始した(図 3-1A)。*Gfap* と *S100B* は分化 10 日目には発現はほとんど認められず、分化 15 日目に発現を開始して、それぞれ 87%、9.8%のコロニーで発現が確認された(図 3-1A)。以上のようにコントロール細胞は各分化段階で、マーカーを発現し、神経分化が誘導された。

SelH ノックダウン細胞 KD1 および KD2 においては分化 5 日目に、コントロールと同様に *Tubb3* と *Nes* が発現を始めるが、*Tubb3* では、それぞれ 31.9%と 47.4%とより多くのコロニーが発現していた(図 3-1B)。KD2 においては *Nes* でも発現コロニーの増加が認められ、20%のコロニーで発現が確認された(図 3-1C)。分化 10 日目においては、SelH ノックダウン細胞 KD1・KD2 とともに、*Nes* の発現コロニーの割合が 57.1%、59.2%と増加が認められた(図 3-1C)。さらに、コントロール細胞ではほとんど発現が認められなかった *Gfap* を KD1 では 30%、KD2 では 55%のコロニーで発現していた(図 3-1E)。分化 15 日目には、コントロール細胞においては 9.8%であった *S100B* の発現コロニーが、SelH ノックダウン細胞 KD1・KD2 とともに 40%のコロニーで発現が認められた(図 3-1F)。さらに、*Th* はコントロールでは 70.7%の発現コロニーが認められたが、SelH ノックダウン細胞 KD1・KD においては 51%と減少していた(図 3-1D)。

以上のように、マーカー発現から SelH ノックダウン ES 細胞からの神経分化は誘導されるが、その発現はコントロールと比較して、促進されているということが明らかとなった。

SelH ノックダウン ES 細胞から誘導された神経細胞の mRNA 発現解析

他の分化マーカー遺伝子を加えて、mRNA 発現量を定量 RT-PCR で解析した。コントロール細胞において、未分化マーカーである *Oct3/4*、*Nanog* の発現は分化にしたがって低下していく(図 3-2A)。神経前駆細胞のマーカー遺伝子 *Pax6*、*Sox1*、*Ngn1*、*Ngn2*、*Nes*、*Tubb3* の発現は分化 5 日目および 10 日目に最も高くなり、分化 15 日目には低下した(図 3-2B)。神経細胞のマーカー *Ascl1*、*Map2*、*Th*、*Syt1*、*Lmx1b* および *Gad1* の発現は、分化 10 日目に発現を開始し(図 3-2C)、グリアマーカーである *Gfap*、*S100B* および *Cldn11* は分化 15 日目に発現を開始した(図 3-2D)。

SelH ノックダウン細胞 KD1 および KD2 では分化 3 日目において *Oct3/4*、*Nanog* の発現コントロールに比べて発現量の低下が認められた(図 3-2A)。KD2 においては分化 5 日目においてもコントロールに比較して発現量が低かった。神経前駆細胞のマーカー遺伝子の発現においては、分化 3 日目で、*Pax6*、*Sox1* の増加が認められた(図 3-2B)。分化 5 日目には KD2 において、*Pax6*、*Sox1*、*Ngn1*、*Ngn2*、*Nes*、*Tubb3* の発現量が増加していた(図 3-2B)。分化 10 日目以降には、SelH ノックダウンによって *Sox1*、*Pax6*、*Ngn1*、*Tubb3* では増加傾向が認められ、*Ngn2*、*Nes* では逆に減少傾向が認められた(図 3-2B)。神経細胞のマーカー発現は分化 5 日目および 10 日目の段階では、SelH ノックダウンによって、*Map2*、*Th*、*Syt1* の発現の増加傾向が認められた(図 3-2C)。特に、KD2 においては分化 5 日目、10 日目ともに顕著に増加が認められ、*Ascl1* の発現量増加も認められた(図 3-2C)。また、分化 15 日目には *Th*、*Lmx1b* において発現の減少が認められた(図 3-2C)。グリアマーカーである *Gfap*、*S100B* および *Cldn11* は、SelH ノックダウンによって分化 15 日目の時点で発現の増加が認められ、その差は KD2 においてより顕著であった(図 3-2D)。

今回の結果には細胞株による差異が認められた。KD2 は KD1 と比べてタンパク質レベルでのノックダウン効率が高く、この差は SelH タンパク質の発現量の差であることが考えられる。また、KD2 と KD1 は ES 細胞の時点で、多くのヒストン修飾は共通していたが、差が認められる遺伝子もいくつかあり、それらの影響も考えられる。特に *Nanog* と *Dppa3* 遺伝子領域の抑制系ヒストン修飾は KD2 でより高く、このために KD2 の分化がより促進された可能性がある。

これらの結果から、SelH ノックダウンによって、ES 細胞の神経分化を各分化段階の全てにおいて促進されているということが明らかとなった(図 3-2E)。

神経分化における SelH 発現解析

マウス脳発育段階において、*SelH* mRNA 発現解析を行った結果、胎児脳では成体脳よりも発現が高く、発生の進行によって *SelH* 発現が減少することが明らかになった(図 3-3A)。

次に SelH ノックダウン ES 細胞 KD1・KD2 の神経分化における *SelH* mRNA 発現量を解析した。コントロール細胞では、ES 細胞時が最も発現が高く、分化にしたがって SelH 発現量は低下した(図 3-3B)。ES 細胞時において、KD1 で 50%、KD2 で 40% の発現低下が認められた(図 3-3B)。一方で、分化開始後は KD1 では、コントロールと差が認められなかった。KD2 では、分化 3 日目および分化 5 日目において有意な発現の低下が認められた一方で、分化 10 日目および 15 日目では発現量の差は認められなかった。

タンパク質発現では、コントロール細胞で ES 細胞時に比較して分化後に発現量が増加することが明らかとなった(図 3-3C)。KD1、KD2 は ES 細胞時にコントロールと比

較して、顕著な SelH 発現の低下が認められた(図 3-3C)。また、分化後には KD1、KD2 ともに顕著な発現の低下は認められなかった。

従って、分化開始後はロックダウン効果が持続しているとは考えられず、SelH ロックダウン ES 細胞で認められた神経分化促進は、分化前の ES 細胞における多分化能維持の破たんによるものと考えられる。

SelH ロックダウン ES 細胞のヒストン修飾解析

SelH ロックダウン ES 細胞における神経分化関連遺伝子のヒストン修飾状態を ChIP 法によって解析した。神経前駆細胞のマーカー遺伝子である *Pax6*、*Nes*、*Ngn1*、*Sox1*、*Ngn2* すべての遺伝子領域では、SelH ロックダウン ES 細胞の H3K27me3 修飾はコントロールと比較して、5 割ほど低下していた一方で、遺伝子間領域では差は認められなかった(図 3-4A)。H3K4me3 修飾では、*Nes* 遺伝子領域において、SelH ロックダウン ES 細胞で減少が認められ、H3K9me3 修飾では、*Sox1* 遺伝子領域において KD1 でのみ減少が認められた。しかし、その他のほとんどの領域において、H3K4me3、H3K9Ac、H3K9me3 修飾は変化が認められなかった。

神経およびグリア細胞マーカー遺伝子の *Ascl1*、*Mtap2*、*Gfap* の遺伝子領域においても、すべての遺伝子領域で SelH ロックダウン ES 細胞の H3K27me3 修飾はコントロールと比較して顕著に減少していた(図 3-4B)。また、H3K4me3 修飾では KD2 において *Ascl1*、*Mtap2* 遺伝子領域で減少、H3K9Ac 修飾では KD2 において *Mtap2*、*Gfap* 遺伝子領域で増加、H3K9me3 修飾では KD1 でのみ *Ascl1* 遺伝子領域でコントロールと比較して減少が認められた。

さらに神経分化に関わる遺伝子以外のバイバレント遺伝子のヒストン修飾も解析したところ、内胚葉分化に関わる *Gata4* および中胚葉分化に関わる *T*、*Kdr* の遺伝子領域においても、SelH ロックダウン ES 細胞で H3K27me3 修飾のコントロールと比較して顕著な減少が認められた(図 3-4C)。また、KD1 でのみ *Kdr* の遺伝子領域の H3K4me3 修飾の低下が認められた。さらに、細胞全体の H3K27me3 修飾をウエスタンブロッティングによって解析したところ、コントロールと比較して変化は認められなかった(図 3-4D)。

以上から、SelH ロックダウンはバイバレント遺伝子領域の H3K27me3 修飾を低下させることが明らかとなった。

セレンウム暴露 ES 細胞の SelH 発現解析

これまでの研究において、ES 細胞における SelH の機能が明らかになった。いくつかの細胞種においてはセレンウムの過剰が一部のセレノプロテインの発現を増加させることが知られている(Stoytcheva ZR and Berry MJ 2009)。そこで、セレンウムと SelH 発現の関係を解析するために、ES 細胞におけるセレンウム暴露によるセレノプロテ

ンの発現を調べた。まず、ES 細胞に 0.1 ppm の濃度のセレンウムを 96 時間暴露し、セレノプロテイン 24 種類の mRNA の発現量を定量 RT-PCR 法で網羅的に解析した。その結果、SelH は ES 細胞において、最も発現の高いセレノプロテインの一つであることが判明した(図 3-5A)。さらに SelH および SelW はその発現量がセレンウム暴露によって 1.3 倍程度上昇することが明らかとなった(図 3-5A)。SelH についてタンパク質量の解析も行ったところ、セレンウム暴露によって SelH タンパク質の 2 倍以上の増加が認められた(図 3-5B)。さらに、セレンウム暴露による ES 細胞マーカー遺伝子の発現を解析したところ、コントロールと比較して差は認められなかった(図 3-5C)。

以上より、セレンウム暴露によって ES 細胞の SelH 発現が増加することが明らかとなった。

考察

第三章では、SelH は ES 細胞からの神経分化を抑制する役割があることが示された。さらに SelH は ES 細胞において、神経分化に関わるバイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾の維持に機能していることが示された。ES 細胞からの神経分化は、神経前駆細胞、神経細胞、グリア細胞と段階をおって分化が起きる (Mohamed Ariff I et al 2012)。今回の結果は特定の分化段階への分化に限らず、解析した全ての分化段階のマーカー発現の促進が認められた。これは、SelH が ES 細胞から神経前駆細胞への過程に関与することを示している。神経前駆細胞マーカーの一つである Ngn1 の強制発現は、ES 細胞から神経前駆細胞への分化を促進し、Tubb3 などの他のマーカー遺伝子発現が促進させることが知られている (Velkey JM and O'Shea KS 2013)。また、ヒト iPS 細胞および ES 細胞において、SMAD signaling の阻害剤を加えることで、高効率に神経前駆細胞分化および神経分化が誘導される (Chambers SM et al 2009)。SelH は神経前駆細胞分化に関わる遺伝子の制御を行うことが示唆される。

H3K27me3 修飾は未分化状態において神経分化誘導遺伝子の発現を抑制しており、神経分化の進行に伴って、これらの遺伝子領域の H3K27me3 修飾は低下する (Bernstein BE et al 2006, Vastenhouw NL and Schier AF 2012)。Jarid2 は PRC2 をターゲット領域にリクルートすると同時に PRC2 のヒストンメチル化活性を阻害する DNA 結合因子である (Shen X et al 2009)。Jarid2 のノックダウン ES 細胞では、バイバレント遺伝子領域の H3K27me3 修飾が増加し、EB 分化の際に、サイズはコントロールよりも増加し、分化マーカー遺伝子の発現開始が 2 日間程度遅れることが報告されている (Shen X et al 2009, Li G et al 2010)。そのため、ES 細胞の、バイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾の低下は逆に神経分化を促進すると考えられる。SelH は ES 細胞において、バイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾に関与することで、神経分化を抑制していることが示唆された。

Eed や Ezh2 のノックアウトにおいては、バイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾は低下するが、神経分化は逆に抑制されることが報告されている (Shen X et al 2008, O'Carroll D et al 2001)。これは、分化条件下において本来 H3K27me3 によって抑制されるべき未分化状態維持に関わる遺伝子群の発現抑制が起こらないために起きる (Shen X et al 2008, O'Carroll D et al 2001)。今回の研究においては、SelH の発現は完全に欠損していないことに加え、ノックダウン効果は ES 細胞時に限定されていた。そのため、SelH ノックダウンは分化開始後の H3K27 メチル化には影響を与えなかったと考えられる。逆に SelH ノックダウンが分化後も継続した場合は Eed ノックアウトのように、神経分化は抑制された可能性もある。また、SelH ノックダウンによって未分化状態における *Nanog* や遺伝子間領域の H3K27me3 修飾は抑制されていないなど、SelH による H3K27me3 修飾への影響はバイバレント遺伝子に選択的である。そのた

め、分化後の *Oct3/4* や *Nanog* 領域の H3K27me3 修飾には、SelH は関与しないことも考えられる。

SelH ノックダウンは未分化の ES 細胞において、神経分化誘導遺伝子のみでなく、同じくバイバレントな修飾を受ける内胚葉や中胚葉分化誘導遺伝子である *Gata4* や *T, Kdr* 領域の H3K27me3 修飾も低下させた。このため、SelH は神経分化に限らず、内胚葉や中胚葉といった他の分化系列においても、H3K27me3 修飾に関与することで ES 細胞の分化能を制御していることが示唆される。一方で、第二章で示されたように、EB 分化においては、SelH ノックダウンによって外胚葉分化は促進され、内胚葉・中胚葉分化は抑制された。H3K27 メチル化酵素である *Ezh2* のノックアウト ES 細胞は全てのバイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾が抑制される(Pasini D et al 2007)。*Ezh2* ノックアウト ES 細胞は分化条件下で、中胚葉の分化は強く抑制されるが、神経分化はほとんど抑制を受けない(Shen X et al 2008, Pasini D et al 2007)。このように、H3K27me3 修飾による分化への影響には胚葉ごとに差異が認められ、バイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾が抑制された状態では、ES 細胞は外胚葉分化に誘導されやすい可能性がある。SelH ノックダウンによる EB 分化過程の内胚葉・中胚葉分化抑制は外胚葉分化促進の結果として相対的に生じたことが考えられる。また、前章で述べたように、SelH ノックダウンは初期の内・中胚葉誘導に必須な *Nodal* の遺伝子発現が低下しており、*Nodal* 発現が EB の胚葉の方向性には重要であった可能性もある。

LCC1 細胞において、SelH は H3K4me3 修飾を行う Mll complex の構成因子である *Rbbp5* との結合が示唆されている(Novoselov SV et al 2007)。H3K4me3 修飾と H3K27me3 修飾は互いに影響を与え合っているため(Schmitges FW et al 2011, Kim DH et al 2013)、第二章で述べたように SelH は Mll complex による H3K4me3 修飾制御を介して H3K27me3 修飾に影響を与えたことが考えられた。しかし、第三章では、一部の遺伝子を除いてバイバレント遺伝子領域の H3K4me3 修飾には変化は認められなかった。そのため、SelH は H3K4me3 修飾を介してではなく、H3K27me3 修飾に直接影響を与えたことが考えられる。PRC2 の構成因子や *Jmjd3* は LCC1 細胞では低発現であり、LCC1 細胞の核タンパク質を用いた解析では、検出できないことはあり得ることである。

Jmjd3 は Jumonji C domain を有するヒストン脱メチル化酵素であり、その強制発現は H3K27me3 修飾を減少させる(De Santa F et al 2007, Hong S et al 2007)。*Jmjd3* は ES 細胞の分化とともに発現量が増加し、ES 細胞における *Jmjd3* ノックアウトは細胞全体の H3K27me3 修飾量を僅かに上昇させ、分化異常を引き起こす(Ohtani K et al 2013)。*Rbbp5* は *Jmjd3* と結合することが報告されている(De Santa F et al 2007)。また、*Jmjd3* は AT hook を有するクロマチンリモデリング因子の *Brg1* と結合することから(Miller SA et al 2010)、AT hook を有し、*Rbbp5* との結合が示唆されている SelH とタンパク質複合体を形成することが考えられる。SelH は *Rbbp5* を介して *Jmjd3*

と結合し、その H3K27me3 脱メチル化活性を抑制することで、バイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾を維持していることが考えられる。

ES 細胞からの神経分化によって、*SelH* mRNA の発現量は分化後に低下したが、タンパク質発現は逆に増加した。これは、*SelH* がタンパク質翻訳段階においても発現量調節を受けており、*SelH* 発現においては必ずしも mRNA 量とタンパク質量が相関しないことを示している。先の報告においても *SelH* mRNA とタンパク質発現量は必ずしも一致していない(Novoselov SV et al 2007)。*SelH* 発現においては転写後の翻訳段階における調節が重要な機能を担っていることを示している。マウス脳発生においても *SelH* mRNA の発現量は発生にしたがって低下した。しかし、培養細胞と同様に、タンパク質レベルでは発現が維持・増加していることが考えられ、神経発生においても *SelH* は重要な機能を持つ可能性がある。今回の研究においては未分化状態における *SelH* ノックダウンの影響のみを解析したが、分化後の機能については、さらに解析をする必要がある。

本研究で ES 細胞の *SelH* 発現はセレンウム暴露によって増加することが明らかとなり、環境中のセレンウム濃度に反応して *SelH* の発現量は増減することが示唆された。生体内のセレンウム濃度はセレンウム摂取量によって変化するため、セレンウム摂取量が、*SelH* 発現量の変化を通じて、発生期や成体中の幹細胞の分化能に影響を与える可能性がある。

第二章において、*SelH* は *Nanog*、*Dppa3*、*Nodal* の発現制御を行うことが明らかとなったが、セレンウム暴露 ES 細胞では、*SelH* 発現の増加は認められたが、多分化能関連遺伝子発現の変化は認められなかった。これは *SelH* 発現量の変化が、第二章におけるノックダウンや強制発現に比べて小さかったためである可能性がある。また、セレンウム暴露においては、他のセレノプロテインなど *SelH* 以外の影響も考えられる。

今回の結果では、*SelH* だけでなく、*SelW* も ES 細胞で発現が高く、セレンウム暴露で発現が増加することが示された。*SelW* は骨格筋や脳、心臓で発現が高く(Stoytcheva ZR and Berry MJ 2009)、グルタチオンとの結合能をもち、強制発現で過酸化水素による酸化ストレスに耐性を示すことから、抗酸化作用を持つと想定されている(Beilstein MA et al 1996, Jeong Dw et al 2002)。一方で最近の研究では、前立腺上皮細胞において *SelW* のノックダウンが p53 および p21 経路の増殖抑制を引き起こすことが報告されており、抗酸化機能以外の機能も有することが明らかとなった(Hawkes WC et al 2012)。セレンウム暴露 ES 細胞においては、*SelH* の影響だけでなく、*SelW* の影響も考慮する必要がある。

以上第三章では、*SelH* は ES 細胞でバイバレント遺伝子領域の H3K27me3 修飾の成立、維持を行うことが示され、その H3K27me3 修飾制御能によって ES 細胞の分化に重要な役割を果たすことが示唆された。さらに、*SelH* 発現はセレンウム濃度に依存していることも示唆された。

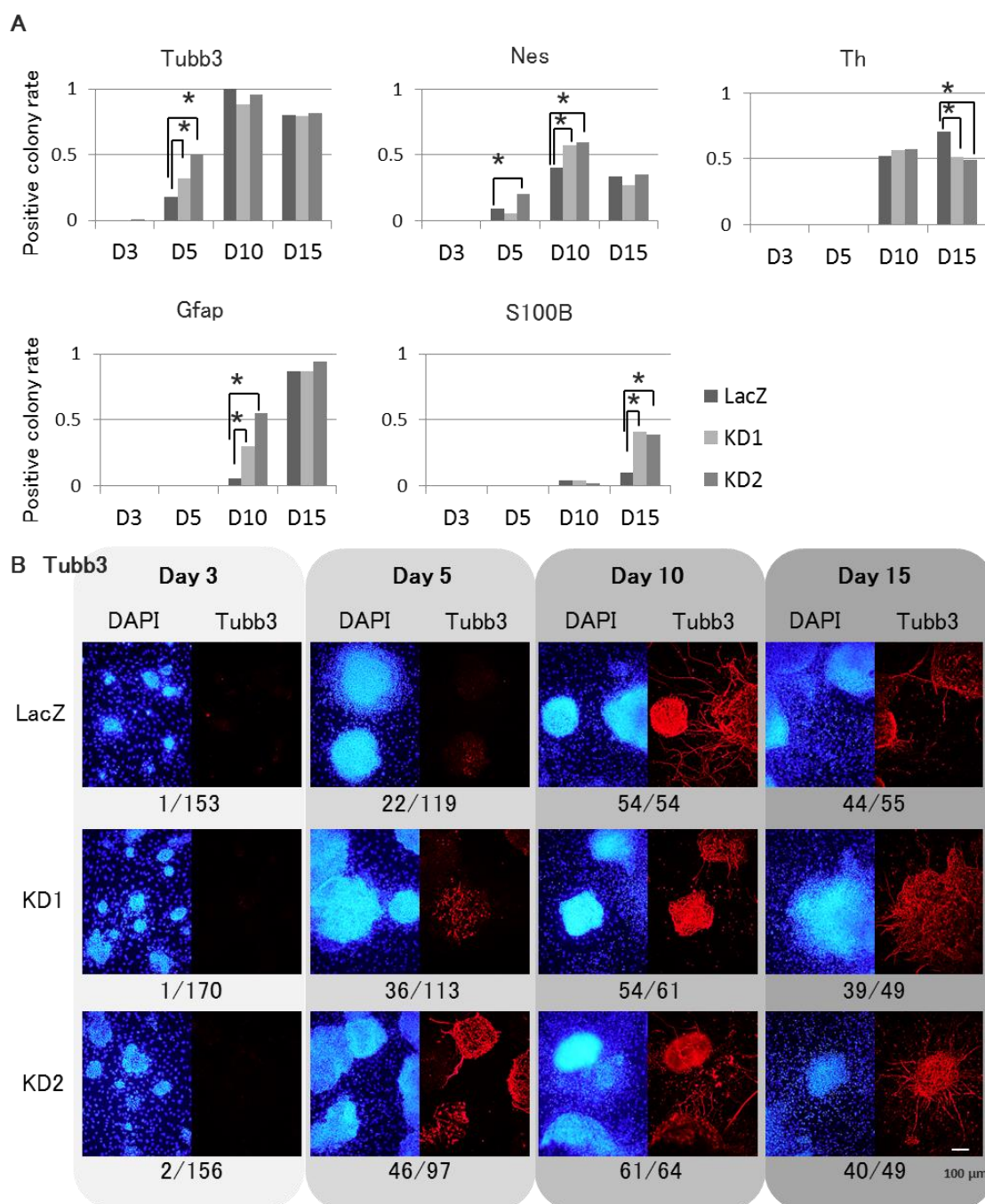


図3-1 SelHノックダウンES細胞の神経分化

A) 発現コロニーの割合: 神経分化したSelHノックダウンES細胞について、神経分化マーカータンパク質を発現するコロニーの割合をグラフとして表した。D3、D5、D10、D15はそれぞれ、分化開始3日目、5日目、10日目、15日目のサンプルを表す。検定はカイニ乗検定で行った。*は $p < 0.05$ を表す。エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

B) 神経分化マーカーの発現: SelHノックダウンES細胞を神経分化誘導し、分化開始3日目、5日目、10日目、15日目に神経前駆細胞マーカーのTubb3の発現を蛍光免疫染色法で解析した。写真下の値は対象タンパク質を発現するコロニーの割合を表す。スケールバーは100 μ mを表す。

LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。

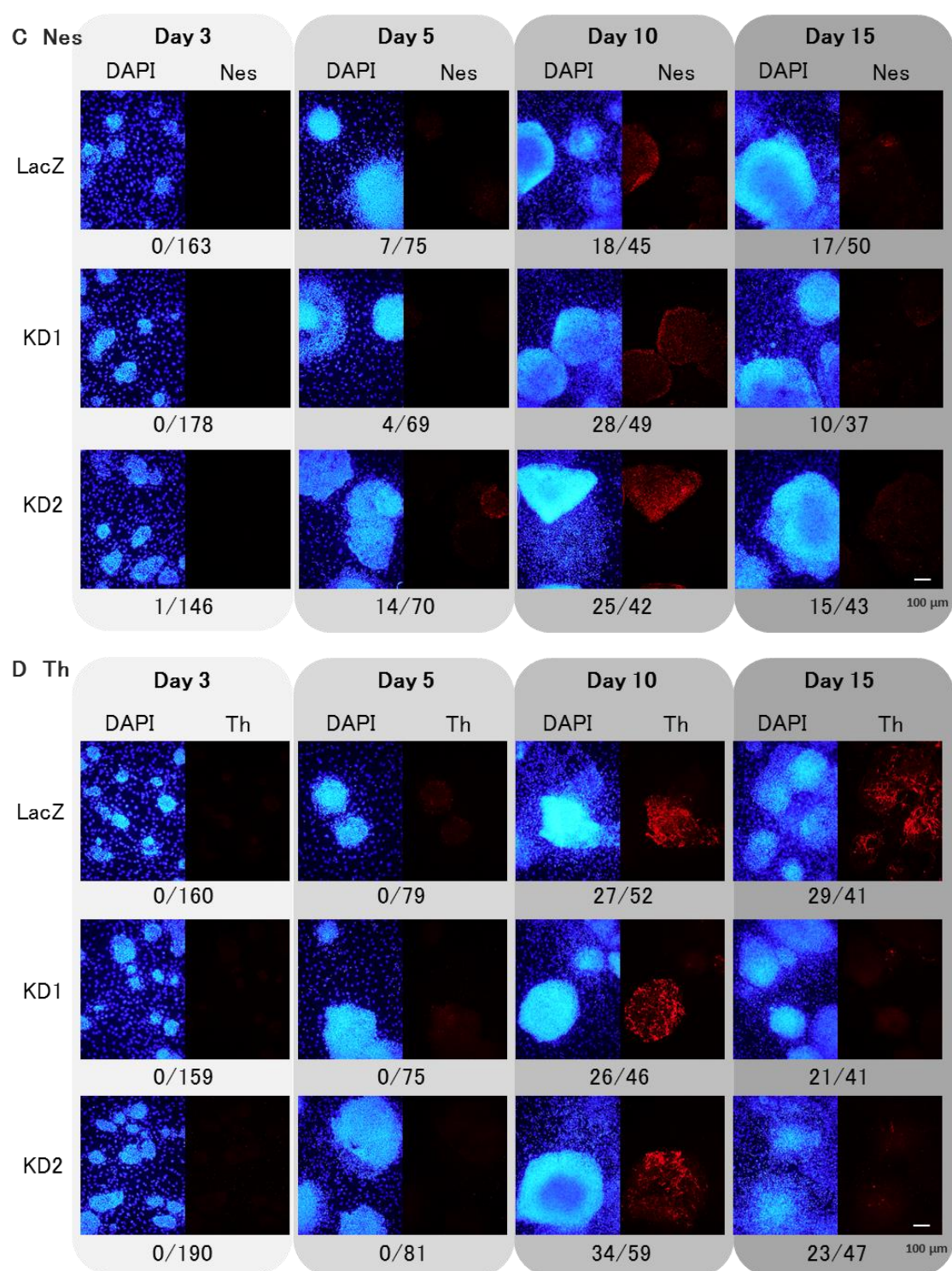


図3-1 SelHノックダウンES細胞の神経分化

C) 神経前駆細胞マーカーのNesの発現を蛍光免疫染色法で解析した。

D) 神経細胞マーカーのThの発現を蛍光免疫染色法で解析した。

LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。写真下の値は対象タンパク質を発現するコロニーの割合を表す。スケールバーは100 μmを表す。

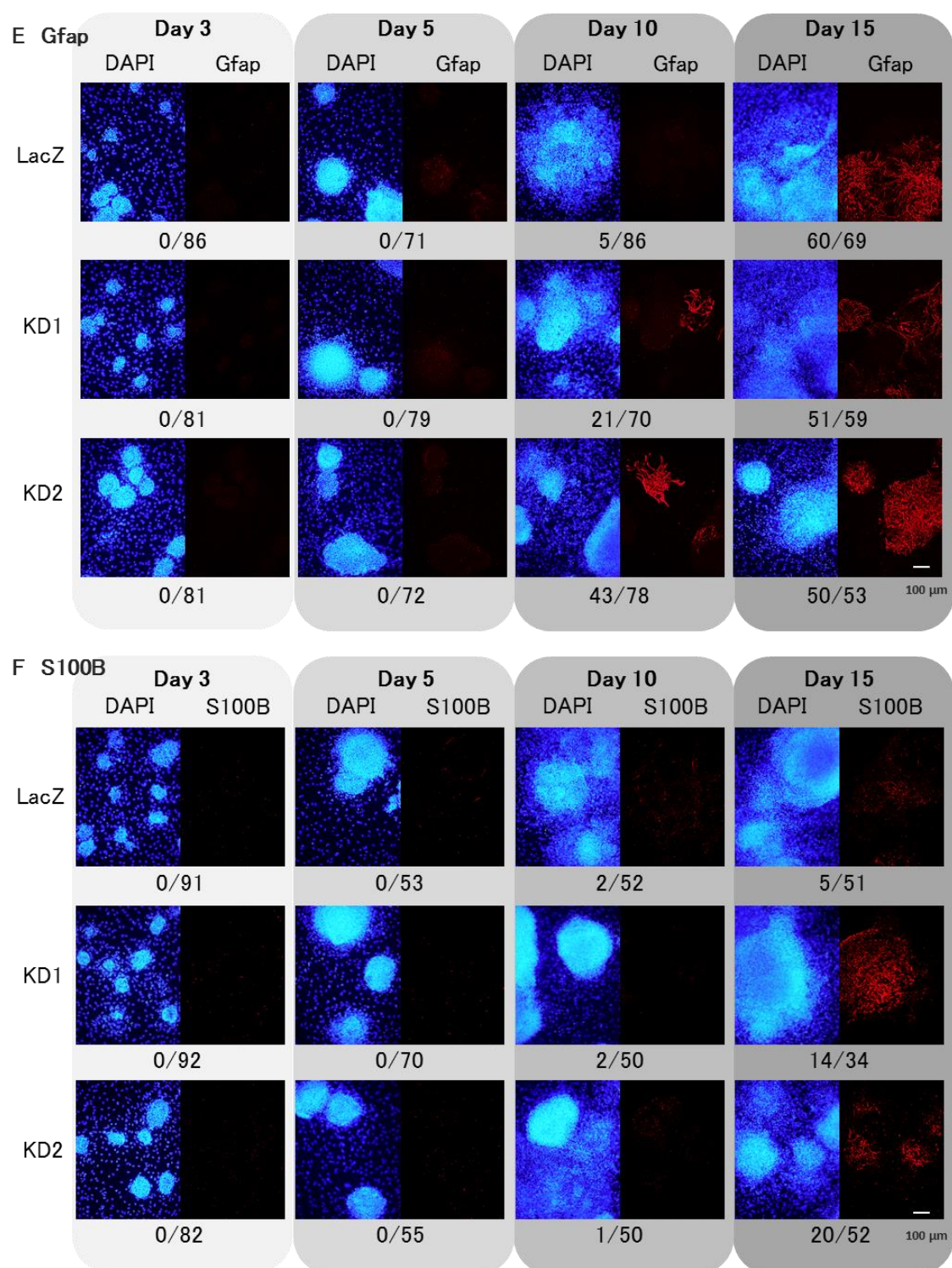


図3-1 SelHノックダウンES細胞の神経分化

E) グリア細胞マーカーのGfapの発現を蛍光免疫染色法で解析した。

F) グリア細胞マーカーのS100Bの発現を蛍光免疫染色法で解析した。

LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。写真下の値は対象タンパク質を発現するコロニーの割合を表す。スケールバーは100 μ mを表す。

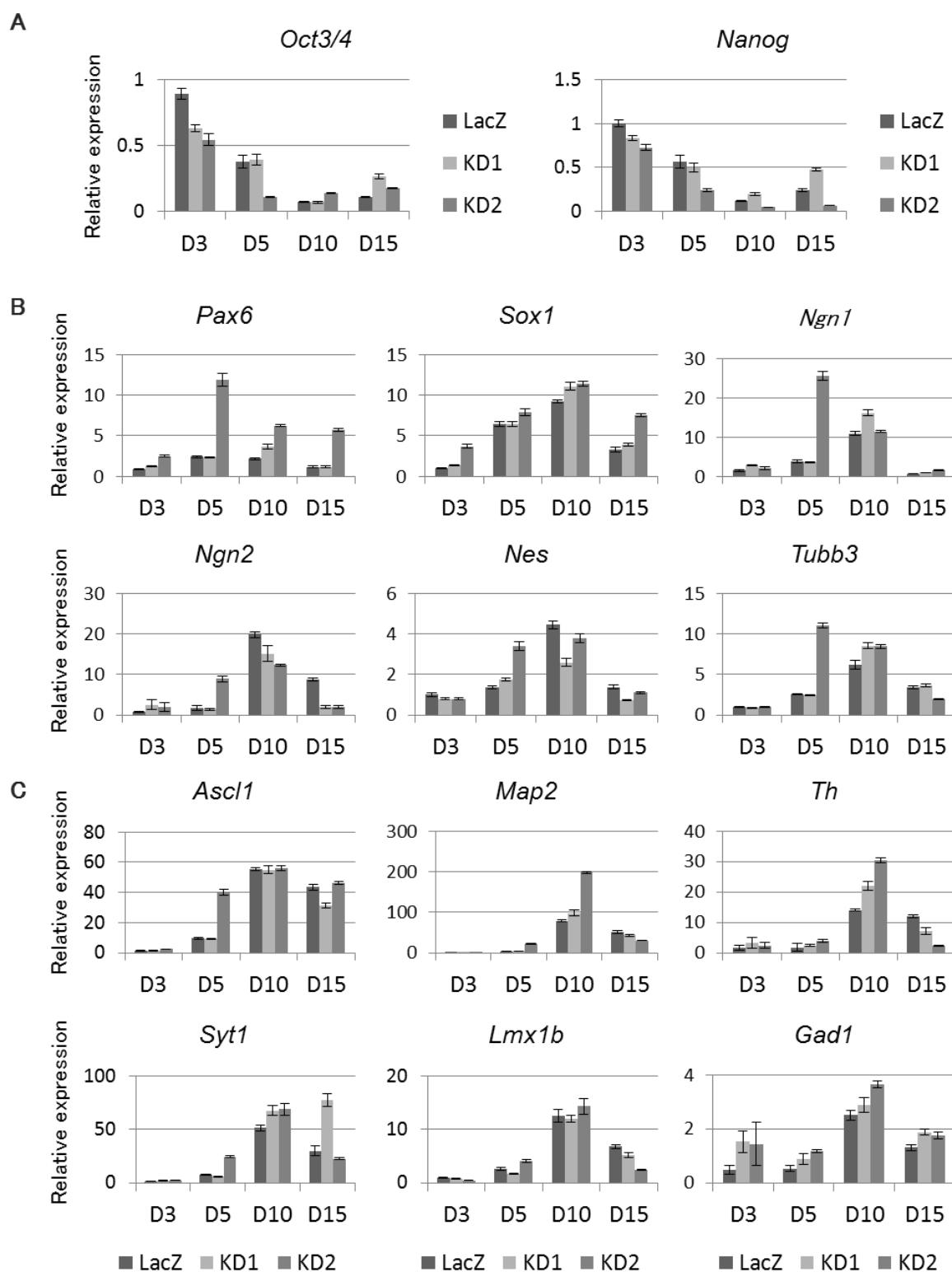


図3-2 神経分化SelHノックダウンES細胞のマーカー遺伝子発現
(次項へ続く)

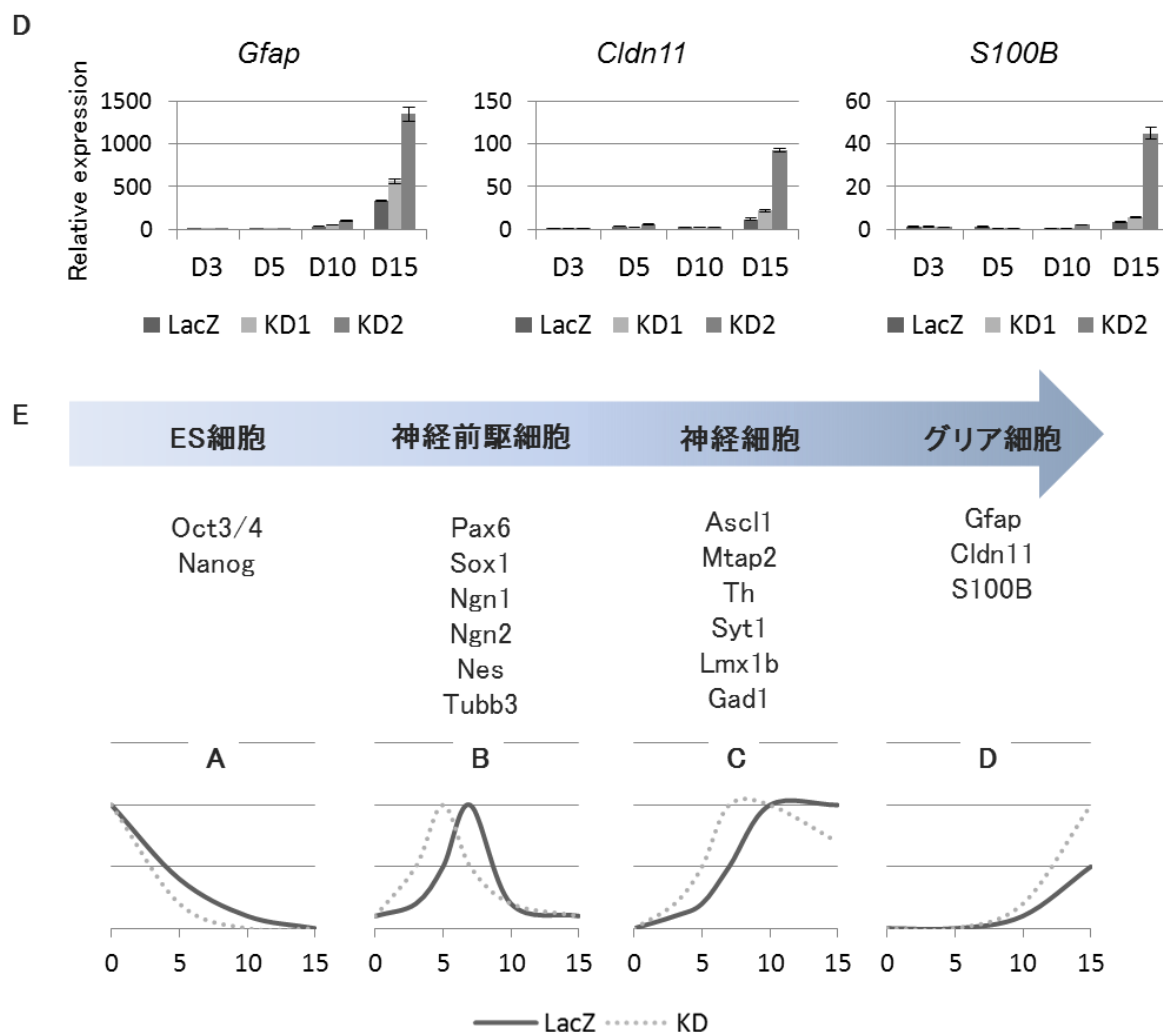


図3-2 神経分化SelHノックダウンES細胞のマーカー遺伝子発現

A-D) 神経分化マーカー遺伝子のmRNA発現: 神経分化誘導したSelHノックダウンES細胞の神経分化マーカー遺伝子の発現を定量RT-PCRで解析した。Aは未分化マーカー遺伝子、Bは神経前駆細胞マーカー遺伝子、Cは神経細胞マーカー遺伝子、Dはグリア細胞マーカー遺伝子をそれぞれ解析した。D3、D5、D10、D15はそれぞれ、分化開始3日目、5日目、10日目、15日目のサンプルを表し、分化3日目のコントロールの発現量を1とした時の相対的な遺伝子発現を表す。LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

E) SelHノックダウンES細胞の神経分化マーカー遺伝子発現パターンを図で表す。中段はマーカー遺伝子、下段は各マーカー遺伝子のコントロール細胞(LacZ)とSelHノックダウン細胞(KD)の発現量の推移を一般化して表したグラフ。横軸は時間の経過を表す。

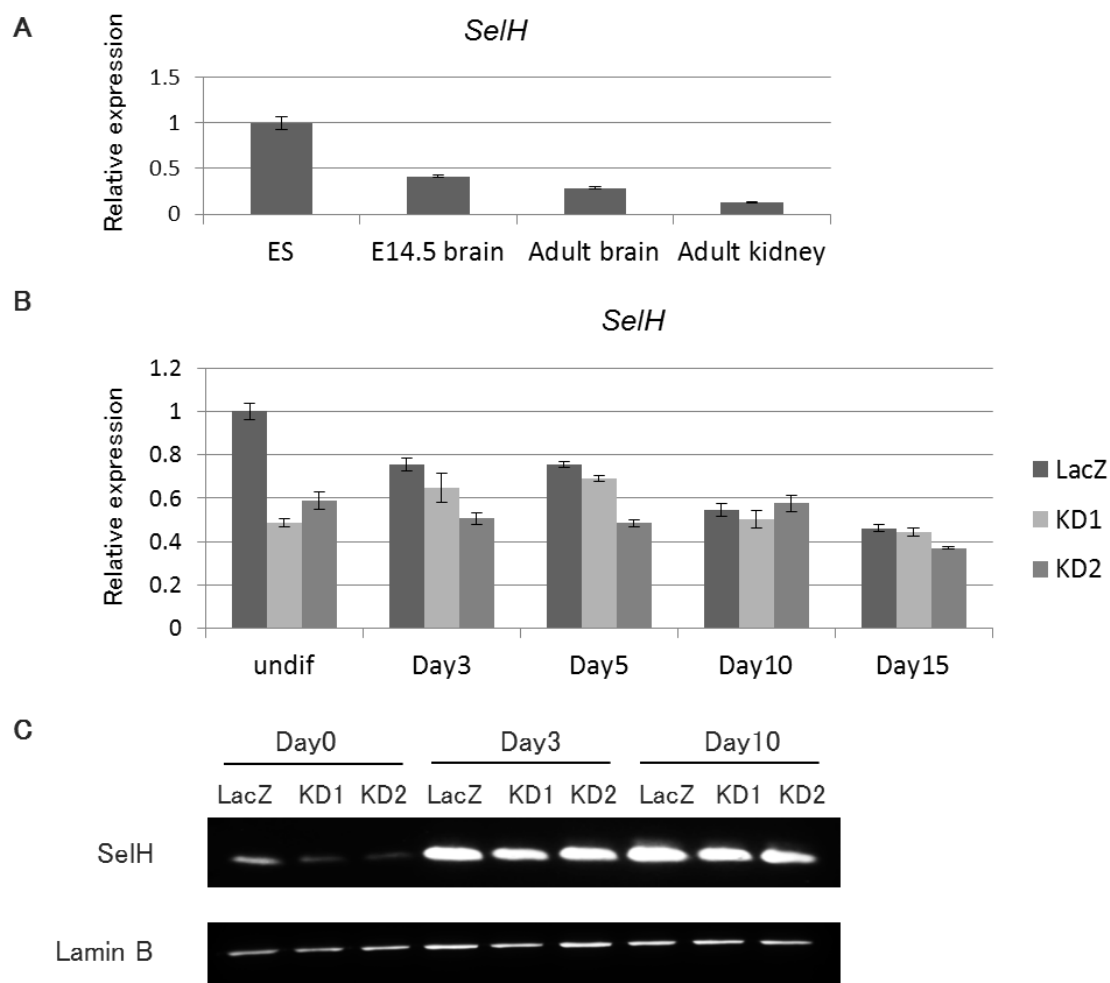


図3-3 神経分化の*SelH*発現

A) 定量RT-PCRによって発生段階における*SelH*mRNA発現量を解析した。ESはES細胞、E14.5 brainは14.5日胚期の胎児大脳、Adult brainは成体マウスの大脳、Adult kidneyは成体マウスの腎臓を表す。

B) 神経分化誘導した*SelH*ノックダウンES細胞の*SelH*mRNA発現量を定量RT-PCRで解析した。

C) 神経分化誘導した*SelH*ノックダウンES細胞の*SelH*タンパク質発現量をウエスタンブロッティングで解析した。

Day3、Day5、Day10、Day15はそれぞれ、分化開始3日目、5日目、10日目、15日目のサンプルを表し、undifは未分化状態のES細胞を表す。未分化状態のコントロールの発現量を1とした時の相対的な遺伝子発現を表す。LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2は*SelH*ノックダウンES細胞を表す。エラーバーは標準誤差 (SE)を表す。

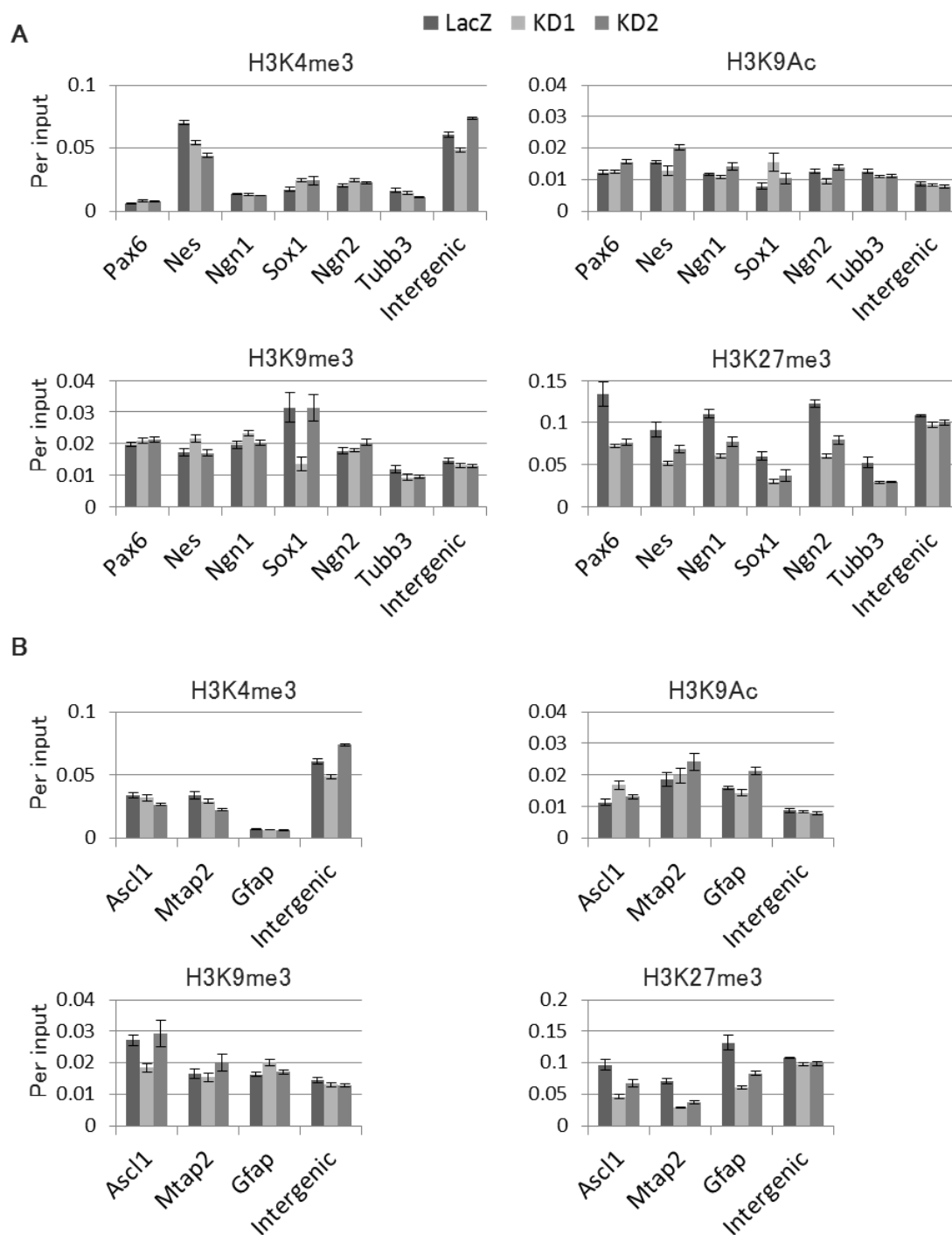


図3-4 SelHノックダウンES細胞のヒストン修飾

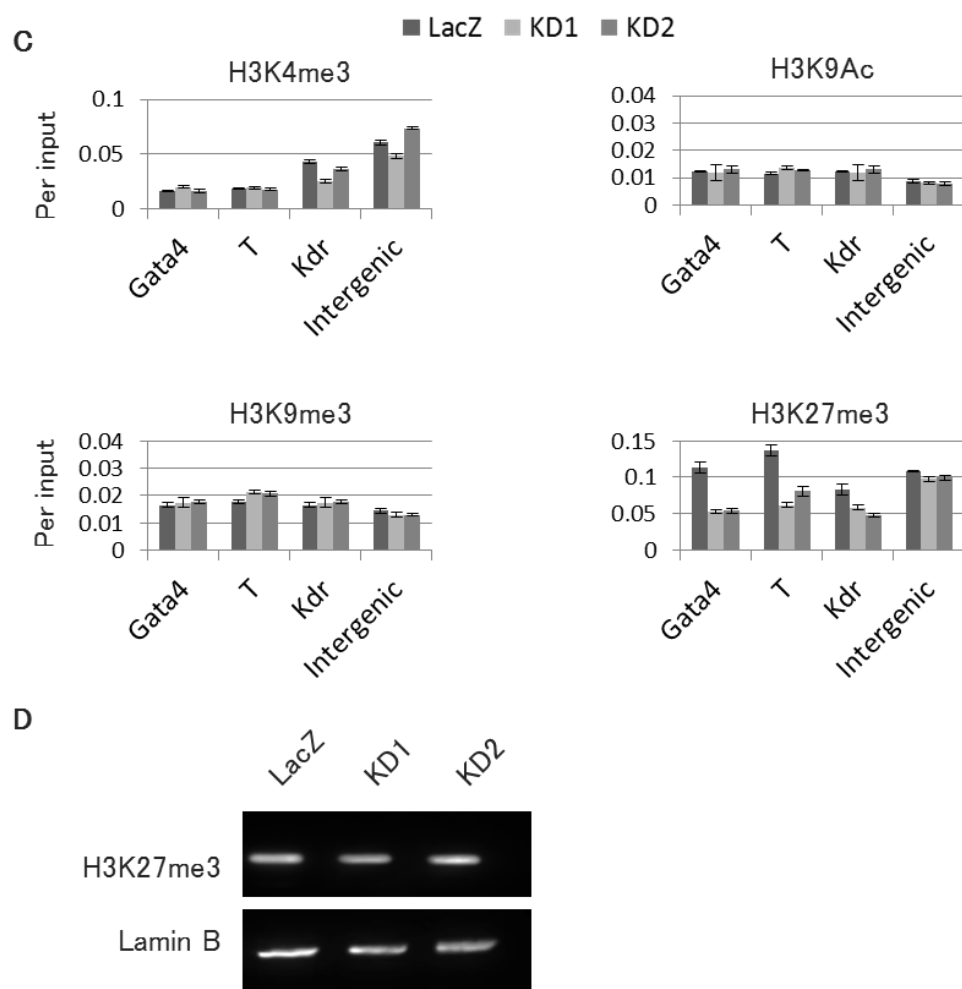


図3-4 SelHノックダウンES細胞のヒストン修飾

A-C) ChIPによるヒストン修飾解析: 未分化状態のSelHノックダウンES細胞のヒストンH3K4me3, H3K9Ac, H3K9me3, H3K27me3修飾をChIP法で解析した。Aは神経前駆細胞マーカー遺伝子、Bは神経およびグリア細胞マーカー遺伝子、Cは神経分化以外のバイバレント遺伝子。Intergenicはコントロールとして解析した遺伝子間領域を表す。エラーバーは標準誤差(SE)を表す。

D) 全ヒストンのH3K27me3: 未分化状態のSelHノックダウンES細胞の全ヒストンのH3K27me3修飾をウエスタンブロッティングで解析した。サンプルには核タンパク質を用いた。LacZはコントロールES細胞を表し、KD1・KD2はSelHノックダウンES細胞を表す。

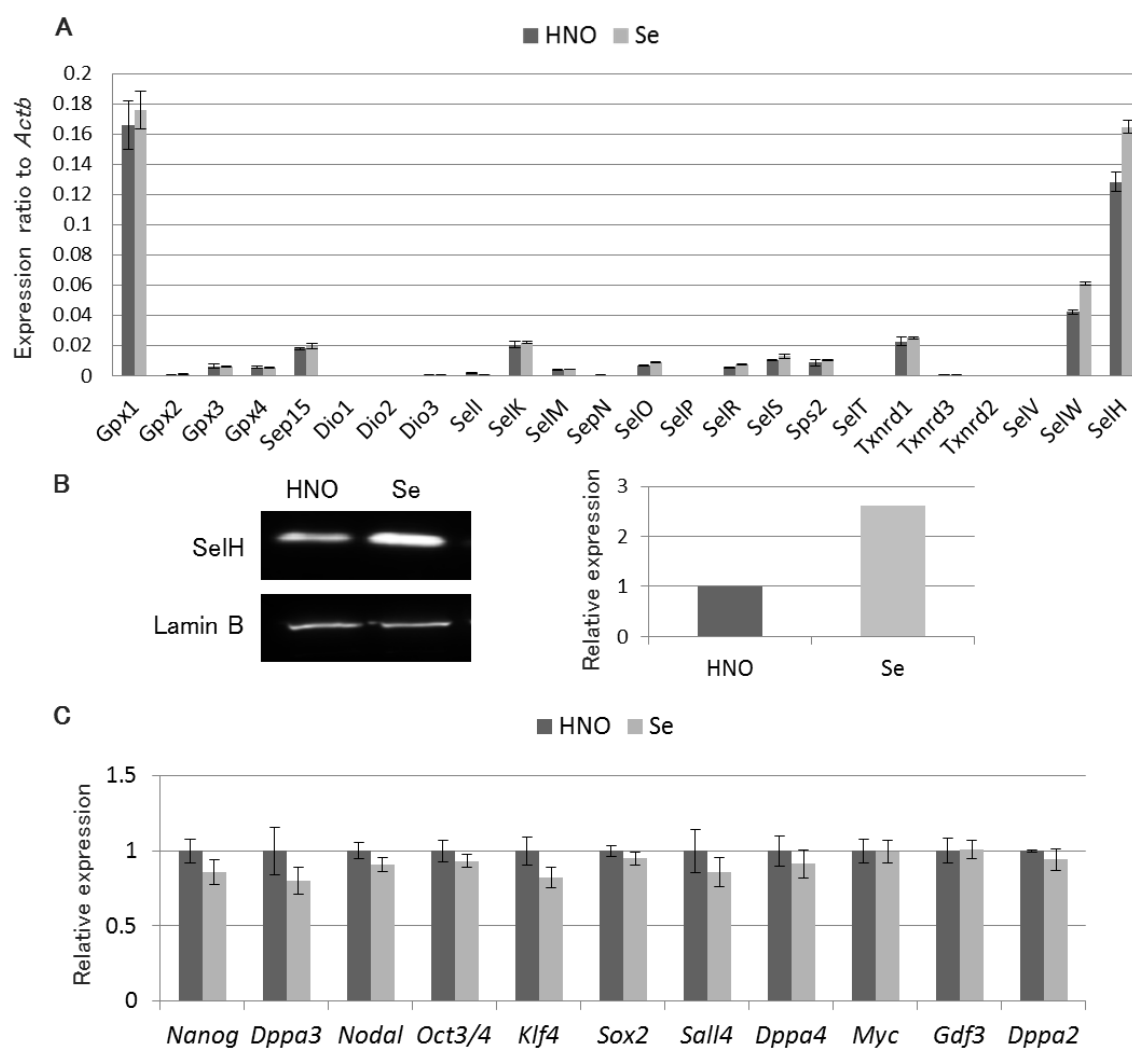


図3-5 セレニウム暴露ES細胞のセレノプロテイン発現

- A) セレノプロテインのmRNA発現: 0.1 ppmのセレニウムに96時間暴露したES細胞の各セレノプロテインの発現を解析した。縦軸は*Actb*の発現量に対する相対的な発現量を表す。
- B) SelH発現: セレニウム暴露ES細胞のSelHタンパク質発現量をウエスタンブロッティングで解析した。右グラフはバンドを画像解析し、SelHの発現をLamin Bで割って発現量を定量した。コントロールの発現量を1とした際の相対的発現量を表す。
- C) セレニウム暴露ES細胞のES細胞マーカー遺伝子発現を定量的RT-PCRで解析した。エラーバーは標準誤差(SE)を表す。
- Seはセレニウム暴露ES細胞を表し、HNOはコントロールの溶媒(HNO₂)暴露細胞を表す。

総合討論

総合討論

第一章で SelH がヘテロクロマチン構造に関与することが示され、第二章では多分化能関連遺伝子のエピジェネティック状態への関与が示された。そして、第三章では、バイバレント遺伝子のヒストン H3K27me3 修飾の維持に関わることが示された。これらのことから、SelH は ES 細胞において、エピジェネティック状態を制御することで、多分化能を維持することが示された。

バイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾は幹細胞および胚発生の特定細胞系列への運命決定に極めて重要なエピジェネティック修飾であり、その破綻は分化異常を引き起こす (Pasini D et al 2004)。H3K27me3 修飾は未分化状態において、分化誘導遺伝子の発現を抑制して未分化状態を保ち、分化後に特定の細胞系列の分化誘導遺伝子のみ脱メチル化されることでその分化を誘導する (Vastenhouw NL and Schier AF 2012)。SelH は幹細胞および胚発生において、H3K27me3 修飾を介して、分化の方向性およびタイミングを調節する役割を有しており、正常な胚発生には適切な発現量の SelH が重要であると言える。

グルタチオン合成酵素阻害薬を与えたラット肝臓では、*cmyc* 領域のヒストン H3 のアセチル化状態が増加することが知られている (Torres L et al 2009)。また慢性閉塞性肺疾患の喫煙者の肺における研究において、たばこによる反応性酸素生成物が NFκB のヒストン H3 と H4 のアセチル化を増加させるなど (Rajendrasozhan S et al 2009, Escobar J et al 2012)、グルタチオンとエピジェネティクス修飾との関わりは、いくつかの報告がされている (García-Giménez JL et al 2013)。これまでの研究において SelH は、グルタチオンの還元作用を持ち、抗酸化機能をもつことが明らかになっている (Novoselov SV et al 2007, Panee J et al 2007)。そのため、SelH はそのセレノシステインによる抗酸化作用で、ヒストン修飾に影響を与えた可能性が存在する。しかし一方で、非常に興味深いことにセレノシステインをシステインに変換した変異型 SelH の発現実験から、SelH の多分化能維持に関わる遺伝子の発現調節機能においては、セレニウムは必ずしも必要でないことが示された。これまでのセレノプロテインと異なり、SelH の機能においては、セレニウムはセレノシステインとしての機能ではなく、SelH の発現調節因子として重要な機能を持つと言える。このため、SelH が CXXU motif による抗酸化とは異なる機能で、エピジェネティック制御を行っていることが示唆される (図 4A)。

SelH は Rbbp5 との結合が示唆されており (Novoselov SV et al 2007)、Rbbp5 はヒストン H3K27 の脱メチル化酵素 Jmjd3 と結合する。そのため SelH は Jmjd3 に作用して、H3K27me3 の脱メチル化を抑制することで、H3K27me3 修飾の維持を行っていることが考えられる。Jmjd3 は Jumonji domain を有する H3K27 脱メチル化酵素である (Hong S et al 2007)。Jmjd3 は ES 細胞の分化とともに発現量が増加し、未分化状態で抑制されていたバイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾を脱メチル化して、遺伝子発

現を誘導することで分化を誘導する(Dahle Ø et al 2010, Kartikasari AE et al 2013, Ohtani K et al 2013)。内胚葉分化において、Jmjd3 は分化開始後に転写因子 Tbx3 や Smad3 によってターゲット領域にリクルートされる(Dahle Ø et al 2010, Kartikasari AE et al 2013)。分化後と比較すると少ないとはいえ、ES 細胞の未分化状態においても Jmjd3 は存在している(Ohtani K et al 2013)。しかし、複数の ChIP 解析から、未分化状態で Jmjd3 は分化後のターゲット領域にアクセスできていない(Dahle Ø et al 2010, Kartikasari AE et al 2013, Ohtani K et al 2013)。SelH は Jmjd3 のターゲット領域へのアクセスを阻害することで H3K27me3 修飾を維持している可能性がある(図 4B)。

SelH の有する AT hook は AT リッチな配列を認識して結合することが知られている(Aravind L and Landsman D 1998)。一方で、バイバレント遺伝子の多くは転写開始点近傍に CpG リッチな領域(CpG アイランド)を有しており、その H3K4me3 と H3K27me3 修飾は CpG アイランドにおいて存在することが多い(Ku M et al 2008)。PRC2 のリクルート因子と想定されている Jarid2 の持つ Jumonji/ARID ドメインや Aebp2 は CpG や GAGA モチーフがリッチな配列を認識して DNA と結合する(Kim H et al 2009, Peng JC et al 2009)。今回、SelH ノックダウンによって H3K27me3 修飾の低下が認められた領域も多くが CpG アイランドの中に存在し、その AT 比率は低い。そのため、これらの領域の H3K27me3 修飾に対して、SelH は直接その領域に結合することで修飾に影響を与えるのではなく、その周辺領域などに結合し、間接的にヒストン修飾に影響を与える可能性がある。Jmjd3 は、*Eomes* 領域においては、転写開始点から 7000 bp ほど上流のエンハンサー領域に結合することで、転写開始点近傍の H3K27me3 を脱メチル化することが知られている(Dahle Ø et al 2010)。

SelH の mRNA は分化にしたがって発現量が低下していくが、神経分化後にタンパク質の発現量は増加することが明らかになった。そのため、今回の実験においては、SelH ノックダウン効果は未分化状態でしか認められず、解析はできなかったが、神経分化開始後においても SelH は機能を持つと考えられる。H3K27me3 修飾は未分化時の発現抑制のみでなく、分化開始後も重要な役割を持つ。分化開始後、ES 細胞で未分化状態を維持する Oct3/4 や Nanog は H3K27me3 修飾によって発現抑制を受ける。また、特定の細胞系列以外のバイバレント遺伝子の H3K27me3 修飾は維持されることで、発現抑制され続ける。Jmjd3 の発現は分化後に増加するため、SelH は分化開始後に発現量を増加させることで、増加した Jmjd3 から他系列の分化誘導遺伝子の H3K27me3 修飾を保護し、発現を抑制し続ける役割を果たす可能性がある。また、神経前駆細胞からの神経細胞およびグリア細胞への分化能もエピジェネティックな制御を受けている。初期神経前駆細胞においては、グリア細胞分化誘導遺伝子は H3K27me3 修飾によって抑制されているが、後期神経前駆細胞においてはその H3K27me3 修飾が低下することで、グリア細胞への分化が誘導される(Mohamed Ariff I et al 2012, Rowitch DH and

Kriegstein AR 2010)。ゼブラフィッシュの発生においては、SelH mRNA は神経系に発現が持続するという報告もあり(Thisse C et al 2003)、SelH は H3K27me3 修飾を調節することで、初期胚の未分化細胞や神経前駆細胞における分化能制御においても重要な役割を果たすと考えられる。

進行性の乳がんにおいて PRC2 の構成因子である EZH2 の発現は高く、その増加はがん細胞の増殖能を高める(Bachmann IM et al 2006, Kunju LP et al 2011)。EZH2 は H3K27me3 修飾によって RUNX3 などのがん抑制遺伝子発現を抑制することで、がん細胞の増殖に関与している(Fujii S et al 2008)。SelH はがん細胞においても高発現であることを考えると(Novoselov SV et al 2007)、SelH はがん抑制遺伝子の H3K27me3 修飾に関与することで、増殖を促している可能性がある。一方、セレンウムとがんの関係においては、セレンウム摂取ががん発生率と致死率を低下させるという報告がある(Clark LC et al 1996)。セレンウム暴露は SelH 発現を増加することが示されており、がん細胞において SelH は H3K27me3 修飾とは異なる働きをもつことも考えられる。

セレノプロテインの発現はしばしば mRNA の発現量とタンパク質の発現量が異なることが報告されている(Lu J and Holmgren A 2009)。神経分化において、分化に伴って SelH の mRNA 発現は低下したが、タンパク質発現は逆に増加が認められた。また、ES 細胞におけるセレンウム暴露実験では、SelH 発現の増加が認められたが、mRNA 発現の増加は 1.3 倍程度であったのに対して、タンパク質の増加量は 2 倍以上であった。これは ES 細胞の SelH 発現においては mRNA からタンパク質への翻訳において、調整が起きていることを示唆している。通常の培養条件における ES 細胞においては多くの SelH mRNA が翻訳されずに分解されており、逆に神経細胞においては mRNA が効率よくタンパク質へと翻訳されていると考えられる。これは通常の ES 細胞の培養条件においてセレンウムは不足状態にあり、ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構による SelH mRNA の分解によって、SelH のタンパク質への翻訳効率が低い状態であることが考えられる。今回の実験では、培養液中のセレンウム濃度の増加によって、mRNA の発現増加に加え、翻訳効率の上昇も起きたことでタンパク質発現の大幅な増加が起きたと考えられる。従って、培養液中のセレンウム濃度のわずかな変化が、SelH 発現の変化を介して ES 細胞の分化能を変化させる可能性がある。

ES 細胞の培養にはウシ胎児血清を用いる。ウシ胎児血清中のセレンウム濃度はおよそ 10 ppb 程度とされるが、ウシ血清中のセレンウム濃度は給餌によって変化する(Perry TW et al 1978)。また、代表的な血清代替物を用いた ES 細胞用の培地ではセレンウム濃度はおよそ 58 ppb である(特許公報 2001-508302)。また、別の血清代替物を用いた ES 細胞の培養法である Mek と GSK3 の 2 つのキナーゼの阻害剤を加えた培養環境では、バイバレント遺伝子における H3K27me3 修飾の低下が認められるという報告もある(Marks H et al 2012)。分化能制御能を有する SelH の発現調節因子としてのセレンウムの機能を考えると、ES 細胞の培養においては、血清中のセレンウム濃度に

十分に注意を払う必要があると言える。

セレノシステインは通常は終止コドンである UGA によってコードされているという特異な性質を持つために、これまでのセレノプロテインの研究においては、セレノシステインの取り込み機構の解明に力が注がれてきた。セレノシステインを含むタンパク質の強制発現が困難であることからその機能解析は遅れてきたと言わざるを得ない。さらに、過去進められてきた機能解析においてもセレノプロテインの研究は **Glutathione Peroxidases(Gpx)**や **Thioredoxin Reductases(TR)**などの抗酸化作用を持つタンパク質の研究が先行してきた。本研究は、セレノプロテインの新しい機能としてエピジェネティック調節という新たな視点を提供した。

本研究はセレンウムの機能という面においても重要である。セレンウムの一日所要量(RDA)は 0.055 mg/day、無毒性量(NOEL)は 0.85 mg/day であり、その安全域は非常に狭い(Goldhaber SB 2003)。セレンウムは様々な食品や飲料に広く含まれる身近な物質であるが、その初期発現に与える影響に関しては、ほとんど知られていない。SelH 発現にはセレンウムが必須であり、その濃度によって発現量は制御される。そのため、今回明らかになった SelH の機能は生体におけるセレンウムの機能でもある。この結果はセレンウムの SelH を介したヒストン H3K27me3 修飾調節という新たな機能を示すとともに、胚発生期におけるセレンウム濃度が正しく維持されることの重要性を示唆するものである。また、セレンウムのエピゲノムや長期・持続的な影響の少なくとも一部は SelH を介していることを示唆している。厚生労働省「日本人の食事摂取基準」(2010 年版)によると、日本人の平均セレンウム摂取量は 0.1 mg/day であり、食事から十分に摂取できているとされているが、近年セレンウムは抗老化作用を有するとしてサプリメントとしても販売されており、その過剰摂取が懸念される。また、妊娠期のセレンウム濃度に関する研究はほとんどなく、十分な注意が必要であるとともに今後の研究が待たれる。

本研究から、SelH はエピジェネティック制御能を有しており、幹細胞の分化能に重要であることが明らかとなった。SelH はヒストン H3K27me3 修飾の維持を通じて、分化能を制御するエピジェネティック因子であると考えられる。今回の研究を通じて、幹細胞のエピジェネティック制御機能のさらなる解明と、そこに果たす環境因子セレンウムの役割の解明につながることを期待される。

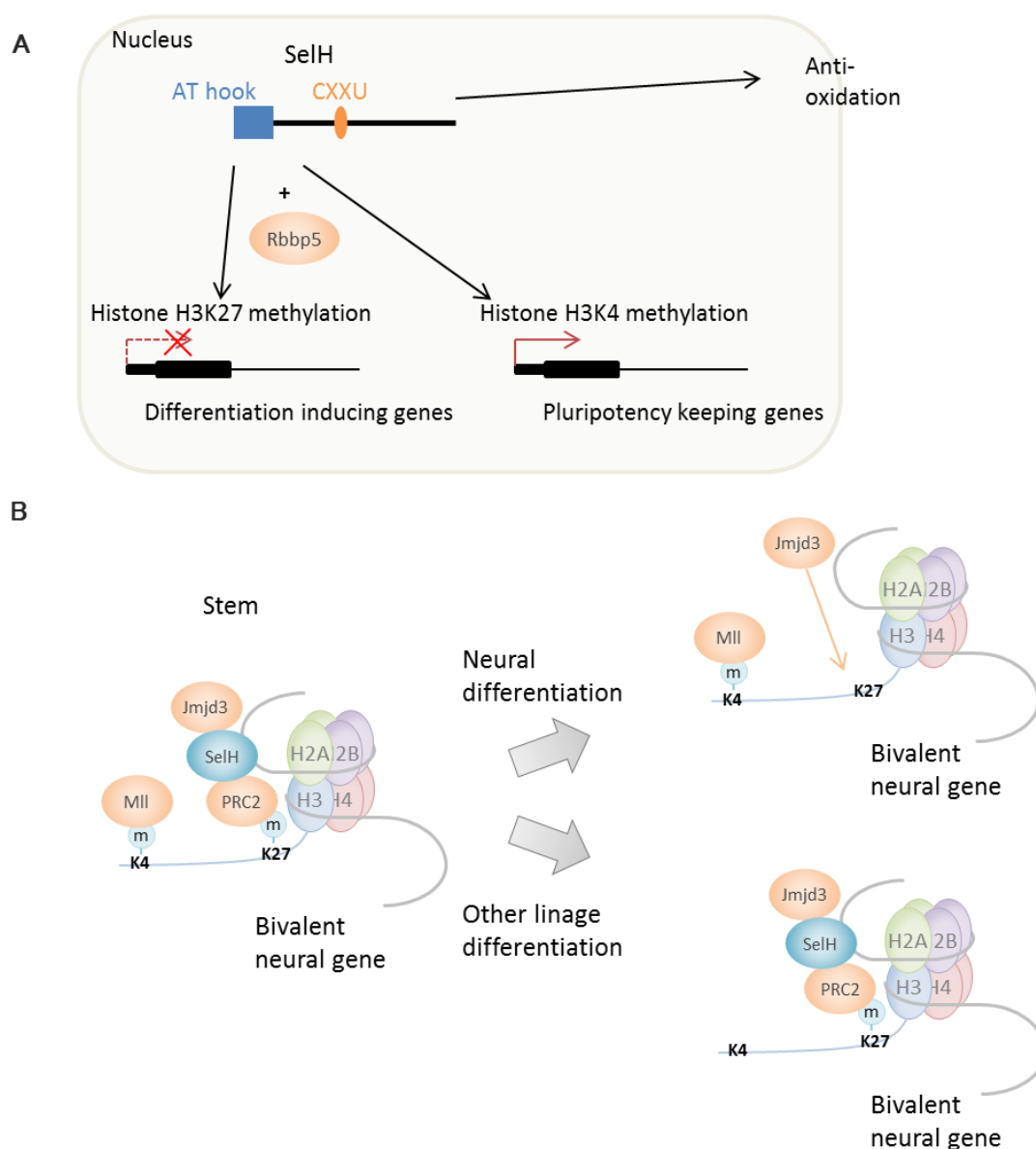


図4 想定されるSelHの機能

A) SelHは抗酸化作用のみでなく、核内においてHistone H3K4およびH3K27のメチル化修飾に関与することが明らかとなった。

B) 神経分化関連バイバレント遺伝子領域のヒストン修飾における予想される機能: 未分化状態のES細胞においては、Jmjd3を阻害することでH3K27me3修飾の維持を行い、発現を抑制する。一方、神経分化後は、SelHが領域からなくなることで、Jmjd3によるヒストンH3K27の脱メチル化が起き、発現が誘導される。また、神経以外の細胞系列への分化後は、SelHは維持され、H3K27me3修飾の維持を行う。

引用文献

- Allen MD, Grummitt CG, Hilcenko C, Min SY, Tonkin LM, Johnson CM, Freund SM, Bycroft M, Warren AJ. Solution structure of the nonmethyl-CpG-binding CXXC domain of the leukaemia-associated MLL histonemethyltransferase. *EMBO J.* 4503-12. (2006)
- Aloia L, Di Stefano B, Di Croce L. Polycomb complexes in stem cells and embryonic development. *Development.* 2525-34. (2013)
- Amsterdam A, Nissen RM, Sun Z, Swindell EC, Farrington S, Hopkins N. Identification of 315 genes essential for early zebrafish development. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 12792-7 (2004)
- Ang YS, Tsai SY, Lee DF, Monk J, Su J, Ratnakumar K, Ding J, Ge Y, Darr H, Chang B, Wang J, Rendl M, Bernstein E, Schaniel C, Lemischka IR. Wdr5 mediates self-renewal and reprogramming via the embryonic stem cell core transcriptional network. *Cell.* 183-97. (2011)
- Angelov D, Molla A, Perche PY, Hans F, Côté J, Khochbin S, Bouvet P, Dimitrov S. The histone variant macroH2A interferes with transcription factor binding and SWI/SNF nucleosome remodeling. *Mol Cell.* 1033-41. (2003)
- Angelov D, Bondarenko VA, Almagro S, Menoni H, Mongélard F, Hans F, Mietton F, Studitsky VM, Hamiche A, Dimitrov S, Bouvet P. Nucleolin is a histone chaperone with FACT-like activity and assists remodeling of nucleosomes. *EMBO J.* 1669-79. (2006)
- Arai Y, Ohgane J, Yagi S, Ito R, Iwasaki Y, Saito K, Akutsu K, Takatori S, Ishii R, Hayashi R, Izumi S, Sugino N, Kondo F, Horie M, Nakazawa H, Makino T, Shiota K. Epigenetic assessment of environmental chemicals detected in maternal peripheral and cord blood samples. *J Reprod Dev.* 507-17. (2011)
- Aravind L, Landsman D. AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 4413-21. (1998)
- Arnér ES. Selenoproteins-What unique properties can arise with selenocysteine in place of cysteine? *Exp Cell Res.* 1296-303. (2010)

- Azuara V, Perry P, Sauer S, Spivakov M, Jørgensen HF, John RM, Gouti M, Casanova M, Warnes G, Merckenschlager M, Fisher AG. Chromatin signatures of pluripotent cell lines. *Nat Cell Biol.* 532-8. (2006)
- Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, Stefansson IM, Straume O, Haukaas SA, Salvesen HB, Otte AP, Akslen LA. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol.* 268-73. (2006)
- Bar-Peled M, Raikhel NV. A method for isolation and purification of specific antibodies to a protein fused to the GST. *Anal Biochem.* 140-2. (1996)
- Bártová E, Krejčí J, Harnicarová A, Kozubek S. Differentiation of human embryonic stem cells induces condensation of chromosome territories and formation of heterochromatin protein 1 foci. *Differentiation.* 24-32. (2008)
- Beilstein MA, Vendeland SC, Barofsky E, Jensen ON, Whanger PD. Selenoprotein W of rat muscle binds glutathione and an unknown small molecular weight moiety. *J Inorg Biochem.* 117-24. (1996)
- Bellinger FP, Raman AV, Reeves MA, Berry MJ. Regulation and function of selenoproteins in human disease. *Biochem J.* 11-22. (2009)
- Ben Jilani KE, Panee J, He Q, Berry MJ, Li PA. Overexpression of selenoprotein H reduces Ht22 neuronal cell death after UVB irradiation by preventing superoxide formation. *Int J Biol Sci.* 198-204. (2007)
- Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagschal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell.* 315-26. (2006)
- Bhattacharya D, Talwar S, Mazumder A, Shivashankar GV. Spatio-temporal plasticity in chromatin organization in mouse cell differentiation and during Drosophila embryogenesis. *Biophys J.* 3832-9 (2009)
- Boiani M, Schöler HR. Regulatory networks in embryo-derived pluripotent stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 872-84. (2005)

- Bösl MR, Takaku K, Oshima M, Nishimura S, Taketo MM. Early embryonic lethality caused by targeted disruption of the mouse selenocysteine tRNA gene (Trsp). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 5531-4. (1997)
- Botquin V, Hess H, Fuhrmann G, Anastassiadis C, Gross MK, Vriend G, Schöler HR. New POU dimer configuration mediates antagonistic control of an osteopontin preimplantation enhancer by Oct-4 and Sox-2. *Genes Dev*. 2073-90. (1998)
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, Medeiros LA, Lee TI, Levine SS, Wernig M, Tajonar A, Ray MK, Bell GW, Otte AP, Vidal M, Gifford DK, Young RA, Jaenisch R. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature*. 349-53. (2006)
- Brien GL, Gambero G, O'Connell DJ, Jerman E, Turner SA, Egan CM, Dunne EJ, Jurgens MC, Wynne K, Piao L, Lohan AJ, Ferguson N, Shi X, Sinha KM, Loftus BJ, Cagney G, Bracken AP. Polycomb PHF19 binds H3K36me3 and recruits PRC2 and demethylase NO66 to embryonic stem cell genes during differentiation. *Nat Struct Mol Biol*. 1273-81. (2012)
- Burlingame RW, Love WE, Wang BC, Hamlin R, Nguyen HX, Moudrianakis EN. Crystallographic structure of the octameric histone core of the nucleosome at a resolution of 3.3 Å. *Science* 546-53. (1985)
- Cai C, Grabel L. Directing the differentiation of embryonic stem cells to neural stem cells. *Dev Dyn*. 3255-66. (2007)
- Cao R, Zhang Y. SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell*. 57-67. (2004)
- Cao R, Wang L, Wang H, Xia L, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Jones RS, Zhang Y. Role of histone H3 lysine 27 methylation in Polycomb-group silencing. *Science*. 1039-43. (2002)
- Carlson BA, Xu XM, Gladyshev VN, Hatfield DL. Selective rescue of selenoprotein expression in mice lacking a highly specialized methyl group in selenocysteine tRNA. *J Biol Chem*. 5542-8. (2005)
- Chadwick BP, Willard HF. A novel chromatin protein, distantly related to histone H2A, is largely excluded from the inactive X chromosome. *J Cell Biol*. 375-84. (2001)

- Chamberlain SJ, Yee D, Magnuson T. Polycomb repressive complex 2 is dispensable for maintenance of embryonic stem cell pluripotency. *Stem Cells*. 1496-505. (2008)
- Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell*. 643-55. (2003)
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol*. 275-80. (2009)
- Chatterjee N, Sinha D, Lemma-Dechassa M, Tan S, Shogren-Knaak MA, Bartholomew B. Histone H3 tail acetylation modulates ATP-dependent remodeling through multiple mechanisms. *Nucleic Acids Res* 8378-91. (2011)
- Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh YH, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung WK, Clarke ND, Wei CL, Ng HH. Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. *Cell*. 1106-17 (2008)
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 156-9. (1987)
- Clark LC, Combs GF Jr, Turnbull BW, Slate EH, Chalker DK, Chow J, Davis LS, Glover RA, Graham GF, Gross EG, Kronrad A, Leshner JL Jr, Park HK, Sanders BB Jr, Smith CL, Taylor JR. Effects of selenium supplementation for cancer prevention in patients with carcinoma of the skin. A randomized controlled trial. Nutritional Prevention of Cancer Study Group. *JAMA*. 1957-63. (1996)
- Cong R, Das S, Douet J, Wong J, Buschbeck M, Mongelard F, Bouvet P. macroH2A1 histone variant represses rDNA transcription. *Nucleic Acids Res*. (2013)
- Costa FF. Non-coding RNAs: lost in translation? *Gene*. 1-10. (2007)
- Dahle Ø, Kumar A, Kuehn MR. Nodal signaling recruits the histone demethylase Jmjd3 to counteract polycomb-mediated repression at target genes. *Sci Signal*. (127)ra48. (2010)

- De Santa F, Totaro MG, Prosperini E, Notarbartolo S, Testa G, Natoli G. The histone H3 lysine-27 demethylase Jmjd3 links inflammation to inhibition of polycomb-mediated gene silencing. *Cell*. 1083-94. (2007)
- Dechassa ML, Sabri A, Pondugula S, Kassabov SR, Chatterjee N, Kladde MP, Bartholomew B. SWI/SNF has intrinsic nucleosome disassembly activity that is dependent on adjacent nucleosomes. *Mol Cell*. 590-602. (2010)
- Dignam JD, Lebovitz RM, Roeder RG. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res*. 1475-89. (1983)
- Ding J, Xu H, Faiola F, Ma'ayan A, Wang J. Oct4 links multiple epigenetic pathways to the pluripotency network. *Cell Res*. 155-67. (2012)
- Dou Y, Milne TA, Ruthenburg AJ, Lee S, Lee JW, Verdine GL, Allis CD, Roeder RG. Regulation of MLL1 H3K4 methyltransferase activity by its core components. *Nat Struct Mol Biol*. 713-9. (2006)
- Elgin SC. DNAase I-hypersensitive sites of chromatin. *Cell*. 413-5. (1981)
- Ernst P, Vakoc CR. WRAD: enabler of the SET1-family of H3K4 methyltransferases. *Brief Funct Genomics*. 217-26. (2012)
- Escobar J, Pereda J, López-Rodas G, Sastre J. Redox signaling and histone acetylation in acute pancreatitis. *Free Radic Biol Med*. 819-37 (2012)
- Estève PO, Chin HG, Smallwood A, Feehery GR, Gangisetty O, Karpf AR, Carey MF, Pradhan S. Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev*. 3089-103. (2006)
- Fang R, Barbera AJ, Xu Y, Rutenberg M, Leonor T, Bi Q, Lan F, Mei P, Yuan GC, Lian C, Peng J, Cheng D, Sui G, Kaiser UB, Shi Y, Shi YG. Human LSD2/KDM1b/AOF1 regulates gene transcription by modulating intragenic H3K4me2 methylation. *Mol Cell*. 222-33. (2010)
- Faust C, Schumacher A, Holdener B, Magnuson T. The eed mutation disrupts anterior mesoderm production in mice. *Development*. 273-85. (1995)

Fischle W, Wang Y, Jacobs SA, Kim Y, Allis CD, Khorasanizadeh S. Molecular basis for the discrimination of repressive methyl-lysine marks in histone H3 by Polycomb and HP1 chromodomains. *Genes Dev.* 1870-81. (2003)

Fujii S, Ito K, Ito Y, Ochiai A. Enhancer of zeste homologue 2 (EZH2) down-regulates RUNX3 by increasing histone H3 methylation. *J Biol Chem.* 17324-32. (2008)

Gao X, Tate P, Hu P, Tjian R, Skarnes WC, Wang Z. ES cell pluripotency and germ-layer formation require the SWI/SNF chromatin remodeling component BAF250a. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 6656-61. (2008)

García-Giménez JL, Markovic J, Dasí F, Queval G, Schnaubelt D, Foyer CH, Pallardó FV. Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta.* 3304-16. (2013)

Gaume X, Monier K, Argoul F, Mongelard F, Bouvet P. In vivo Study of the Histone Chaperone Activity of Nucleolin by FRAP. *Biochem Res Int.* 187624. (2011)

Glaser S, Schaft J, Lubitz S, Vintersten K, van der Hoeven F, Tufteland KR, Aasland R, Anastassiadis K, Ang SL, Stewart AF. Multiple epigenetic maintenance factors implicated by the loss of Mll2 in mouse development. *Development.* 1423-32. (2006)

Goldhaber SB. Trace element risk assessment: essentiality vs. toxicity. *Regul Toxicol Pharmacol.* 232-42. (2003)

Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA. A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell.* 77-88. (2007)

Hall IM, Shankaranarayana GD, Noma K, Ayoub N, Cohen A, Grewal SI. Establishment and maintenance of a heterochromatin domain. *Science.* 2232-7. (2002)

Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X. Molecular coupling of DNA methylation and histone methylation. *Epigenomics.* 657-69. (2010)

Hattori N, Nishino K, Ko YG, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Shiota K. Epigenetic control of mouse Oct-4 gene expression in embryonic stem cells and trophoblast stem cells. *J Biol Chem.* 17063-9. (2004)

- Hattori N, Imao Y, Nishino K, Hattori N, Ohgane J, Yagi S, Tanaka S, Shiota K. Epigenetic regulation of Nanog gene in embryonic stem and trophoblast stem cells. *Genes Cells*. 387-96. (2007)
- Hawkes WC, Printsev I, Alkan Z. Selenoprotein W depletion induces a p53- and p21-dependent delay in cell cycle progression in RWPE-1 prostate epithelial cells. *J Cell Biochem*. 61-9. (2012)
- Hendrich B, Hardeland U, Ng HH, Jiricny J, Bird A. The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*. 301-4. (1999)
- Henikoff S, McKittrick E, Ahmad K. Epigenetics, histone H3 variants, and the inheritance of chromatin states. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*. 235-43. (2004)
- Hill KE, Lloyd RS, Burk RF. Conserved nucleotide sequences in the open reading frame and 3' untranslated region of selenoprotein P mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 537-41. (1993)
- Hirano Y, Hizume K, Kimura H, Takeyasu K, Haraguchi T, Hiraoka Y. Lamin B receptor recognizes specific modifications of histone H4 in heterochromatin formation. *J Biol Chem*. 42654-63. (2012)
- Hong S, Cho YW, Yu LR, Yu H, Veenstra TD, Ge K. Identification of JmjC domain-containing UTX and JMJD3 as histone H3 lysine 27 demethylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 18439-44. (2007)
- Hough SR, Clements I, Welch PJ, Wiederholt KA. Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of OCT4 and Nanog. *Stem Cells*. 1467-75 (2006)
- Huang Z, Li J, Zhang S, Zhang X. Inorganic arsenic modulates the expression of selenoproteins in mouse embryonic stem cell. *Toxicol Lett*. 69-76. (2009)
- Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M. Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells*. 1035-43. (2005)
- Ikegami K, Ohgane J, Tanaka S, Yagi S, Shiota K. Interplay between DNA methylation, histone modification and chromatin remodeling in stem cells and during development. *Int J Dev Biol*. 203-14. (2009)
- Ito S, D'Alessio AC, Taranova OV, Hong K, Sowers LC, Zhang Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC

- conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. *Nature*. 1129-33. (2010)
- Iwase S, Lan F, Bayliss P, de la Torre-Ubieta L, Huarte M, Qi HH, Whetstine JR, Bonni A, Roberts TM, Shi Y. The X-linked mental retardation gene SMCX/JARID1C defines a family of histone H3 lysine 4 demethylases. *Cell* 1077-88. (2007)
- James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A. TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development*. 1273-82. (2005)
- Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 1074-80. (2001)
- Jeong Dw, Kim TS, Chung YW, Lee BJ, Kim IY. Selenoprotein W is a glutathione-dependent antioxidant in vivo. *FEBS Lett*. 225-8. (2002)
- Jerry DJ. Monitoring coupling of peptides to carrier proteins using biotinylated peptide. *Biotechniques*. 464-9. (1993)
- Jiang H, Shukla A, Wang X, Chen WY, Bernstein BE, Roeder RG. Role for Dpy-30 in ES cell-fate specification by regulation of H3K4 methylation within bivalent domains. *Cell*. 513-25. (2011)
- Jiang L, Ni J, Liu Q. Evolution of selenoproteins in the metazoan. *BMC Genomics*. 446. (2012)
- Kartikasari AE, Zhou JX, Kanji MS, Chan DN, Sinha A, Grapin-Botton A, Magnuson MA, Lowry WE, Bhushan A. The histone demethylase Jmjd3 sequentially associates with the transcription factors Tbx3 and Eomes to drive endoderm differentiation. *EMBO J*. 1393-408. (2013)
- Kashyap V, Rezende NC, Scotland KB, Shaffer SM, Persson JL, Gudas LJ, Mongan NP. Regulation of stem cell pluripotency and differentiation involves a mutual regulatory circuit of the NANOG, OCT4, and SOX2 pluripotency transcription factors with polycomb repressive complexes and stem cell microRNAs. *Stem Cells Dev*. 1093-108 (2009)
- Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, Kaneko S, Kuwana Y, Nakanishi S, Nishikawa SI, Sasai Y. Induction of midbrain dopaminergic neurons from ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Neuron*. 31-40. (2000)
- Kawasaki H, Suemori H, Mizuseki K, Watanabe K, Urano F, Ichinose H, Haruta M, Takahashi M,

- Yoshikawa K, Nishikawa S, Nakatsuji N, Sasai Y. Generation of dopaminergic neurons and pigmented epithelia from primate ES cells by stromal cell-derived inducing activity. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1580-5. (2002)
- Keller GM. In vitro differentiation of embryonic stem cells. *Curr Opin Cell Biol*. 862-9. (1995)
- Ketel CS, Andersen EF, Vargas ML, Suh J, Strome S, Simon JA. Subunit contributions to histone methyltransferase activities of fly and worm polycomb group complexes. *Mol Cell Biol*. 6857-68. (2005)
- Kidder BL, Palmer S, Knott JG. SWI/SNF-Brg1 regulates self-renewal and occupies core pluripotency-related genes in embryonic stem cells. *Stem Cells*. 317-28. (2009)
- Kim DH, Tang Z, Shimada M, Fierz B, Houck-Loomis B, Bar-Dagen M, Lee S, Lee SK, Muir TW, Roeder RG, Lee JW. Histone H3K27 Trimethylation Inhibits H3 Binding and Function of SET1-Like H3K4 Methyltransferase Complexes. *Mol Cell Biol*. 4936-46. (2013)
- Kim H, Kang K, Kim J. AEBP2 as a potential targeting protein for Polycomb Repression Complex PRC2. *Nucleic Acids Res*. 2940-50. (2009)
- Kim HY, Gladyshev VN. Different catalytic mechanisms in mammalian selenocysteine- and cysteine-containing methionine-R-sulfoxide reductases. *PLoS Biol*. e375. (2005)
- Kishi Y, Fujii Y, Hirabayashi Y, Gotoh Y. HMGA regulates the global chromatin state and neurogenic potential in neocortical precursor cells. *Nat Neurosci*. 1127-33. (2012)
- Kohli RM, Zhang Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 472-9. (2013)
- Kryukov GV, Castellano S, Novoselov SV, Lobanov AV, Zehtab O, Guigó R, Gladyshev VN. Characterization of mammalian selenoproteomes. *Science*. 1439-43. (2003)
- Ku M, Koche RP, Rheinbay E, Mendenhall EM, Endoh M, Mikkelsen TS, Presser A, Nusbaum C, Xie X, Chi AS, Adli M, Kasif S, Ptaszek LM, Cowan CA, Lander ES, Koseki H, Bernstein BE. Genomewide analysis of PRC1 and PRC2 occupancy identifies two classes of bivalent domains. *PLoS Genet*. e1000242. (2008)

- Kunju LP, Cookingham C, Toy KA, Chen W, Sabel MS, Kleer CG. EZH2 and ALDH-1 mark breast epithelium at risk for breast cancer development. *Mod Pathol*. 786-93. (2011)
- Kurosawa H. Methods for inducing embryoid body formation: in vitro differentiation system of embryonic stem cells. *J Biosci Bioeng*. 389-98. (2007)
- Lee ER, Murdoch FE, Fritsch MK. High histone acetylation and decreased polycomb repressive complex 2 member levels regulate gene specific transcriptional changes during early embryonic stem cell differentiation induced by retinoic acid. *Stem Cells*. 2191-9. (2007)
- Lee JH, Skalnik DG. CpG-binding protein (CXXC finger protein 1) is a component of the mammalian Set1 histone H3-Lys4methyltransferase complex, the analogue of the yeast Set1/COMPASS complex. *J Biol Chem*. 41725-31 (2005)
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, Guenther MG, Levine SS, Kumar RM, Chevalier B, Johnstone SE, Cole MF, Isono K, Koseki H, Fuchikami T, Abe K, Murray HL, Zucker JP, Yuan B, Bell GW, Herbolsheimer E, Hannett NM, Sun K, Odom DT, Otte AP, Volkert TL, Bartel DP, Melton DA, Gifford DK, Jaenisch R, Young RA. Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell*. 301-13. (2006)
- Lei XG, Evenson JK, Thompson KM, Sunde RA. Glutathione peroxidase and phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase are differentially regulated in rats by dietary selenium. *J Nutr*. 1438-46. (1995)
- Leung BM, Kaplan BJ, Field CJ, Tough S, Eliasziw M, Gomez MF, McCargar LJ, Gagnon L; APron Study Team. Prenatal micronutrient supplementation and postpartum depressive symptoms in a pregnancy cohort. *BMC Pregnancy Childbirth*. 13:2. (2013)
- Li E, Bestor TH, Jaenisch R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*. 915-26. (1992)
- Li G, Margueron R, Ku M, Chambon P, Bernstein BE, Reinberg D. Jarid2 and PRC2, partners in regulating gene expression. *Genes Dev*. 368-80. (2010)
- Liu YJ, Nakamura T, Nakano T. Essential role of DPPA3 for chromatin condensation in mouse oocyteogenesis. *Biol Reprod*. 86(2):40. (2012)

- Lobanov AV, Hatfield DL, Gladyshev VN. Reduced reliance on the trace element selenium during evolution of mammals. *Genome Biol.* 2008-9-3-r62. (2008)
- Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet.* 431-40. (2006)
- Lu J, Holmgren A. Selenoproteins. *J Biol Chem.* 723-7. (2009)
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature.* 251-60. (1997)
- Margueron R, Li G, Sarma K, Blais A, Zavadil J, Woodcock CL, Dynlacht BD, Reinberg D. Ezh1 and Ezh2 maintain repressive chromatin through different mechanisms. *Mol Cell.* 503-18. (2008)
- Mariller C, Hardivillé S, Hoedt E, Huvent I, Pina-Canseco S, Pierce A. Delta-lactoferrin, an intracellular lactoferrin isoform that acts as a transcription factor. *Biochem Cell Biol.* 307-19. (2012)
- Marks H, Kalkan T, Menafrá R, Denisov S, Jones K, Hofemeister H, Nichols J, Kranz A, Stewart AF, Smith A, Stunnenberg HG. The transcriptional and epigenomic foundations of ground state pluripotency. *Cell.* 590-604. (2012)
- Martin JL. Thioredoxin--a fold for all reasons. *Structure.* 245-50. (1995)
- Martin-Romero FJ, Kryukov GV, Lobanov AV, Carlson BA, Lee BJ, Gladyshev VN, Hatfield DL. Selenium metabolism in Drosophila: selenoproteins, selenoprotein mRNA expression, fertility, and mortality. *J Biol Chem.* 29798-804. (2001)
- Martynoga B, Drechsel D, Guillemot F. Molecular control of neurogenesis: a view from the mammalian cerebral cortex. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 1:4. (2012)
- Mehta SL, Mendelev N, Kumari S, Andy Li P. Overexpression of human selenoprotein H in neuronal cells enhances mitochondrial biogenesis and function through activation of protein kinase A, protein kinase B, and cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein pathway.

Int J Biochem Cell Biol. 604-11. (2013)

Mendelev N, Witherspoon S, Li PA. Overexpression of human selenoprotein H in neuronal cells ameliorates ultraviolet irradiation-induced damage by modulating cell signaling pathways. *Exp Neurol.* 328-34. (2009)

Mendelev N, Mehta SL, Witherspoon S, He Q, Sexton JZ, Li PA. Upregulation of human selenoprotein H in murine hippocampal neuronal cells promotes mitochondrial biogenesis and functional performance. *Mitochondrion.* 76-82. (2011)

Meshorer E, Yellajoshula D, George E, Scambler PJ, Brown DT, Misteli T. Hyperdynamic plasticity of chromatin proteins in pluripotent embryonic stem cells. *Dev Cell.* 105-16. (2006)

Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim TK, Koche RP, Lee W, Mendenhall E, O'Donovan A, Presser A, Russ C, Xie X, Meissner A, Wernig M, Jaenisch R, Nusbaum C, Lander ES, Bernstein BE. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 553-60. (2007)

Miller SA, Mohn SE, Weinmann AS. Jmjd3 and UTX play a demethylase-independent role in chromatin remodeling to regulate T-box family member-dependent gene expression. *Mol Cell.* 594-605. (2010)

Miniard AC, Middleton LM, Budiman ME, Gerber CA, Driscoll DM. Nucleolin binds to a subset of selenoprotein mRNAs and regulates their expression. *Nucleic Acids Res.* 4807-20. (2010)

Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell.* 631-42. (2003)

Mizuguchi G, Shen X, Landry J, Wu WH, Sen S, Wu C. ATP-driven exchange of histone H2AZ variant catalyzed by SWR1 chromatin remodeling complex. *Science.* 343-8. (2004)

Mohamed Ariff I, Mitra A, Basu A. Epigenetic regulation of self-renewal and fate determination in neural stem cells. *J Neurosci Res.* 529-39. (2012)

Moriarty PM, Reddy CC, Maquat LE. Selenium deficiency reduces the abundance of mRNA for

- Se-dependent glutathione peroxidase 1 by a UGA-dependent mechanism likely to be nonsense codon-mediated decay of cytoplasmic mRNA. *Mol Cell Biol.* 2932-9. (1998)
- Morozova N, Forry EP, Shahid E, Zavacki AM, Harney JW, Kraytsberg Y, Berry MJ. Antioxidant function of a novel selenoprotein in *Drosophila melanogaster*. *Genes Cells.* 963-71. (2003)
- Müller J, Hart CM, Francis NJ, Vargas ML, Sengupta A, Wild B, Miller EL, O'Connor MB, Kingston RE, Simon JA. Histone Methyltransferase Activity of a *Drosophila* Polycomb Group Repressor Complex. *Cell.* 197-208. (2002)
- Murrell A, Rakyan VK, Beck S. From genome to epigenome. *Hum Mol Genet.* 14. (2005)
- Nabel CS, Jia H, Ye Y, Shen L, Goldschmidt HL, Stivers JT, Zhang Y, Kohli RM. AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation. *Nat Chem Biol.* 751-8. (2012)
- Nakai-Futatsugi Y, Niwa H. Transcription factor network in embryonic stem cells: heterogeneity under the stringency. *Biol Pharm Bull.* 166-70. (2013)
- Nakamura T, Arai Y, Umehara H, Masuhara M, Kimura T, Taniguchi H, Sekimoto T, Ikawa M, Yoneda Y, Okabe M, Tanaka S, Shiota K, Nakano T. PGC7/Stella protects against DNA demethylation in early embryogenesis. *Nat Cell Biol.* 64-71. (2007)
- Nakamura T, Liu YJ, Nakashima H, Umehara H, Inoue K, Matoba S, Tachibana M, Ogura A, Shinkai Y, Nakano T. PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. *Nature.* 415-9. (2012)
- Narlikar GJ, Fan HY, Kingston RE. Cooperation between complexes that regulate chromatin structure and transcription. *Cell.* 475-87. (2002)
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell.* 379-91. (1998)
- Nielsen AL, Oulad-Abdelghani M, Ortiz JA, Remboutsika E, Chambon P, Losson R. Heterochromatin formation in mammalian cells: interaction between histones and HP1 proteins. *Mol Cell.* 729-39.

(2001)

Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet.* 372-6. (2000)

Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, Yagi R, Rossant J. Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoctoderm differentiation. *Cell.* 917-29. (2005)

Noda M, Takano T, Sakurai H. Mutagenic activity of selenium compounds. *Mutat Res.* 175-9. (1979)

Novoselov SV, Kryukov GV, Xu XM, Carlson BA, Hatfield DL, Gladyshev VN. Selenoprotein H is a nucleolar thioredoxin-like protein with a unique expression pattern. *J Biol Chem.* 11960-8. (2007)

O'Carroll D, Erhardt S, Pagani M, Barton SC, Surani MA, Jenuwein T. The polycomb-group gene *Ezh2* is required for early mouse development. *Mol Cell Biol.* 4330-6. (2001)

Ohtani K, Zhao C, Dobrev G, Manavski Y, Kluge B, Braun T, Rieger MA, Zeiher AM, Dimmeler S. *Jmjd3* controls mesodermal and cardiovascular differentiation of embryonic stem cells. *Circ Res.* 856-62. (2013)

Olek A, Oswald J, Walter J. A modified and improved method for bisulphite based cytosine methylation analysis. *Nucleic Acids Res.* 5064-6. (1996)

Otsu NA. Threshold Selection Method from Gray-Level Histograms. *IEEE Transactions on Systems, Man, and Cybernetics.* 62-66. (1979)

Pan G, Li J, Zhou Y, Zheng H, Pei D. A negative feedback loop of transcription factors that controls stem cell pluripotency and self-renewal. *FASEB J.* 1730-2. (2006)

Panee J, Stoytcheva ZR, Liu W, Berry MJ. Selenoprotein H is a redox-sensing high mobility group family DNA-binding protein that up-regulates genes involved in glutathione synthesis and phase II detoxification. *J Biol Chem.* 23759-65. (2007)

Pasini D, Bracken AP, Jensen MR, Lazzerini Denchi E, Helin K. *Suz12* is essential for mouse development and for EZH2 histone methyltransferase activity. *EMBO J.* 4061-71. (2004)

- Pasini D, Bracken AP, Hansen JB, Capillo M, Helin K. The polycomb group protein Suz12 is required for embryonic stem cell differentiation. *Mol Cell Biol.* 3769-79. (2007)
- Payer B, Saitou M, Barton SC, Thresher R, Dixon JP, Zahn D, Colledge WH, Carlton MB, Nakano T, Surani MA. Stella is a maternal effect gene required for normal early development in mice. *Curr Biol.* 2110-7. (2003)
- Peng JC, Valouev A, Swigut T, Zhang J, Zhao Y, Sidow A, Wysocka J. Jarid2/Jumonji coordinates control of PRC2 enzymatic activity and target gene occupancy in pluripotent cells. *Cell.* 1290-302. (2009)
- Pilarczyk B, Jankowiak D, Tomza-Marciniak A, Pilarczyk R, Sablik P, Drozd R, Tylkowska A, Skólmowska M. Selenium concentration and glutathione peroxidase (GSH-Px) activity in serum of cows at different stages of lactation. *Biol Trace Elem Res.* 91-6. (2012)
- Pradhan M, Estève PO, Chin HG, Samaranyake M, Kim GD, Pradhan S. CXXC domain of human DNMT1 is essential for enzymatic activity. *Biochemistry.* 10000-9. (2008)
- Quail DF, Siegers GM, Jewer M, Postovit LM. Nodal signalling in embryogenesis and tumourigenesis. *Int J Biochem Cell Biol.* 885-98. (2013)
- Rajendrasozhan S, Yao H, Rahman I. Current perspectives on role of chromatin modifications and deacetylases in lung inflammation in COPD. *COPD.* 291-7. (2009)
- Rakyan VK, Down TA, Thorne NP, Flicek P, Kulesha E, Gräf S, Tomazou EM, Bäckdahl L, Johnson N, Herberth M, Howe KL, Jackson DK, Miretti MM, Fiegler H, Marioni JC, Birney E, Hubbard TJ, Carter NP, Tavaré S, Beck S. An integrated resource for genome-wide identification and analysis of human tissue-specific differentially methylated regions (tDMRs). *Genome Res.* 1518-29. (2008)
- Rayman MP. The importance of selenium to human health. *Lancet.* 233-41. (2000)
- Reddy KL, Zullo JM, Bertolino E, Singh H. Transcriptional repression mediated by repositioning of genes to the nuclear lamina. *Nature.* 243-7. (2008)
- Reeves MA, Hoffmann PR. The human selenoproteome: recent insights into functions and regulation. *Cell Mol Life Sci.* 2457-78 (2009)

- Reeves R, Beckerbauer L. HMG1/Y proteins: flexible regulators of transcription and chromatin structure. *Biochim Biophys Acta*. 13-29. (2001)
- Rowitch DH, Kriegstein AR. Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature*. 214-22. (2010)
- Russo U, Martienssen R, Riggs A. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. 1-4. (1996)
- Saedi MS, Smith CG, Frampton J, Chambers I, Harrison PR, Sunde RA. Effect of selenium status on mRNA levels for glutathione peroxidase in rat liver. *Biochem Biophys Res Commun*. 855-61. (1988)
- Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR. Chromatin remodeling by RSC involves ATP-dependent DNA translocation. *Genes Dev*. 2120-34. (2002)
- Santos-Rosa H, Schneider R, Bannister AJ, Sherriff J, Bernstein BE, Emre NC, Schreiber SL, Mellor J, Kouzarides T. Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*. 407-11. (2002)
- Sato M, Kimura T, Kurokawa K, Fujita Y, Abe K, Masuhara M, Yasunaga T, Ryo A, Yamamoto M, Nakano T. Identification of PGC7, a new gene expressed specifically in preimplantation embryos and germ cells. *Mech Dev*. 91-4. (2002)
- Sato S, Yagi S, Arai Y, Hirabayashi K, Hattori N, Iwatani M, Okita K, Ohgane J, Tanaka S, Wakayama T, Yamanaka S, Shiota K. Genome-wide DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) residing in mouse pluripotent stem cells. *Genes Cells*. 607-18. (2010)
- Schmitges FW, Prusty AB, Faty M, Stützer A, Lingaraju GM, Aiwazian J, Sack R, Hess D, Li L, Zhou S, Bunker RD, Wirth U, Bouwmeester T, Bauer A, Ly-Hartig N, Zhao K, Chan H, Gu J, Gut H, Fischle W, Müller J, Thomä NH. Histone methylation by PRC2 is inhibited by active chromatin marks. *Mol Cell*. 330-41. (2011)
- Schuettengruber B, Chourrout D, Vervoort M, Leblanc B, Cavalli G. Genome regulation by polycomb and trithorax proteins. *Cell*. 735-45. (2007)

- Shen MM. Nodal signaling: developmental roles and regulation. *Development*. 1023-34. (2007)
- Shen X, Liu Y, Hsu YJ, Fujiwara Y, Kim J, Mao X, Yuan GC, Orkin SH. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. *Mol Cell*. 491-502. (2008)
- Shen X, Kim W, Fujiwara Y, Simon MD, Liu Y, Mysliwiec MR, Yuan GC, Lee Y, Orkin SH. Jumonji modulates polycomb activity and self-renewal versus differentiation of stem cells. *Cell*. 1303-14. (2009)
- Shi Y, Lan F, Matson C, Mulligan P, Whetstine JR, Cole PA, Casero RA, Shi Y. Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*. 941-53. (2004)
- Shiota K. DNA methylation profiles of CpG islands for cellular differentiation and development in mammals. *Cytogenet Genome Res*. 325-34. (2004)
- Sims RJ 3rd, Nishioka K, Reinberg D. Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*. 629-39. (2003)
- Sirinakis G, Clapier CR, Gao Y, Viswanathan R, Cairns BR, Zhang Y. The RSC chromatin remodeling ATPase translocates DNA with high force and small step size. *EMBO J*. 2364-72. (2011)
- Smallwood A, Estève PO, Pradhan S, Carey M. Functional cooperation between HP1 and DNMT1 mediates gene silencing. *Genes Dev*. 1169-78. (2007)
- Smith AG. Embryo-derived stem cells: of mice and men. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 435-62. (2001)
- Solomon MJ, Larsen PL, Varshavsky A. Mapping protein-DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. *Cell*. 937-47. (1988)
- Steward MM, Lee JS, O'Donovan A, Wyatt M, Bernstein BE, Shilatifard A. Molecular regulation of H3K4 trimethylation by ASH2L, a shared subunit of MLL complexes. *Nat Struct Mol Biol*. 852-4. (2006)
- Stoytcheva ZR, Berry MJ. Transcriptional regulation of mammalian selenoprotein expression. *Biochim Biophys Acta*. 1429-40. (2009)

- Stoytcheva ZR, Vladimirov V, Douet V, Stoychev I, Berry MJ. Metal transcription factor-1 regulation via MREs in the transcribed regions of selenoprotein H and other metal-responsive genes. *Biochim Biophys Acta*. 416-24. (2010)
- Struhl K. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes Dev*. 599-606. (1998)
- Sun X, Li X, Moriarty PM, Henics T, LaDuca JP, Maquat LE. Nonsense-mediated decay of mRNA for the selenoprotein phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase is detectable in cultured cells but masked or inhibited in rat tissues. *Mol Biol Cell*. 1009-17. (2001)
- Sunde RA. mRNA transcripts as molecular biomarkers in medicine and nutrition. *J Nutr Biochem*. 665-70. (2010)
- Sunde RA, Raines AM, Barnes KM, Evenson JK. Selenium status highly regulates selenoprotein mRNA levels for only a subset of the selenoproteins in the selenoproteome. *Biosci Rep*. 329-38. (2009)
- Tahilian M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, Rao A. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 930-5. (2009)
- Thisse C, Degraeve A, Kryukov GV, Gladyshev VN, Obrecht-Pflumio S, Krol A, Thisse B, Lescure A. Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr Patterns*. 525-32. (2003)
- Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 1145-7. (1998)
- Torres J, Watt FM. Nanog maintains pluripotency of mouse embryonic stem cells by inhibiting NFkappaB and cooperating with Stat3. *Nat Cell Biol*. 194-201. (2008)
- Torres L, Sandoval J, Penella E, Zaragoza R, García C, Rodríguez JL, Viña JR, García-Trevijano ER. In vivo GSH depletion induces c-myc expression by modulation of chromatin protein complexes. *Free Radic Biol Med*. 1534-42. (2009)
- Tsukada Y, Fang J, Erdjument-Bromage H, Warren ME, Borchers CH, Tempst P, Zhang Y. Histone

- demethylation by a family of JmjC domain-containing proteins. *Nature*. 811-6. (2006)
- Vastenhouw NL, Schier AF. Bivalent histone modifications in early embryogenesis. *Curr Opin Cell Biol*. 374-86. (2012)
- Velkey JM, O'Shea KS. Expression of Neurogenin 1 in mouse embryonic stem cells directs the differentiation of neuronal precursors and identifies unique patterns of down-stream gene expression. *Dev Dyn*. 230-53. (2013)
- Wang SH, Tsai MS, Chiang MF, Li H. A novel NK-type homeobox gene, ENK (early embryo specific NK), preferentially expressed in embryonic stem cells. *Gene Expr Patterns*. 99-103. (2003)
- Yagi S, Hirabayashi K, Sato S, Li W, Takahashi Y, Hirakawa T, Wu G, Hattori N, Hattori N, Ohgane J, Tanaka S, Liu XS, Shiota K. DNA methylation profile of tissue-dependent and differentially methylated regions (T-DMRs) in mouse promoter regions demonstrating tissue-specific gene expression. *Genome Res*. 1969-78. (2008)
- Yan Z, Wang Z, Sharova L, Sharov AA, Ling C, Piao Y, Aiba K, Matoba R, Wang W, Ko MS. BAF250B-associated SWI/SNF chromatin-remodeling complex is required to maintain undifferentiated mouse embryonic stem cells. *Stem Cells*. 1155-65. (2008)
- Ye Q, Worman HJ. Interaction between an integral protein of the nuclear envelope inner membrane and human chromodomain proteins homologous to Drosophila HP1. *J Biol Chem*. 14653-6. (1996)
- Yu BD, Hess JL, Horning SE, Brown GA, Korsmeyer SJ. Altered Hox expression and segmental identity in Mll-mutant mice. *Nature*. 505-8. (1995)
- Yunusova RD, Neville TL, Vonnahme KA, Hammer CJ, Reed JJ, Taylor JB, Redmer DA, Reynolds LP, Caton JS. Impacts of maternal selenium supply and nutritional plane on visceral tissues and intestinal biology in 180-day-old offspring in sheep. *J Anim Sci*. 2229-42. (2013)
- Walker E, Chang WY, Hunkapiller J, Cagney G, Garcha K, Torchia J, Krogan NJ, Reiter JF, Stanford WL. Polycomb-like 2 associates with PRC2 and regulates transcriptional networks during mouse embryonic stemcell self-renewal and differentiation. *Cell Stem Cell*. 153-66. (2010)
- Zhang Y, Smith CL, Saha A, Grill SW, Mihardja S, Smith SB, Cairns BR, Peterson CL, Bustamante C.

DNA translocation and loop formation mechanism of chromatin remodeling by SWI/SNF and RSC.
Mol Cell. 559-68. (2006)

論文の内容の要旨

応用動物科学 専攻
平成23年度博士課程 入学
氏 名 田部井 靖享
指導教員名 塩田 邦郎

論文題目 Selenoprotein H のエピジェネティック作用に関する研究

諸言

Selenoprotein H (SelH) は微量元素セレンウムをアミノ酸セレノシステインとして含むセレノプロテインの一つであり、核移行シグナルを有し、核内に局在する。SelH のアミノ酸配列はヒトからショウジョウバエまでよく保存されている。SelH はセレノシステインを含む CXXU モチーフを持つことから、機能は抗酸化作用のみが着目されてきた。SelH は Baf250 などのクロマチンリモデリング因子と共通する DNA 結合モチーフである AT hook motif を有していることが知られている。さらに、組換え型の SelH を用いた結合タンパク質探索実験から、SelH の結合タンパク質にはヒストンシャペロンである Nucleolin やヒストンメチル化酵素と複合体を形成することが知られている RbBP5 が含まれることが示唆されている。これらを総合すると、SelH はクロマチン構造の調節因子として核内で機能していると考えられる。

本研究では、SelH のゲノム調節機能の解明を目的とした。第一章ではまず、SelH ノックダウン ES 細胞の樹立を試みた。そして、SelH が ES 細胞のクロマチン状態に与える影響の解析を行った。第二章では、SelH ノックダウン ES 細胞を利用した、多分化能マーカー遺伝子の発現解析と胚葉体形成実験から、SelH の ES 細胞の多分化能における機能を解

析した。第三章では、SelH の有する多分化能の制御機能を神経分化に焦点を当てて解析した。

第一章 SelH ノックダウン ES 細胞の樹立およびクロマチン状態の解析

胚性幹細胞 (Embryonic stem cell : ES 細胞) は胚盤胞の内部細胞塊から樹立された細胞で、自己複製能と多分化能を持つ。ES 細胞のクロマチン構造は比べて全体的に弛緩しており、自己複製能と多分化能に関与しているという特徴を有する。SelH は ES 細胞において高発現であるが、その機能は未だ明らかではない。ゼブラフィッシュの初期発生において SelH の変異は致死であるため、SelH は初期胚のモデルである ES 細胞において重要な機能を持つことが示唆される。そのため、SelH のノックダウンやノックアウト細胞株の作成は ES 細胞においては困難であることが予想された。

第一章ではまず、異なる配列をターゲットとした 2 種類の shRNA ベクターを用いて、SelH ノックダウン ES 細胞の樹立を試みた。そして、SelH の mRNA、タンパク質発現が顕著に低下した 2 株の SelH ノックダウン ES 細胞株を樹立した。これらの細胞株は増殖と自己複製を繰り返し、未分化マーカーのアルカリフォスファターゼの発現を維持していた。そこで、作成した SelH ノックダウン ES 細胞を用いて、SelH が ES 細胞のクロマチン構造に与える影響を明らかにするために DAPI 染色による核内ヘテロクロマチンシグナルの解析を行った。その結果、SelH ノックダウン ES 細胞では、コントロールと比較してヘテロクロマチンシグナルの数が減少することが判明した。

次に、SelH 強制発現 ES 細胞の作成も試みた。セレノプロテインの強制発現はセレノシステインをコードする UGA コドンにおける翻訳の停止の可能性があり、野生型のままでは困難である。そのため、セレノシステインをシステインに変異させた変異型 SelH の強制発現を行った。そして、外来性の変異型 SelH を過剰に発現する一方で、内在性 SelH 発現の低下した変異型 SelH 強制発現 ES 細胞を樹立した。DAPI 染色により、この変異型 SelH 強制発現 ES 細胞では、ヘテロクロマチンシグナル数の増加が認められた。

これらの結果は、SelH は ES 細胞のクロマチン構造変化に関わっていることを示唆している。

第二章 ES 細胞の多分化能における SelH の機能解析

ES 細胞の多分化能はエピジェネティックな発現制御を受けている Oct3/4, Nanog などの多分化能関連遺伝子群によって維持されている。SelH が ES 細胞の分化能に与える影響を解明することを目的とし、SelH ノックダウン ES 細胞を用いて、これらの遺伝子の発現およびエピジェネティック解析を行った。

定量的 RT-PCR 法により、SelH ノックダウン ES 細胞では、多分化能関連遺伝子である *Nanog*, *Dppa3*, *Nodal* mRNA 発現の低下が認められた。また、これらの遺伝子発現の低下は野生型 SelH 強制発現によるレスキューによって回復した。さらに、一章と同様にセレノ

システインをシステインに変異させた変異型 SelH の強制発現によっても、発現の回復が認められた。従って、SelH のクロマチン構造や多分化能関連遺伝子発現への作用にはセレノシステインは必須でないことが示唆される。SelH ノックダウン ES 細胞においては、*Nanog*, *Dppa3*, *Nodal* 遺伝子領域で、コントロールと比較して、促進系のヒストン修飾である H3 のリシン 4 のトリメチル化修飾 (H3K4me3 修飾) の低下、抑制系の H3 のリシン 9 および 27 のトリメチル化修飾 (H3K9me3 および H3K27me3 修飾) の増加が認められた。

胚葉体 (Embryoid body: EB) は ES 細胞を浮遊培養することで形成され、外胚葉・中胚葉・内胚葉の三胚葉すべての細胞系列を含む細胞塊である。SelH の分化への影響を解析するために、SelH ノックダウン ES 細胞の EB 分化誘導を行った。その結果、SelH ノックダウン ES 細胞では、形成される EB サイズの低下という異常が認められた。また、SelH ノックダウンでは内胚葉マーカー遺伝子 *Gata4*, *Gata6*、中胚葉マーカー遺伝子 *T*, *Kdr* 発現の低下、外胚葉マーカー遺伝子 *Nes*, *Ascl1* 発現の増加が認められた。一方、変異型 SelH の強制発現 ES 細胞から作成した EB では、外胚葉マーカー遺伝子の発現低下と内胚葉および中胚葉マーカー遺伝子の発現増加が認められた。

以上から、SelH は多分化能関連遺伝子のヒストン修飾状態を維持し、多分化能遺伝子発現調節および外胚葉分化の抑制と中・内胚葉分化の促進という初期胚葉分化の方向性の決定に関与することが示された。

第三章 ES 細胞の神経分化における SelH の機能解析

マウス初期発生段階では、神経前駆細胞は原腸陥入胚期に外胚葉から現れる。その後胚性約 9.5 日目に神経前駆細胞から神経細胞が、胚性約 14.5 日目にグリア細胞への分化が開始する。ES 細胞を用いた神経分化誘導の際にも、ES 細胞から神経前駆細胞、神経細胞、グリア細胞という順に細胞分化が進行することが知られている。

外胚葉分化の抑制という機能が示された SelH の多分化能制御について、神経分化に焦点を当ててさらに詳細に解析するために、SelH ノックダウン ES 細胞を神経系へ分化誘導した。その結果、SelH ノックダウン ES 細胞から誘導した神経では、神経前駆細胞マーカー (*Tubb3*, *Nes*, *Ngn1*, *Ngn2*, *Sox1*)、神経細胞マーカー (*Th*, *Ascl1*, *Mtap2*, *Lmx1b*, *Syt1*)、グリア細胞マーカー (*Gfap*, *S100B*, *Cldn11*) のすべてのマーカー遺伝子の発現時期がコントロールと比較して早まっていた。さらに未分化状態で認められた SelH のノックダウン効果は分化後には認められなかった。従って、SelH は未分化状態において ES 細胞の分化能に作用していると考えられる。

さて、未分化状態の ES 細胞において、神経分化制御を行う遺伝子領域の多くは促進系の H3K4me3 修飾と抑制系の H3K27me3 修飾の両方の修飾が共存しており、このような遺伝子はバイバレント遺伝子と呼ばれる。未分化状態においては、これらの遺伝子は H3K27me3 修飾によって発現が抑制されており、神経分化開始時に H3K27me3 修飾が低下することで、維持された H3K4me3 修飾によって速やかに発現が開始される。

未分化状態の *SelH* ノックダウン ES 細胞について、*Tubb3* や *Th* を含む神経分化遺伝子のヒストン修飾の解析を行った結果、コントロールと比較して **H3K27me3** 修飾の低下が認められた。さらに、*Gata4* など神経以外の分化を誘導する遺伝子を含むバイバレント遺伝子のヒストン修飾を解析したところ、同様に **H3K27me3** 修飾の低下が認められた一方で、遺伝子間領域の **H3K27me3** 修飾の低下は認められなかった。また、これらの遺伝子領域において、**H3K4me3** 修飾などその他のヒストン修飾にはほとんど変化が認められなかった。

以上から、*SelH* は未分化状態の ES 細胞において、バイバレントな分化誘導遺伝子領域の抑制的修飾である **H3K27me3** 修飾を維持することが明らかとなり、ES 細胞の神経分化を抑制することが示された。

考察と結論

H3K27me3 修飾は幹細胞および胚発生の特定期間系列への運命決定に極めて重要なエピジェネティック修飾である。**H3K27me3** 修飾は未分化状態において、分化誘導遺伝子の発現を抑制して未分化状態を保ち、分化後に特定の細胞系列の分化誘導遺伝子のみ脱メチル化されることでその分化を誘導する。*SelH* 欠損は未分化状態のバイバレント遺伝子領域において、**H3K27me3** 修飾に選択的に低下させ、神経を含む外胚葉分化を抑制した。よって、*SelH* は幹細胞および胚発生において、**H3K27me3** 修飾を介して、分化の方向性およびタイミングを調節する役割を有する可能性がある。

以上、*SelH* はエピジェネティック制御能を有しており、幹細胞の分化能維持に重要なことが明らかとなった。

謝辞

本研究の遂行、論文作成にあたり、適切なご指導、ご鞭撻を頂きました細胞生化学研究室塩田邦郎教授に深く感謝いたします。

実験および論文作成にあたり、丁寧なご指導と惜しみない助言を頂きました広澤瑞子助教に深く感謝いたします。

本研究の遂行において、常に有意義な助言を頂きました八木慎太郎特任教授、田中智准教授、早川晃司特任助教に深く感謝いたします。

日々の研究生生活を支えて頂きました、先輩方、同輩、後輩の皆様に深く感謝いたします。

最後にこれまで、支え、励ましていただきました家族に深く感謝いたします。

博士論文審査委員会後修正箇所

- ・総合討論 図4Aの追加（イントロに対応した形に）（堀先生、村田先生）→新たな図の作成
- ・ノックダウンの抗 SelH 抗体 western blotting の図の変更（堀先生）→大分子量の範囲も表示
- ・総合討論、ガンとの関連の記述追加（千田先生）
- ・総合討論 図4Bの説明変更（千田先生）
- ・材料と方法 不足情報の追加(ph、品名など) （千田先生）
- ・第一章、材料と方法、抗体評価の WB におけるタンパク質サイズ決定方の追加（田中先生）
- ・第一章、結果、抗体評価の解釈の変更、核内のみ→細胞質に比べ、核内が強く染色田中先生）
- ・第一章、考察、パラグラフ3、SelH のフィードバック調節に関する記述の追加（田中先生）

その他、主に千田先生、田中先生にご指摘いただいた「てにおは」などの誤記述を修正しました。