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）は微量元素セレニ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 細胞にでは、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（Embroyoid 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に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在しており、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。