

博士論文

多能性幹細胞におけるRest複合体結合部位の同定と解析

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカルゲノム専攻

ゲノム制御医科学分野

関 真秀

目次

1.	序論	2 - 5
2.	実験材料及び方法	6 - 12
3.	ES 細胞における Rest 複合体結合部位の同定と解析	
	3-1. 結果	13 - 38
	3-2. 考察	39 - 42
4.	ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 複合体結合部位の比較解析	
	結果と考察	43 - 68
5.	総括	69 - 70
6.	参考文献	71 - 78
7.	論文目録	79
8.	謝辞	80

1. 序論

ヒストン修飾を触媒する抑制性の複合体

多能性幹細胞の未分化状態の維持や分化に、ヒストン修飾を触媒する酵素を含む抑制性複合体が重要な役割を担っている(Orkin and Hochedlinger 2011)。PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2)は Suz12、Eed、Ezh2 などのサブユニットを含む複合体で、抑制性の H3K27me3 の修飾を行うことで分化に関わる遺伝子の発現を抑制している(Fisher and Fisher 2011)。NuRD (Nucleosome Remodeling deacetylase) 複合体はヒストン脱アセチル化酵素 HDAC1/2 と ATP 依存的にクロマチン再構成を行う Mi-2 α/β などのサブユニットを含み、ヒストン脱アセチル化により遺伝子発現の抑制を行う(Hu and Wade 2012)。Sin3 複合体は足場となるタンパクである Sin3A や HDAC1/2 などを含みヒストン脱アセチル化を行う(Silverstein and Ekwall 2005)。CoRest 複合体は足場タンパク質である CoRest、HDAC1/2、活性性の H3K4me1/2 の脱メチル化を行う酵素 Lsd1 などを含み遺伝子発現抑制を行う(Ooi and Wood 2007)。

Rest の機能について

Rest は初期発生における転写制御に重要な役割を担っている。Rest のノックアウトマウスは 11.5 日での胚性致死を示す(Chen et al. 1998)。Rest は ES 細胞を含む神経以外の細胞において、主に神経系で発現する遺伝子を抑制する(Chen et al. 1998; Ballas et al. 2005; Johnson et al. 2008)。Rest による発現抑制は、神経前駆細胞の神経分化時に解除される(Chong et al. 1995)。近年の研究により、Rest は神経分化抑制以外にも様々な機能を果たすことが示されている。上皮がんにおいては、Rest の発現を抑制することによって増殖と形質転換が促進されるのに対し、神経系のがんにおいては、Rest の発現上昇により増殖が促進される(Negrini et al. 2013)。また、始原生殖細胞においては、Rest がアポトーシスを阻害することが示されている(Okamura et al. 2012)。

ES 細胞において、Rest は Oct4 や Nanog などによって正に制御されており、高い遺伝子発現を示している(Ballas et al. 2005; Loh et al. 2006)。Rest の発現の抑制によりマウス ES 細胞の多能性維持に異常が生じるという報告(Singh et al. 2008)と、Rest を欠損しても多能性に影響はないという報告(Jørgensen et al. 2009; Buckley et al. 2009) の両方が存在する。また、Rest は多能性の維持ではなく、分化時の多能性に関わる遺伝子の抑制に重要であるという報告も存在する(Yamada et al. 2010)。さらに、Rest の発現の抑制による多能性への影響は、培養の条件や Rest ノックアウト後の培養期間に依存して変化することも示

されている(Singh et al. 2012)。

Rest 複合体について

Rest は Sin3 複合体、CoRest 複合体と、また、Cdy1 を介してヒストンメチル化酵素 G9a と相互作用をすることで、様々な抑制性のヒストン修飾酵素をリクルートして遺伝子抑制を行っている(図 1-1) (Ooi and Wood 2007; Mulligan et al. 2008)。また、PRC2 について G9a を介した相互作用が示されている(Mozzetta et al. 2014)。

マウス ES 細胞と神経前駆細胞において、Rest の結合部位はクロマチン免疫沈降法(ChIP; Chromatin Immunoprecipitation)と 超高速シーケンサーによるシーケンシングを組み合わせた方法である ChIP-Seq により同定され、それぞれの細胞において Rest は異なった遺伝子発現制御を行っていることが示唆されている(Johnson et al. 2008)。また、Rest と補因子の Sin3 と CoRest の ChIP-Seq による比較から、Rest による遺伝子発現抑制には Rest 単独の結合では不十分で、Rest 以外の補因子との複合体の形成が必要であることが示されている(Yu et al. 2011)。Rest 複合体のゲノム上での結合部位への PRC2 の共結合については、Rest の欠損によって Rest 結合部位の PRC2 の結合が低下して H3K27me3 の修飾レベルが低下する結合部位と、Rest の欠損により Rest 結合部位周辺の PRC2 の結合が亢進して H3K27me3 の修飾が上昇する結合部位が存在することが示されている(Dietrich et al. 2012)。Rest がどのように Rest 結合部位への PRC2 のリクルートを調節しているのかについてはあまりよく分かっていない。

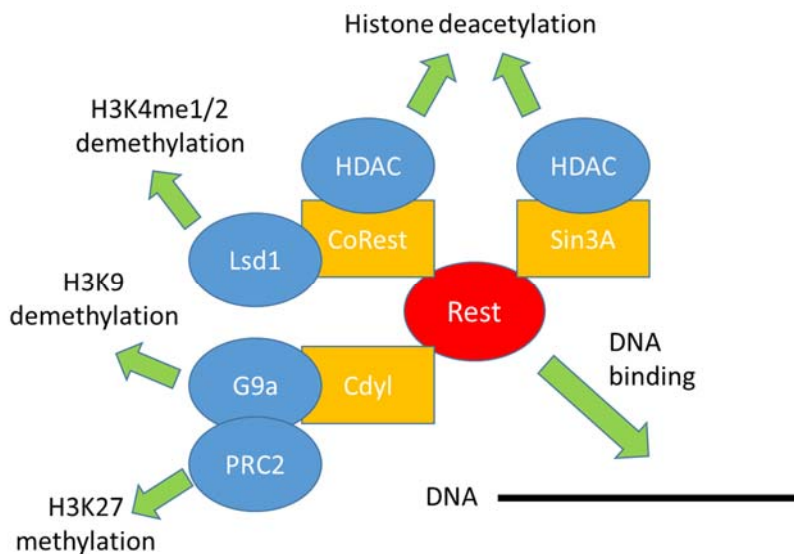


図 1-1. Rest 複合体について

ES 細胞の多能性と自己増殖能を制御する転写因子群について

ES 細胞は多能性維持と自己複製を行うために、転写因子による高度な遺伝子発現制御が行われている。マウス ES 細胞におけるこれらの転写因子の ChIP-Seq 解析から、ES 細胞では転写因子群がゲノム上でクラスターを形成しており、多能性に関わる Nanog、Oct4、Sox2 を中心に Smad1、Stat3 などを含む Oct4-centric module と、自己複製に関わる転写因子である c-Myc、n-Myc、E2F1 や Zfx などを含む Myc-centric module と呼ばれるクラスターが存在することが示されている(Chen et al. 2008; Ng and Surani 2011)。また、Klf4、Esrrb や Tcfcp2l1 は両方のクラスターに含まれていることが示されている。Myc-centric module は主に転写開始点付近に結合するのに対して、Oct4-centric module はコアプロモーターやエンハンサーに結合する。

Sin3A と Lsd1 の Rest 以外の因子との関係について

Sin3A と Lsd1 は Rest 複合体以外の様々な転写因子によってもリクルートされることが知られており、ES 細胞の多能性や自己複製に関わる転写因子とも相互作用することが知られている。Oct4 や Nanog は主に転写の活性化に関わることが知られているが、Sin3A を含む Sin3 複合体と Lsd1 を含む NuRD 複合体と相互作用することで、遺伝子発現の抑制も行うことが示されている(Liang et al. 2008)。また、Sin3A は c-Myc や n-Myc とヘテロダイマーを形成する転写因子である Max との相互作用が示されている(Laherty et al. 1997)。Lsd1 はラットにおいて c-Myc と相互作用して転写の活性化に関わることが報告されている(Amente et al. 2010)。胚発生の際に c-Myc と E2F によって発現誘導される遺伝子の発現が、Sin3A のノックアウトによって抑制されることが知られている(McDonel et al. 2012)。5-メチルシトシン(5mC)をヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)に変換する酵素である Tet1 は CpG アイランドに結合する CXXC zinc finger domain をもち、Tet1 がその酵素活性非依存的に Sin3A を CpG アイランドにリクルートすることが示されている(Williams et al. 2011b)。

ES 細胞と EpiS 細胞について

マウス ES 細胞は着床前の胚盤胞の初期エピブラストに相当すると考えられているのに対し、epiblast stem cells (EpiS 細胞)は前期着床後の胚の後期エピブラストから樹立される多能性幹細胞である(Brons et al. 2007; Tesar et al. 2007; Nichols and Smith 2011)。ES 細胞と EpiS 細胞の間には様々な異なる特徴が存在することが知られている。ES 細胞の維持

にはサイトカインである LIF や BMP4 の添加が必要なものに対して、EpiS 細胞では FGF2 や Activin A が必要である。ES 細胞を EpiS 細胞の培養条件で培養することにより、EpiS 細胞を誘導することができる(Guo et al. 2009)。雌の ES 細胞では X 染色体の不活性化が起こっていないのに対して、EpiS 細胞では不活性化が起こっている。また、ES 細胞はキメラ形成への寄与ができることが知られているのに対して、EpiS 細胞はほとんど寄与できないことが知られており、EpiS 細胞は ES 細胞よりも多能性の制限された分化が進んでいる状態の細胞であると考えられている。培養条件、遺伝子発現やエピジェネティックパターンなどについて、ヒト ES 細胞はマウス ES 細胞よりもマウス EpiS 細胞と類似した特長を有している(Tesar et al. 2007; Greber et al. 2010; Vallier et al. 2009)。着床前後の胚の多能性の変化や再生医療の応用のためには、マウス ES 細胞と EpiS 細胞の違いについてより詳細な解析が必要である。

本研究の目的と手法

本研究は、ヒストン修飾を行う複合体の形成の仕方が、制御や細胞状態にどのような差異を与えるのかを明らかにすることを目的として研究を行った。ChIP-Seq 法により、ES 細胞と EpiS 細胞において、Rest 複合体の構成因子である Rest、Sin3A と Lsd1 の結合部位、RNA polymerase II (Pol2)の結合部位 と 7 種類のヒストン修飾部位を網羅的に同定した。通常培養したマウス ES 細胞での遺伝子発現解析と ES 細胞における Rest ノックダウンによる発現変化解析を mRNA-Seq 法により行った。また、ES 細胞と EpiS 細胞について TSS-Seq 法による遺伝子発現解析も行った。Rest、Sin3A と Lsd1 の共結合部位パターンや ES 細胞と EpiS 細胞での Rest 複合体の結合特異性によりグループ分けを行い、ヒストン修飾や結合遺伝子の発現量と比較することで、その制御にどのような違いがあるのかについて解析を行った。

2. 実験材料及び方法

細胞

マウス ES 細胞は E14TG2a 株 (129/Ola 系統、雄由来)を用いた(Hooper et al. 1987)。マウス ES 細胞は、0.1%ゼラチン (Sigma-Aldrich)でコートしたディッシュ上で、10% Knockout Serum Replacement (KSR; Invitrogen)、0.1 mM MEM 非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Invitrogen)、2 mM L-グルタミン、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)と 1000 U/ml ESGRO (mLIF)を添加した GMEM (Sigma-Aldrich)中で培養を行った。

EpiS 細胞は Tesar et al. 2007 により樹立された株を用いた。マウス胎児由来繊維芽細胞 (MEF) 上で、20% KSR, 0.1 mM MEM 非必須アミノ酸溶液 (Invitrogen)、1 mM ピルビン酸ナトリウム (Invitrogen)、0.1 mM 2-メルカプトエタノール (Invitrogen)、2 mM GlutaMAX I (Invitrogen)、100 U/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン (Sigma-Aldrich)と 5 ng/ml bFGF を添加した DMEM/F12 (Invitrogen) 中で培養を行った。EpiS 細胞は回収時に MEF の混入割合が 5%以下になるように調製した。

免疫化学染色

細胞に 4%パラホルムアルデヒド溶液加え、1 時間室温で処理して固定を行った。0.1% Triton X-100 を含む PBS で透過処理をし、MAXblock Blocking Medium (Active Motif)によりブロッキングを行った。一次抗体は、anti-Nanog (リプロセル; RCAB001P)、anti-Oct4 (Santa Cruz Biotechnology; sc-5279)と anti-PECAM1 (BD; 553370)を用いた。二次抗体には、Alexa Fluor 488 色素が結合した抗体 (Invitrogen)を用いた。

クロマチン免疫沈降と抗体

クロマチン免疫沈降実験は Tanimoto et al. 2010 と Kanai et al. 2011 に記載のある通りに行った。ディッシュ上で 1.5×10^7 個の細胞を終濃度 1%ホルムアルデヒドにより 10 分間室温で処理して固定した後、2.5 M グリシンを加えて 5 分間置き反応を停止させ、PBS で 2 回洗浄しスクレイパーで回収した。5 ml の溶解バッファー1(50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 140 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH8.0, 10% グリセロール, 0.5% NP-40, 0.25% Triton

X-100)に細胞を懸濁して氷上で10分間置いて、2分おきに混和して細胞を溶解させた。1500 rpm、4°Cで5分間遠心して上清を除いた。溶解バッファー2(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.5 mM EGTA, pH 8.0)で懸濁し、室温で10分間置き細胞を洗浄した後、1500 rpm、4°Cで5分間遠心して上清を除いて核ペレットを得た。さらに、溶解バッファー3(10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 0.5 mM EGTA, pH 8.0, 0.1% デオキシコール酸ナトリウム, 0.5% N-ラウロイルサルコシナトリウム)で懸濁し、氷上で Handy Sonic UR-20P (トミー精工)を用いて30秒間、16サイクルのソニケーションシクロマチンの断片化を行った。100 μ l の 10% Triton X-100 を混合し、15,000 rpm、4°C、10分間遠心して上清を回収した。50 μ l の溶解液をコントロール用に保存した。Dynabeads Protein A もしくは G(Invitrogen)を100 μ l を 1.7 ml シリコナイズドチューブに分注し、1 ml の阻害溶液(0.5% BSA を含む PBS)で3回洗浄した後、250 μ l の阻害溶液と抗体を加えて4°Cで4時間以上混和してビーズに抗体を結合させた。同様に阻害溶液で3回洗浄した後、100 μ l の阻害溶液に懸濁し、溶解液と混合した。4°Cで一晩混和した後、1 ml の洗浄バッファー (50 mM HEPES-KOH, pH 7.5, 500 mM LiCl, 1 mM EDTA, pH 8.0, 1% NP-40, 0.7%デオキシコール酸ナトリウム) で8回、50 mM NaCl を含む TE バッファーで1回洗浄した。溶出バッファー(50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 10 mM EDTA, pH 8.0, 1% SDS)を200 μ l 加え、65°Cで15分間処理して溶出を行った。ビーズを除き、新しい1.5 ml チューブに移し、65°Cで一晩処理することでDNA-タンパク質間のクロスリンクを外した。また、このとき、コントロール用に保存していた溶解液50 μ l に溶出バッファー150 μ l を加えて、同様に処理した。200 μ l の TE バッファーと 10 mg/ml RNaseA (Novagen) を 8 μ l 加えて 37°Cで2時間処理して RNA を分解した後、20 mg/ml プロテアーゼ K (タカラバイオ) 4 μ l と 300 mM CaCl₂ 7 μ l を加えて 55°Cで30分処理してタンパク質を分解した。フェノールクロロホルム抽出を行った後、エタノール沈殿をして DNA を抽出した。

使用した抗体は以下のものである。Anti-REST (Millipore; 07-579)、SIN3A (Santa Cruz Biotechnology; sc-994)、LSD1 (abcam; ab17721)、RNA Polymerase II (abcam; ab817)、H3K4me3 (abcam; ab1012)、H3K9K14ac (Millipore; 06-599)、H3K9me2 (abcam; ab1220)、H3K9me3 (abcam; ab8898)、H3K27me3 (Millipore; 07-449)、H3K4me1 (abcam ab8895)、H3K27ac (abcam; ab4729)

ChIP-Seq のピーク検出

ChIP-Seq のデータ解析には ChIP-Seq 用のピーク検出ソフト MACS(version1.4.1)により行った(Zhang et al. 2008)。MACSによって、タグデータは、同じ位置で過度に重複するタグが除かれた後の ChIP と WCE のタグ数の差が上下 10%以内になるように、あらかじめランダムにサンプリングしたものをを用いた。デフォルトのパラメーターでゲノムサイズ

のみマウスゲノムに設定して検出を行った。

DNA モチーフ検出と検索

MACS によって検出されたピークの DNA 配列に共通するコンセンサス配列の検出には MEME-ChIP を用いた(Machanick and Bailey 2011)。検出されたモチーフに類似した既知のモチーフを、TOMTOM(Gupta et al. 2007)を用いて検索した。さらに、ピークの配列から AME(McLeay and Bailey 2010)を用いて、既知の DNA モチーフの濃縮を計算した。既知のモチーフは JASPAR_CORE(Portales-Casamar et al. 2009)を用いた。また、TRANSFAC (version 2008.3) のマトリクスと vertebrate non redundant minFP cutoff を用いて、MATCH により個々の結合配列に含まれるコンセンサス配列の検索を行った(Kel et al. 2003; Wingender 2008)。

siRNA によるノックダウン

Stealth Select RNAi siRNA の siRest(Invitrogen)とネガティブコントロールとして Stealth RNAi Negative Control Medium GC Duplex を用いた。まず、細胞を 6 ウェルプレートに 2.5×10^5 個播種した。1 日後、トランスフェクション後に濃度が変わらないように通常よりも多めに LIF を加えた 2 ml の培地に交換した。Lipofectamine 2000 (Invitrogen) 6 μ l を OptiMEM(Invitrogen)で 200 μ l に希釈して室温で 5 分間静置した。その間に 120 pmol の siRNA も OptiMEM で 200 μ l に希釈した。両者を混合して常温で 20 分間静置後、細胞に滴下した。2 日後に、PBS で洗浄しスクレイパーで細胞を回収した。

RNA 抽出と cDNA 合成

RNA 抽出は RNeasy Mini Kit と RNase-Free DNase Kit(Qiagen)を用いて付属のプロトコルの通りに行った。cDNA の合成は、RNA 10 μ g、5 mM dNTPs 8 μ l、0.1 M DTT 6 μ l、オリゴ dT 10 pmol、RNasin Ribonuclease Inhibitor (Promega) 1 μ l と SuperScriptII (Invitrogen) 2 μ l を加えて、50 μ l の反応液中で行った。12°C で 1 時間処理してアニーリングさせた後、42°C で一晩逆転写させた。反応後、水を 50 μ l 加えてからフェノールクロロホルム抽出を行った。0.5 M EDTA (pH8.0) 2 μ l と 0.1 M NaOH 15 μ l を加えて、65°C で 40 分間アルカリ処理を行った。1 M Tris-HCl (pH7.0)を 20 μ l 加えた後、エタノール沈殿法により cDNA を回収した。

qPCR 解析

qRT-PCR には表 2-1 のプライマーを、ChIP-qPCR には表 2-2 のプライマーをそれぞれ用いた。新規のプライマーの設計には Primer3Plus (Untergasser et al. 2007) を使用し、また、先行研究で用いられたプライマーも用いた (Verhulst et al. 2008; Patterson et al. 2000; Toyooka et al. 2008; Mikkelsen et al. 2007; Chen et al. 2008; Tachibana et al. 2008)。Power SYBR Green PCR Master Mix と Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システム (Applied biosystems) を用いて、qPCR の反応及び検出を行った。相対的な遺伝子発現量と ChIP の濃縮効率は $\Delta\Delta Ct$ 法により計算した。

表 2-1. 定量 RT-PCR 用

遺伝子名	フォワードプライマー	リバースプライマー	RefSeq ID	増幅領域	参考文献
Gapdh	CCCCAATGTGTCCGTGTG	GCCTGCTTACCACCTTCT	NM_008084	755-838	Verhulst et al., 2008
Actb	GCTGTATCCCTCCATCGTG	CACGGTTGGCCTTAGGGTTTCAG	NM_007393	164-428	Patterson et al., 2000
Rest	TGTCTCGGAGCCACCTCGGG	CCTGCCGCGCCATCTCACTC	NM_011263	2653-2753	primer3plusにより設計
Sn3a	AGACCTGTTTGGCTTTGGAA	GAATTTGTTGAGGCCGAGAA	NM_011378	4699-4797	primer3plusにより設計
Lsd1	GCACAGCATCCCAAGTAT	CTTGCTTACGTGGCAGATGA	NM_133872	2677-2756	primer3plusにより設計
Cdh1	AGCCAGGGCTACACAGAGAA	CCTGCTTCTGAGAAAATGC	NM_009864	3984-4072	primer3plusにより設計
Tbx3	AGGAGCGTGTCTGTCAAGTT	GCCTAGGCTTGCTAGTGTGG	NM_011535	4028-4119	primer3plusにより設計
Cer1	TTGGTGGCCATGTATTTTT	ATTCTTCTTCAACGCCAGA	NM_009887	1342-1428	primer3plusにより設計
Fgf5	AAACCTGGTGCACCCCTAGAA	GGTTTCTGTGAGGGTTTGG	NM_001277268	2153-2270	primer3plusにより設計
Eomes	GGCAAAGCGGACAATAACAT	GAAATCTCTGCCTCATCCA	NM_010136	1489-1580	primer3plusにより設計
Oct4	CACGAGTGGAAAGCAACTCA	AGATGGTGTCTGGCTGAAC	NM_013633	355-600	Toyooka et al., 2008
Nanog	ACCTGAGCTATAAGCAGGTTAAG	GTGCTGAGCCCTTCTGAATCAGAC	NM_028016	616-732	Toyooka et al., 2008
Klf4	CCAGCAAGTCAGCTTGTGAA	GGGCATGTTCAAGTTGGATT	NM_010637	2186-2374	Toyooka et al., 2008
Rex1	CAGTTCGTCCATCTAAAAGGGG	TCTTAGCTGCTTCCCTGAACAAATG	NM_009556	10-385	Toyooka et al., 2008
Smpd3	CTGACTCCTAACCGGCTCTG	AACTCCAGGTGGTGTGGAC	NM_021491	4700-4814	primer3plusにより設計
Vgf	GATGACGACGACGAGGATG	CTCTTCGATGATGCTGACCA	NM_001039385	1520-1624	primer3plusにより設計
Cell6	GTGGAAAGATTGGCCTGTGT	CCACAACCTCTTGTGCTT	NM_175235	1919-2035	primer3plusにより設計
Snai2	CCACAGAGCTATGCCACAA	AGCCATGAGGAACCAAAGAC	NM_011428	1252-1334	primer3plusにより設計
Cdk5r2	CCGATCCCCAAGACTCTACA	TGCCCTGGACAACCTGAGACTG	NM_009872	1793-1901	primer3plusにより設計
Mapk8ip2	GGGCTGTCTTCAAGTTTCATC	GCCACGAAACAAAAGTCAAT	NM_021921	2157-2260	primer3plusにより設計
Sez6	CCACCATCCACTTCTCTGT	GAGAGGCAGCCCTACAGATG	NM_021286	2687-2806	primer3plusにより設計
Syp	TGATCGTGTGTGCCATTTT	AACAAATCCGAAGGGCACAG	NM_009305	2328-2412	primer3plusにより設計

表 2-2. ChIP-定量 PCR 用

プライマー名	フォワードプライマー	リバースプライマー	増幅領域	参考文献
遺伝子間領域1	AGGGGAAAGAGCTGGAAAAG	TATTCTCGAGCCCAAGAGA	chr12:38,520,086-3,852,055	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L+ 1 (Snap25 遺伝子)	CACCCCTGGACAGGAGTCT	ATCTCTGACAGGTAATGC	chr2:136,539,969-136,540,155	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L+ 2 (Vgf 遺伝子)	AGAGCGCTTGTCTGACC	CTGTCCCGTGGAGTAT	chr5:137,506,056-137,506,284	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L+ 3 (Syp 遺伝子)	CCTTGTCTACCAGCCACTT	CGCGTACCTGATTCACCAC	chrX:7,215,742-7,215,955	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L+ 4 (Chra3 遺伝子)	AGCACACACCCATGTCTGA	CTTAGCTGTGCTTCGGTGGT	chr9:5,4874,188-54,874,267	primer3plusにより設計
ES細胞特異的 R+/S+/L- 1 (Rbfa 遺伝子)	GGACAGCTCCACATTGAGGT	CCTGAACGGCCTTCTCTACA	chr18:80,394,320-80,394,606	primer3plusにより設計
ES細胞特異的 R+/S+/L- 2 (Nr4a1 遺伝子)	CCCCTGATTGCTCTCACTA	GCACATAGCCAAAGTCACCA	chr15:101,088,627-101,088,828	primer3plusにより設計
ES細胞特異的 R+/S+/L- 3 (Mapkapk5 遺伝子)	GATAGTTTGGCCTGGCAAGA	CACCATGTGGTTCGCTGAT	chr5:121,591,323-121,591,518	primer3plusにより設計
ES細胞特異的 R+/S+/L- 4 (Zfp113 遺伝子)	ACACACACTTCCACCTCACCC	GGCTCTGTACAGGCTCAA	chr5:138,596,811-138,596,928	primer3plusにより設計
ES細胞特異的 R+/S+/L- 1 (Mapk9 遺伝子)	GTSGGAGCTGTCCAACTT	CTAGCCCCCAATTCAAGGT	chr5:31,144,464-31,144,553	primer3plusにより設計
ES細胞特異的 R+/S+/L- 2 (Merch1 遺伝子)	CGAAACACGCTCCGATGTA	GATCTGCAATGGGCTGAT	chr15:26,239,424-26,239,526	primer3plusにより設計
ES細胞特異的 R+/S+/L- 3 (Phf21b 遺伝子)	CGCCAACCTCAACAAATGG	CTATGCTGAAAGGGGCTGT	chr15:84684508+84684614	primer3plusにより設計
ES細胞特異的 R+/S+/L- 4 (Pofia3 遺伝子)	AGGCTACCAGGACTGACC	TTGAATCAACCGGAGACCTT	chr7:52621546+52621637	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L- 1 (Ttrp7 遺伝子)	AGTTTGCATTTGTGGAGGT	TCGCCAGATTAGGAAAAGG	chr13:56,996,999-56,997,103	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L- 2 (Slc6a11 遺伝子)	CACCCAGGTGCTCAGCTAAT	CCAGGCTCCTGACACTGATT	chr6:114,137,236-114,137,315	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L- 3 (Gpr97 遺伝子)	CAATTAGGCGCCAGGGTTAG	TCTTCTACAGGAGGCACTGG	chr8:97,552,427-97,552,521	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L- 4 (Cdh13 遺伝子)	GTCTCCATCTGGGGCTAAT	AGCCATCAGGAGGTAACAA	chr8:121,475,786-121,475,899	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L- 1 (Fam126b 遺伝子)	GTCCCAGGTGCTGAACCTGAT	TGCAATAAGGCTCTGGGTTT	chr1:58,673,226-58,673,308	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L- 2 (Fiq4 遺伝子)	TGCCACAACACACAGCTT	AGCACTGTCCATGGTCTAA	chr10:40,928,669-40,928,749	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L- 3 (Tll2 遺伝子)	GCTGCTGTCCATGGTGAAG	GGAAAGGAAGAAAGTCAAA	chr19:41,248,297-41,248,383	primer3plusにより設計
共通 R+/S+/L- 4 (Prima1 遺伝子)	AAGGACTGCCCTTCTTTTC	TGTAACATGCTGGTGGATG	chr12:104,442,994-104,443,088	primer3plusにより設計
Rps27a プロモーター	ATAAAGAACAGAGCAACG	GCCATGCTCACCCACATGA	chr11:29447829-29448000	primer3plusにより設計
転写活性性マーカー濃縮領域1	CTGAGAGCAGCAACAATGCTC	ACTCGAGTCAAGCAATCAGG	chr9:110207551-110207685	Mikkelsen et al., 2007
転写活性性マーカー濃縮領域2	GAAAAGAGCCTGCAGACCAG	GCCCATTTGCTCCACATGA	chr11:115375052-115375171	Mikkelsen et al., 2007
エンハンサーマーカー濃縮領域1	ACCACACCTGTAATCTGCCACC	GAAGTTAGAGGGGCTCTGTTCTAGTCAC	chr5:65,256,090-65,256,290	Chen et al., 2008
エンハンサーマーカー濃縮領域2	TGGATGTGGAGTAGCCGGCTCGAAGC	GCTGTGTGCTGGCATTAGAGCGGTGATT	chr6:72,737,347-72,737,523	Chen et al., 2008
Mage-a2 プロモーター	TTTGGTGGACAGGGAAGCTAGGGGA	CCTCCAGCAAAAATGGCCGAGA	chrX:151,467,832-151,468,073	Tachibana et al., 2008
遺伝子間領域2	TGAAGGGCAAGAGAGGAA	TGTCAGCAGATCTCCCACTG	chr8:45,155,220-45,155,316	primer3plusにより設計
Hox 領域1	GGTCCATTTTCTGCTTACG	TTGAAACAGGGAACACAGA	chr6:52,124,004-52,124,123	primer3plusにより設計
Hox 領域2	AGGATAGAACAACGGCCTTC	TGGATGTTCTTGAAGTGTCTC	chr6:52,143,221-52,143,300	primer3plusにより設計

mRNA-Seq

通常通り培養した ES 細胞、コントロール siRNA と Rest に対する siRNA をそれぞれ導入した ES 細胞の total RNA を用いた。RNA 1 μg と mRNA-Seq Sample Prep. Kit (Illumina)を用いて、次世代シーケンサー用のテンプレート調整を行った。調整したサンプルは Genome Analyzer Iix もしくは HiSeq2000 (Illumina)によりシーケンシングを行った。RefSeq の mRNA 内にマップしたタグ数から rpkm (Reads Per Kilobase of transcript per Million mapped reads)を算出し、発現量とした。

TSS-Seq

TSS-Seq 解析は ES 細胞と EpiS 細胞の RNA を用いて、Tsuchihara et al. 2009 で行われた通りに行った。TSS-Seq により得られたタグ情報はお互いに 500 bp の幅にするものをクラスター化して、そのクラスターに含まれるタグ数を TSS-Seq により得られた全タグ数によって標準化して ppm (Parts-Per-Million) を算出した。クラスターから 50 kbp 以内に含まれるに遺伝子モデルの 5'端が含まれる遺伝子関連付けを行い、その遺伝子の発現量とした。

共免疫沈降

ES 細胞の全細胞抽出物 200 μg を用いて、Universal Magnetic Co-IP Kit (Active motif) の付属の説明書の通りに共免疫沈降を行った。タンパク質の定量は BCA Protein Assay (Thermo Fisher Scientific)と NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific)を用いて、BCA 法により測定した。抗体は anti-SIN3A (Santa Cruz Biotechnology; sc-994)、SUZ12 (abcam; ab12073)、LSD1 (abcam; ab17721)、REST (Millipore; 07-579)をそれぞれ 2 μg ずつ免疫沈降反応に用いた。

ウエスタンブロット

7.5%のポリアクリルアミドゲルを用いて SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った。泳動後のゲルを転写バッファー(4.8 mM Tris-HCl, 3.9 mM グリシン、20%メタノール)により、タンパク質をゲルに固定した。固定したゲルをトランスブロット SD セル(Bio-Rad)により、PVDF メンブレンに転写した(25 V、1 時間)。転写後のメンブレンを TBS-T (pH7.4)

(250 mM Tris-HCl, 26.8 mM KCl, 1.37 M NaCl, 0.1%Tween-20)で洗浄し、ブロッキングバッファー(1xTBS-T, 5%スキムミルク)につけて 4°Cで一晩ブロッキングした。ブロッキング後のメンブレンを TBS-T で洗浄し、5%スキムミルクを含む TBS (pH7.4) (250 mM Tris-HCl, 26.8 mM KCl, 1.37M NaCl)で一次抗体 anti-TET1(Millipore; 09-872)もしくは LSD1 (abcam; ab17721)を 1:1000 で希釈した希釈液につけて、室温で 1 時間振盪して一次抗体との反応を行った。TBS-T により 4 回洗浄した後、Can Get Signal Solution 2 (TOYOBO)で 二次抗体 Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling Technology; #7074)を 1:10000 で希釈した希釈液につけて、室温で 1 時間振盪した。再び、TBS-T で 4 回洗浄した後、ECL Plus Western Blotting Detection System(GE ヘルスケア)と LAS-1000plus(富士フィルム)を用いて、目的のタンパク質のバンドの検出を行った。

使用した外部のデータ

以下の、GEO Dataset に登録されている外部データを用いた。

GSM611192	GSM611192_Tet1_C_shSCR.bowtie.bed	Williams et al. 2011
GSM611193	GSM611193_Tet1_C_shTet1.bowtie.bed	
GSM611194	GSM611194_Tet1_N_shSCR.bowtie.bed	
GSM611195	GSM611195_Tet1_N_shTet1.bowtie.bed	
GSM611198	GSM611198_IgG_ChIP.bowtie.bed	コントロール
GSM288345	ES_Nanog	Chen et al. 2008
GSM288346	ES_Oct4	
GSM288347	ES_Sox2	
GSM288348	ES_Smad1	
GSM288349	ES_E2f1	
GSM288350	ES_Tcfcp2I1	
GSM288351	ES_CTCF	
GSM288352	ES_Zfx	
GSM288353	ES_STAT3	
GSM288354	ES_Klf4	
GSM288355	ES_Esrrb	
GSM288356	ES_c-Myc	
GSM288357	ES_n-Myc	
GSM288358	ES_GFP	コントロール
GSM288359	ES_p300	
GSM288360	ES_Suz12	

GSM687284	mES_Mi-2b	Whyte et al. 2012
GSM845235	CoREST_ChipSeq	
GSM687289	WCE-DMSO-t0_ChipSeq	コントロール

Chen et al. 2008 と Whyte et al. 2012 のデータは mm8 のマウスゲノムにマッピングしたデータであったため、ピークを検出した後、他のデータと合わせるために LiftOver (Hinrichs 2006)を用いて、mm9 の座標に変換した。ピーク検出のコントロールにはそれぞれの研究で用いられていたコントロールを使用した。

データ処理について

本研究のデータ処理は主に東京大学医科学研究所ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピュータを利用して行った。テキスト処理にはプログラミング言語である Perl を、統計処理には R を用いた。シークエンスファイルの変換には SAMtools(Li et al. 2009)及び BEDTools (Quinlan and Hall 2010)を用いた。シークエンスタグを表示には Integrative Genomics Browser を用いた(Robinson et al. 2011; Thorvaldsdóttir et al. 2013)。

シークエンスデータについて

本研究によって得られたシークエンスデータは下記のアクセッション番号で DDBJ Sequence Read Archive (http://trace.ddbj.nig.ac.jp/dra/index_e.html)に登録した。

DRA001248	ES 細胞のデータ
DRA001249	EpiS 細胞のデータ

3. ES 細胞における Rest 複合体結合部位の同定と解析

3-1. 結果

マウス ES 細胞の ChIP-Seq

Rest 複合体の構成因子のゲノム上での結合部位を網羅的に同定するために、マウス ES 細胞である E14TG2a 株において、転写因子 Rest と転写補因子 Sin3A とヒストン脱メチル化酵素 Lsd1 の ChIP-Seq を行った。また、RNA polymerase II (Pol2) と転写開始にかかわるヒストン修飾である H3K4me3 と H3K9/14ac (H3ac)、エンハンサーのマーカである H3K4me1 と H3K27ac、転写抑制にかかわる H3K27me3、ヘテロクロマチンにかかわる H3K9me2 と H3K9me3 についても同様に行った(表 3-1) (Kim et al. 2010; Koch et al. 2007; Rada-Iglesias et al. 2011; Creyghton et al. 2010; Barski et al. 2007; Rosenfeld et al. 2009)。ChIP による濃縮の確認は qPCR により行った(図 4-3、4)。

表 3-1. Pol2 とヒストン修飾

マーカー	機能	参考文献
RNA polymerase II	転写、エンハンサー活性	Kim et al, 2010
H3K4me3	転写活性化	Koch et al, 2007
H3K9/14ac	転写活性化	Koch et al, 2007
H3K4me1	エンハンサー活性	Rada-Iglesias et al, 2011
H3K27ac	エンハンサー活性	Creyghton et al, 2010
H3K27me3	転写抑制	Barski et al, 2007
H3K9me2	ヘテロクロマチン	Rosenfeld et al, 2009
H3K9me3	ヘテロクロマチン	Rosenfeld et al, 2009

Hiseq2000 を用いて、ES 細胞の ChIP-DNA 及びコントロールとして断片化した DNA の総体である WCE (Whole Cell Extract) -DNA をシーケンスした。それぞれの DNA の片側 36 bp をシーケンスし、以下のタグ数を得た(表 3-2)。

表 3-2. ES 細胞の ChIP-Seq により得られたシーケンスタグ数

	WCE	Rest	Sin3A	Lsd1	RNA Pol II	H3K4me3
シーケンスにより得られたタグ数	69,356,349	77,544,390	22,155,239	31,635,534	76,384,985	53,452,578
ピーク検出に用いたタグ数		77,544,390	22,155,239	31,635,534	76,384,985	53,452,578
	H3K9K14ac	H3K4me1	H3K27ac	H3K27me3	H3K9me2	H3K9me3
シーケンスで得られたタグ数	52,918,687	31,601,482	40,509,371	291,633,092	109,697,071	58,881,878
ピーク検出に用いたタグ数	52,918,687	31,601,482	40,509,371	60,000,000	70,000,000	58,881,878

Oct4、Nanog、Sox2、Klf4、E2f1、Esrrb、Ctcf、n-Myc、c-Myc、Smad1、Stat3、Tcfep2l1、Zfx、Suz12 と p300 の ChIP-Seq に関しては、Chen et al. 2008 においてマウス ES 細胞 E14 株で行われたデータを用いた。CoRest と Mi-2b に関しては、Whyte et al., 2012 において v6.5 マウス ES 細胞で行われたデータを用いた。Tet1 の ChIP-Seq のデータに関しては、Williams et al. 2011b において E14TG2a 株を用いて行われたデータを使用した。

ChIP-Seq のピークの検出

ChIP-Seq のシーケンスタグからピークの検出を行うために、現在、最もよく使われている ChIP-Seq 用のピーク検出ソフトウェアの一つである MACS を用いた(Zhang et al. 2008)。MACS では、PCR やシーケンシングの偏りによって生じる同じ位置のタグを除くために、シーケンスされたタグの数に対して過度に存在する同じ位置のタグが除去される(二項分布で $p < 10^{-5}$)。ソニケーションにより断片化された DNA のうち実際シーケンスされた DNA 断片の正確な断片長は不明なため、フォワードストランドとリバースストランドにマップしたタグでそれぞれピークを作成し、そのピーク間の距離から DNA 断片の長さ d を推定して、各タグを $d/2$ ずつシフトさせる(図 3-1)。その後、シーケンスタグの分布をポアソン分布でモデル化して、有意にタグが濃縮されているピークを検出する。

ここでは示していないが、重複するタグの除去後の ChIP サンプルとコントロールのタグ数の差に依存してピークの p 値が変化したので、重複するタグの除去後のタグ数の差が相互に 10%以内に収まるように、あらかじめランダムにタグをサンプリングしてから MACS で処理を行った。Rest の ChIP-Seq のデータを例に示すと、重複を除去した後のタグ数がコントロールでは 51,352,112 tags であったのに対して、ChIP サンプルでは 28,111,423 tags と少なかったため、重複を除く前のコントロールのタグからランダムに 30,000,000 tags を抽出した。重複を除いた結果、Rest の ChIP サンプルでは 28,111,423 tags に対してコントロール 26,780,200 tags となり、その差が相互に 10%以内に収まった。検出されたピークの数はいずれも p 値が 10^{-5} 以下では 194-220,614 か所、 10^{-10} 以下では 20-124,703 か所であった(表 3-3)。

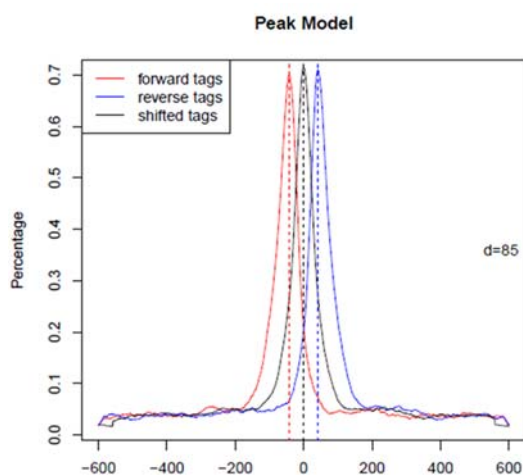


図 3-1. MACS のピークのモデル化

表 3-3. MACS で処理して得られたピーク数

サンプル名	Sin3A	Lcd1	Rest	RNA Pol II	H3K4me3	H3ac	H3K4me1	H3K27ac	H3K27me3	H3K9me2	H3K9me3
使用したタグ数(ChIP)	22,155,239	31,635,534	77,544,390	76,384,985	53,452,578	52,918,687	31,601,482	40,509,371	60,000,000	70,000,000	58,881,878
使用したタグ数(Control)	12,000,000	25,000,000	30,000,000	40,000,000	35,000,000	50,000,000	30,000,000	35,000,000	69,356,349	69,356,349	25,000,000
フイルター後のタグ数(ChIP)	11,071,364	21,605,373	28,111,423	34,657,290	31,538,529	39,480,231	27,718,351	31,311,271	51,772,526	48,140,914	22,968,714
フイルター後のタグ数(Control)	11,455,760	22,793,854	26,780,200	34,123,871	30,557,477	40,669,888	26,780,200	30,557,477	51,352,112	51,352,112	22,793,854
同じ位置の最大のタグ数(ChIP)	2	2	3	3	2	2	2	2	2	2	2
同じ位置の最大のタグ数(Control)	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
全ピーク数($p \leq 10^{-5}$)	31,836	53,508	86,651	87,894	66,585	39,696	220,614	92,796	93,342	27,339	192,576
ピーク数($p \leq 10^{-10}$)	8,816	15,923	7,055	44,854	18,654	23,761	124,703	53,704	26,291	4,045	104,679
サンプル名	Oct3/4	Nanog	Sox2	Stat3	Smad1	Esrrb	Tcfcp2l1	Klf4	c-Myc	n-Myc	E2f1
使用したタグ数(ChIP)	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,338,896	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466
使用したタグ数(Control)	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,338,896	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466
フイルター後のタグ数(ChIP)	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,338,896	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466
フイルター後のタグ数(Control)	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,338,896	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466
同じ位置の最大のタグ数(ChIP)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
同じ位置の最大のタグ数(Control)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
全ピーク数($p \leq 10^{-5}$)	4,283	10,886	5,887	3,915	945	57,435	30,127	19,488	3,475	10,123	22,091
ピーク数($p \leq 10^{-10}$)	1,217	5,101	2,012	841	219	29,788	16,629	6,761	1,274	3,822	14,064
サンプル名	Zfx	Ctcf	Suz12	p300	CoRest	Mi-2b	Tet1 C shSCR	Tet1 C shTet1	Tet1 N shSCR	Tet1 N shTet1	
使用したタグ数(ChIP)	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	9,096,265	10,208,435	27,500,000	28,000,000	27,000,000	28,000,000	
使用したタグ数(Control)	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	9,999,999	10,483,749	27,870,015	27,870,015	27,870,015	27,870,015	
フイルター後のタグ数(ChIP)	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	9,026,515	10,135,254	25,539,717	25,565,374	25,479,278	25,520,185	
フイルター後のタグ数(Control)	3,578,466	3,578,466	3,578,466	3,578,466	9,290,760	9,702,819	25,708,373	25,708,373	25,708,373	25,708,373	
同じ位置の最大のタグ数(ChIP)	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	
同じ位置の最大のタグ数(Control)	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	
全ピーク数($p \leq 10^{-5}$)	23,437	48,604	5,240	194	3,873	18,120	103,539	2,372	65,896	2,582	
ピーク数($p \leq 10^{-10}$)	9,594	36,928	2,562	20	531	6,338	40,061	481	21,047	529	

Rest 複合体の結合部位におけるコンセンサス配列

MACS から検出された p 値が 10^{-10} 以下のピークを各因子の結合部位とした。Rest について 7,055 か所、Sin3A について 8,816 か所、Lsd1 について 15,923 か所の結合部位を同定した(表 3-3)。得られた結合配列に含まれる共通する配列モチーフを MEME-ChIP を用いて検出し、TOMTOM により JASPAR_CORE_2009 に登録されている脊椎動物の既知の転写因子モチーフとの比較を行った(Machanick and Bailey 2011; Gupta et al. 2007; Portales-Casamar et al. 2009) (図 3-2)。Rest において、最も有意なモチーフとして、Rest が結合することが知られている既知のコンセンサス配列である NRSE(Neuron-Restrictive Silencer Element)が検出された。Sin3A から検出されたモチーフに類似した既知の転写因子モチーフは見られなかった。Lsd1 からは、インスレーターやリプレッサーとして知られる転写因子 Ctfp のモチーフに類似した結合モチーフが検出された。

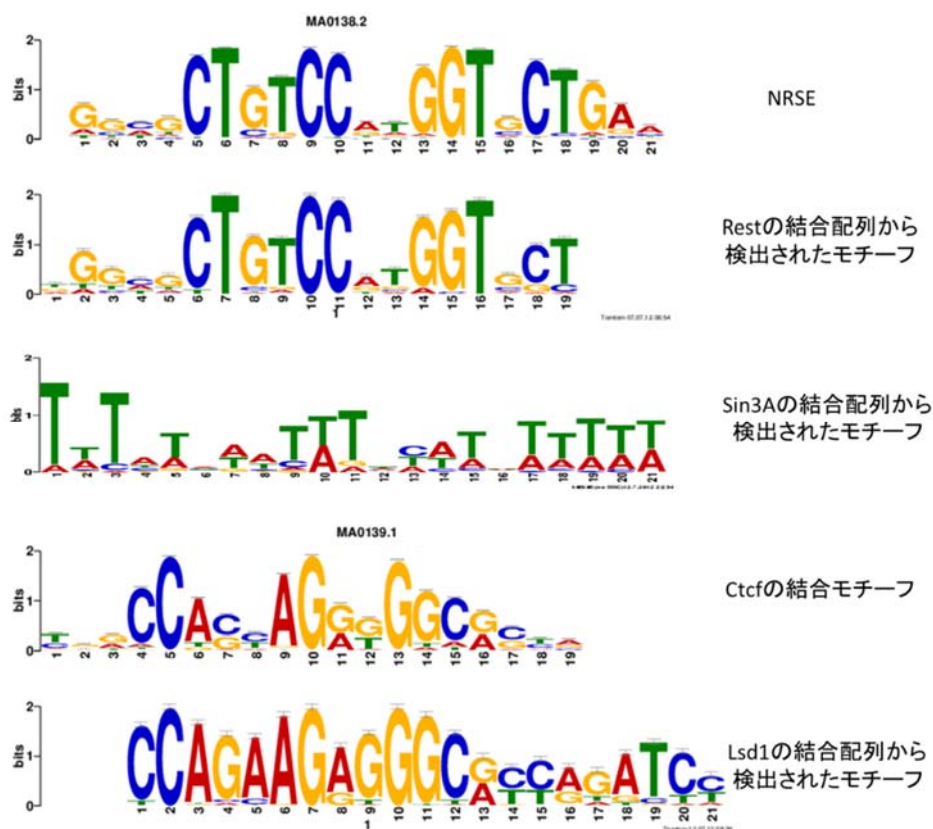


図 3-2. Rest、Sin3A、Lsd1 結合部位から検出されたモチーフと類似した既知のモチーフ Rest、Sin3A と Lsd1 の結合配列から検出された最も p 値の低いモチーフと、それに類似した既知の転写因子結合モチーフを示した。

さらに、入力配列に濃縮している既知のモチーフを検出するソフトウェア AME を用いて、結合配列に濃縮されている既知の転写因子結合モチーフを調べた (McLeay and Bailey 2010)。表 3-4 に p 値の低い順に 10 種のモチーフを示した。Rest と Sin3A の結合部位では REST の結合モチーフが最も有意に濃縮されていることが確認された。Sin3A では REST のほかに NFATC2、SP1、EWSR1-FLI1、NFKB1、Myf、Klf4 のモチーフが検出され、ここでは示していないが、n-Myc のモチーフが 14 番目 ($p=1.882 \times 10^{-12}$) に検出された。それに対して、Lsd1 では KLF4 のモチーフが最も有意に濃縮しており、次いで SP1、STAT1、CTCF、Pou5f1 (Oct4)、Sox2 の順であった。ここでは示していないが、REST のモチーフも検出されており、その p 値の低さは 18 番目 ($p=2.06 \times 10^{-18}$) であった。すべての因子から Sp1 の結合モチーフが検出されていたが、Sp1 のモチーフがシトシンの反復配列であるため検出されやすかったからだと考えられる。EWSR1-FLI1 はユーイング肉腫で見られる融合遺伝子である (Sankar et al. 2013)。mRNA-Seq の結果から、ES 細胞において Ewsr1 は高発現であったが、DNA 結合ドメインを持つ Fli1 の発現は見られなかった。Stat1 は ES 細胞では低発現であったが、ES 細胞において高発現している Stat3 と同じモチーフに結合することが知られている (Chen et al. 2008)。Stat3 とゲノム上でクラスターを形成している Oct4 と Nanog が Sin3A 複合体と Lsd1 を含む NuRD 複合体と相互作用しているという報告がなされている (Liang et al. 2008)。Lsd1 については Oct4、Stat3 と Sox2 のモチーフが検出されておりその報告と一致していたが、Sin3A の結合配列からはいずれのモチーフの濃縮も検出されなかった。Sin3A は c-Myc や n-Myc と相互作用する転写因子である Max との相互作用が示されている (Laherty et al. 1997)。

以上の結果から、Sin3A は Nfkb1 や Myf や Klf4 など、Lsd1 は Ctfc と Klf4 などの Rest 以外の転写因子によってもリクルートされている可能性を示した。Sin3A の結合配列からは Oct4 及び Oct4 とクラスターを形成している転写因子の結合モチーフが検出されなかったことから、Sin3A が Oct4 と相互作用していない可能性を示した。

表 3-4. Rest、Sin3A、Lsd1 結合配列に濃縮されていた既知の転写因子結合モチーフ

Rest

motif name	secondary motif name	corrected p-value
MA0138.2	REST	2.44E-167
MA0138.1	REST	1.01E-127
MA0149.1	EWSR1-FLI1	6.99E-13
MA0152.1	NFATC2	9.13E-06
MA0079.2	SP1	8.14E-05
MA0164.1	Nr2e3	1.21E-04
MA0137.1	STAT1	1.24E-04
MA0041.1	Foxd3	1.36E-04
MA0039.2	Klf4	1.56E-04
MA0042.1	FOXI1	1.66E-04

Lsd1

motif name	secondary motif name	corrected p-value
MA0039.2	Klf4	3.63E-132
MA0079.2	SP1	8.11E-70
MA0137.2	STAT1	2.29E-57
MA0139.1	CTCF	2.04E-51
MA0142.1	Pou5f1	1.01E-49
MA0143.1	Sox2	2.29E-40
MA0073.1	RREB1	6.49E-37
MA0062.2	GABPA	6.10E-35
MA0062.1	GABPA	2.17E-31
MA0162.1	Egr1	6.53E-31

Sin3a

motif name	secondary motif name	corrected p-value
MA0138.2	REST	9.86E-47
MA0138.1	REST	6.67E-40
MA0079.2	SP1	2.93E-22
MA0149.1	EWSR1-FLI1	4.35E-22
MA0105.1	NFKB1	9.70E-20
MA0055.1	Myf	2.43E-19
MA0039.2	Klf4	3.71E-17
MA0156.1	FEV	7.97E-16
MA0116.1	Zfp423	3.36E-15
MA0062.2	GABPA	7.04E-15

Rest 複合体の結合の比較

Rest と Rest 複合体のその他の因子の結合の組み合わせが、Rest による制御にどのような影響を与えるのかを調べるためにグループ分けを行った(図 3-3)。Rest の結合部位 7,055 か所のうち、Sin3A や Lsd1 と共結合しているものをできるだけ除くために 10^{-5} 以下のピークと重複していない 4,602 か所を Rest だけが結合している Rest+Sin3A-Lsd1-の結合部位 (R+/S-/L-)とした。また、Rest+Sin3A+Lsd1-結合部位(R+/S+/L-)として Sin3A($p \leq 10^{-10}$)は重複しているが Lsd1($p \leq 10^{-5}$)とは重複していない 217 か所、Rest+Sin3A-Lsd1+の結合部位 (R+/S-/L+)として Sin3A($p \leq 10^{-5}$)とは重複していないが Lsd1($p \leq 10^{-10}$)と重複している 207 か所を同定した。さらに、すべてが結合している Rest+Sin3A+Lsd1+の結合部位(R+/S+/L+)として Sin3A と Lsd1(共に $p \leq 10^{-10}$)のピークの両方と重複している 744 か所を同定した。

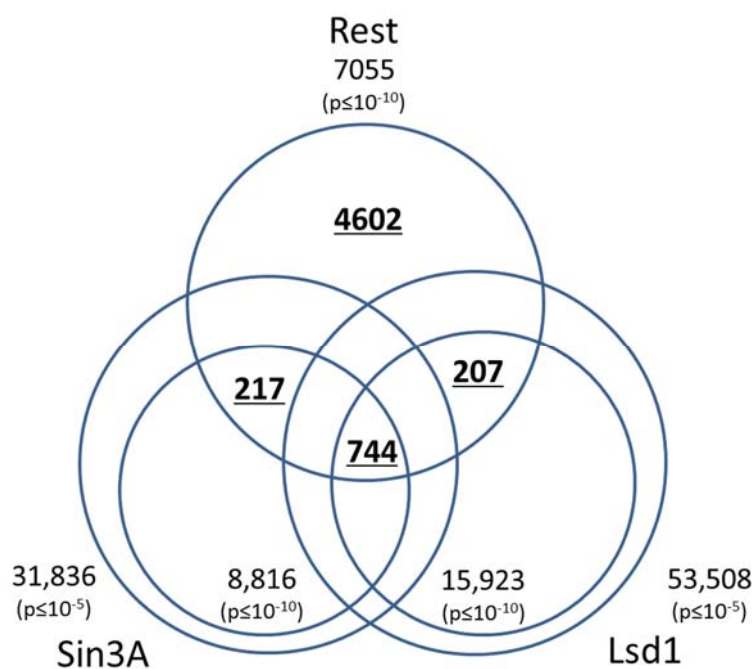


図 3-3. Rest 結合部位の Sin3A と Lsd1 との重複

Rest 複合体の結合遺伝子

各グループの Rest 結合部位から 10 kb 以内に Refseq に登録されている mRNA の転写開始点が存在する遺伝子のうち最も近傍の遺伝子を抽出し、それらを結合遺伝子とした。Rest 複合体は、全体で 1,602 遺伝子に、R+/S+/L+ で 392 遺伝子に、R+/S+/L- で 98 遺伝子に、R+/S-/L+ で 72 遺伝子に、R+/S-/L- で 710 遺伝子に結合していた。例として、図 3-4 に 4 つのタイプの Rest 結合部位を示した。これらの遺伝子はいずれも Rest が結合することが知られている(Johnson et al. 2008)。Celsr3 には Sin3A と Lsd1 の両方が結合していた。Mgat5b には Rest と Sin3A の結合が見られたが、Lsd1 の結合は検出できなかった。Trpc7 には Rest と Lsd1 の結合が見られたが、Sin3A の結合は検出できなかった。また、Fam155a には Rest 以外の因子の結合は検出されなかった。

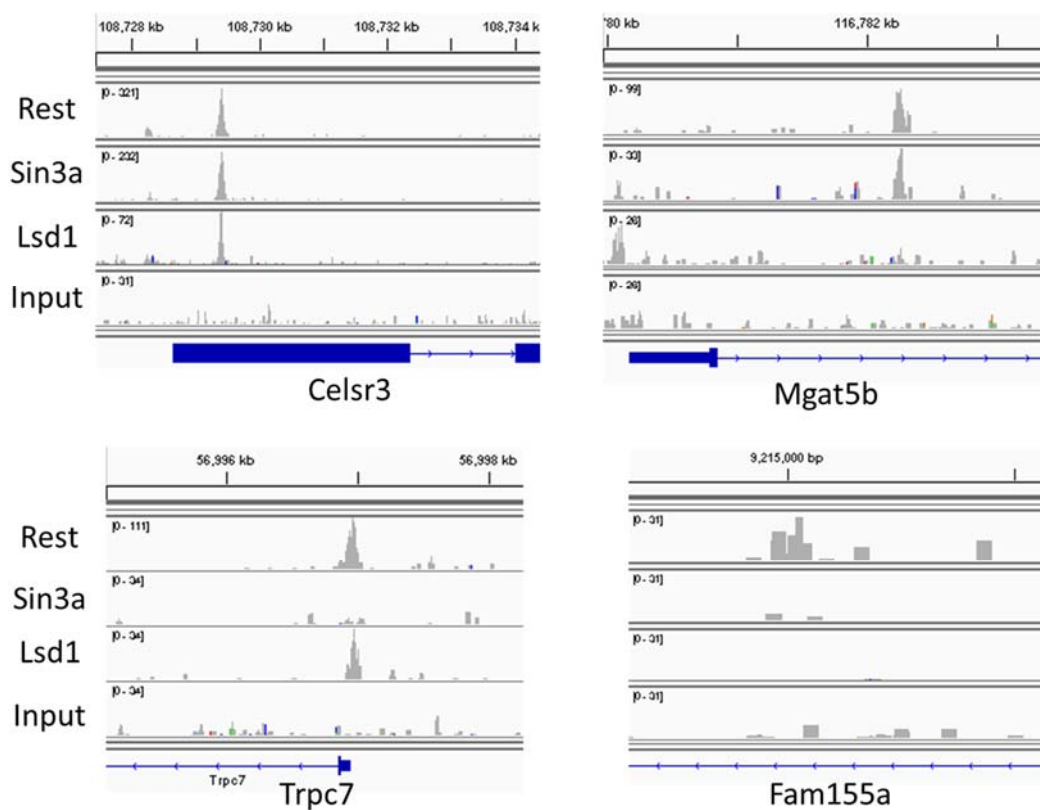


図 3-4. Rest 結合部位への Sin3A と Lsd1 の結合

Rest ノックダウンによる結合遺伝子の発現変化

Rest 複合体の結合様式の違いが、結合している遺伝子の発現制御にどのような影響を与えているのかを明らかにするために、Rest のノックダウン実験を行った。Rest に対する siRNA を導入することで、Rest の発現を約 1/3 に低下させることができた(図 3-5)。

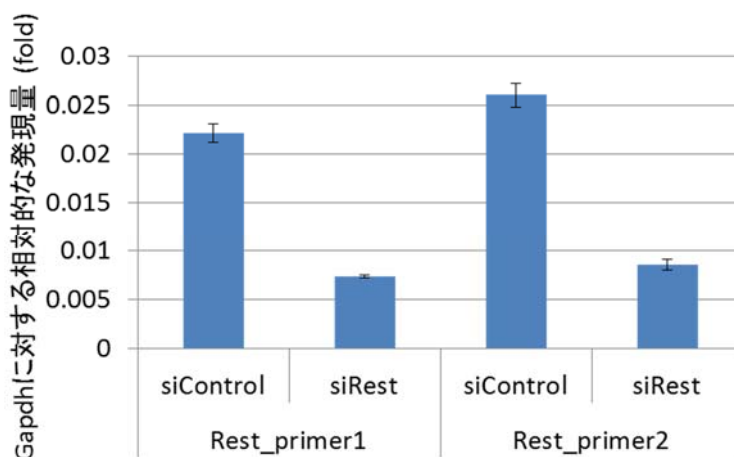


図 3-5. siRNA による Rest のノックダウン

コントロール siRNA を導入した ES 細胞と Rest の siRNA を導入した細胞での Rest の発現量を示した。 $\Delta\Delta$ Ct 法により計算し、コントロールとして Gapdh のプライマーを用いた。Rest 遺伝子内の別の位置に設計した 2 種類のプライマーを用いた。

mRNA-Seq を行い、各グループの Rest 結合遺伝子の Rest ノックダウンによる発現変化を調べた(図 3-6)。Sin3A と Lsd1 が両方とも結合している R+/S+/L+ の結合遺伝子でのみ、ノックダウンにより遺伝子の発現が上昇した。その他については、ノックダウンとコントロールの間に有意な差は見られなかった。Rest 複合体は Sin3A と Lsd1 が結合している場合に、顕著な遺伝子発現抑制を行っていた。これは Yu et al. 2011 によって示された Rest が Sin3 や CoRest の共結合している結合部位でのみ遺伝子の抑制を行うという報告と一致していた。

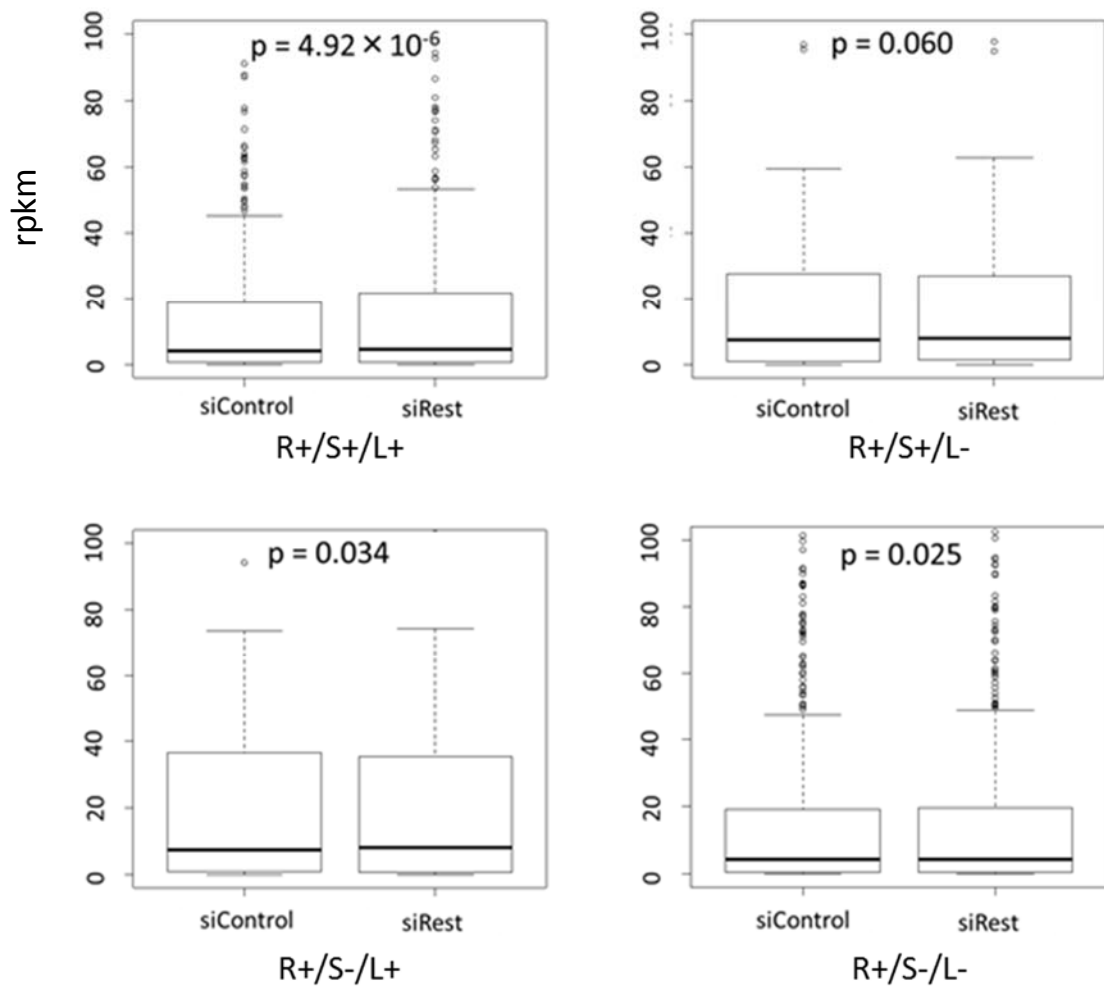


図 3-6. Rest 複合体の結合様式とノックダウン時の遺伝子変化の関係
 siControl と siRest を導入した際の 4 つの結合様式の Rest 複合体結合遺伝子群の遺伝子発現量の比較。p 値は t 検定により算出した。

Rest 複合体の結合様式とヒストン修飾

Rest 複合体は種々のヒストン修飾を行う酵素群をリクルートすることで遺伝子発現抑制を行っていることから、Rest 複合体の結合様式が結合部位周辺のヒストン修飾に影響を与えていると考えられた。各結合様式の Rest 複合体結合部位とヒストンマーカータとの重複を調べた(図 3-7)。Pol2、H3K4me3、H3ac、H3K4me1 と H3K27ac は 10^{-10} 以下のピークを、H3K27me3、H3K9me2 と H3K9me3 は 10^{-5} 以下のピークを修飾部位として用いた(表 3-3)。

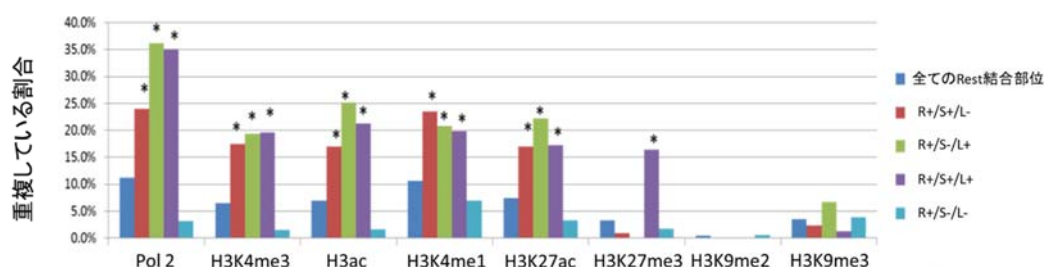


図 3-7. Rest 複合体の結合部位周辺の Pol2 の結合とヒストン修飾

各結合様式の Rest 複合体結合部位のクロマチンマーカータとの重複率。*は p 値が 0.01 以下のもの。p 値は Rest 結合部位全体($p \leq 10^{-10}$) を母集団とした超幾何分布の確率関数により計算した。

Rest が Sin3A と Lsd1 のいずれか、もしくは、両方と複合体を作っている場合、Pol2、H3K4me3、H3ac、H3K4me1 と H3K27ac の転写活性化とエンハンサー活性に関わるマーカータが有意に高い割合で検出された。それに対して、R+/S-/L-の結合部位には濃縮されているヒストン修飾は見られなかった。これは Yu et al. 2011 で示された傾向と一致しており、ここでは示さなかったが、R+/S-/L-の結合は主に遺伝子間領域に見られるのに対して、それ以外の Rest 複合体結合部位は遺伝子の近傍で検出される傾向が強いためだと考えられた。また、R+/S+/L+の結合部位のみで、抑制性の H3K27me3 の修飾が高い割合で見られた(図 3-8)。H3K27me3 は G9a を介してリクルートされる PRC2 が行う修飾である。マウス ES 細胞において、Rest のノックアウトによって一部の Rest 結合部位で H3K27me3 の修飾レベルが低下することが示されているが(Dietrich et al. 2012)、Rest 複合体はすべての因子が安定的に結合している部位で、抑制性の修飾を行って遺伝子の発現抑制を行っていることを新たに示した。

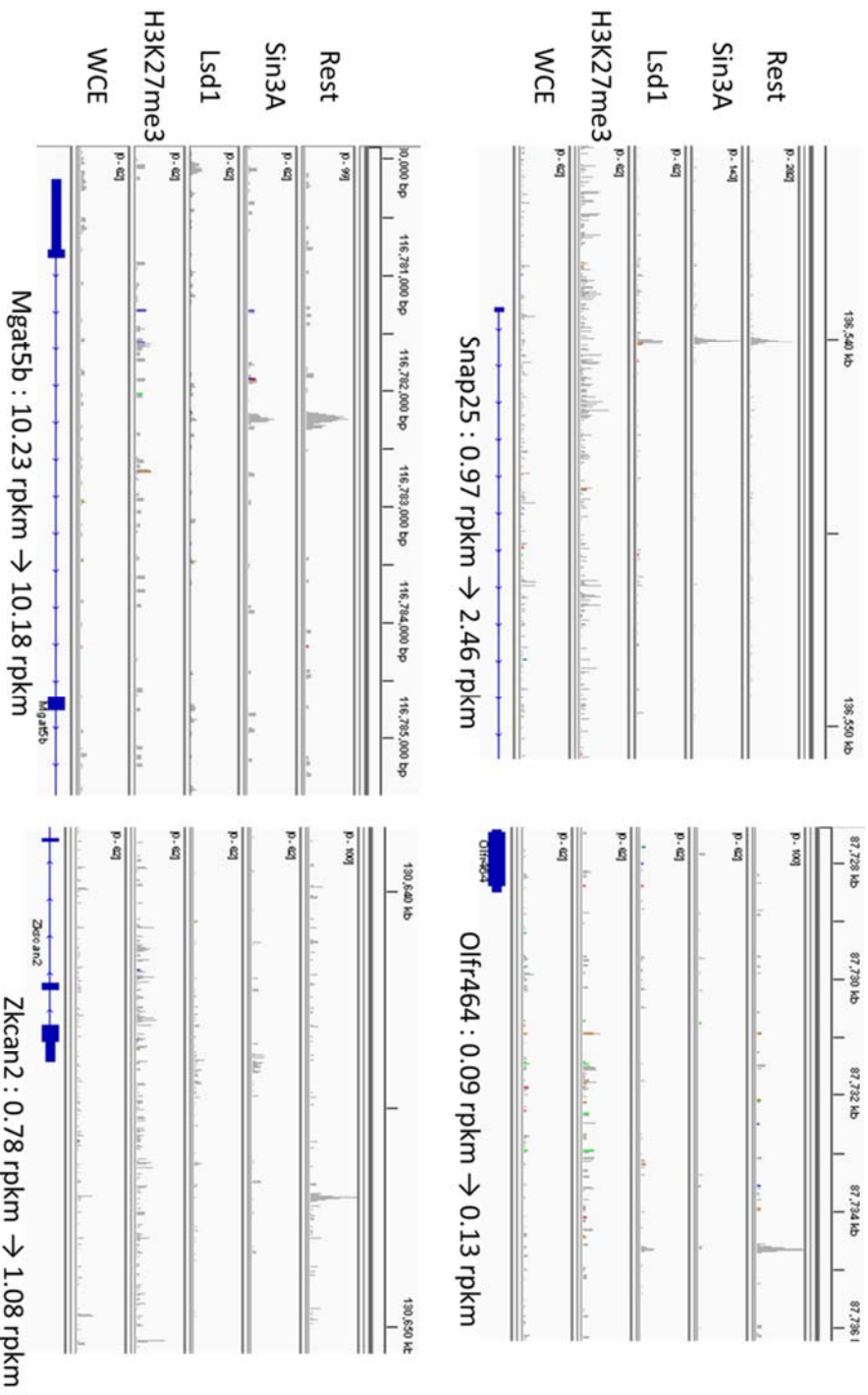


図 3-8. Rest 結合部位における H3K27me3 と Rest ノックダウンによる遺伝子発現変化
各図の下にコントロール siRNA を導入した ES 細胞での発現量と、Rest に対する siRNA を導入した
細胞での発現量を示した。

Rest 依存・非依存的な Sin3A と Lsd1 の結合部位

Sin3A と Lsd1 が Rest 依存的に結合しているときと Rest 非依存的に結合しているときとで、その働きにどのような違いがあるのかを調べるために、Sin3A と Lsd1 の結合部位を Rest と共局在しているグループとしていないグループに分類した(図 3-9)。Rest の結合部位のうち、p 値が 10^{-10} 以下の結合部位と重なる結合部位を”Rest 依存的な結合部位”とした。偽陰性をできるだけ除くために p 値が 10^{-5} 以下の結合部位と重ならないものを”Rest 非依存的な結合部位”とした。その結果、Sin3A は 1259 か所(14.9%)、Lsd1 は 1120 か所(7.0%)で Rest 依存的にゲノム上に結合していることが分かった。また、Rest 非依存的に、Sin3A が 6468 か所(73.8%)、Lsd1 が 13456 か所(84.5%)に結合していることを示した。Sin3A と Lsd1 の結合の大部分が Rest 非依存的なものであることが分かった。ES 細胞において、Lsd1 と Sin3A は 7 割以上が Rest とは独立にゲノム上に結合していることを示した。

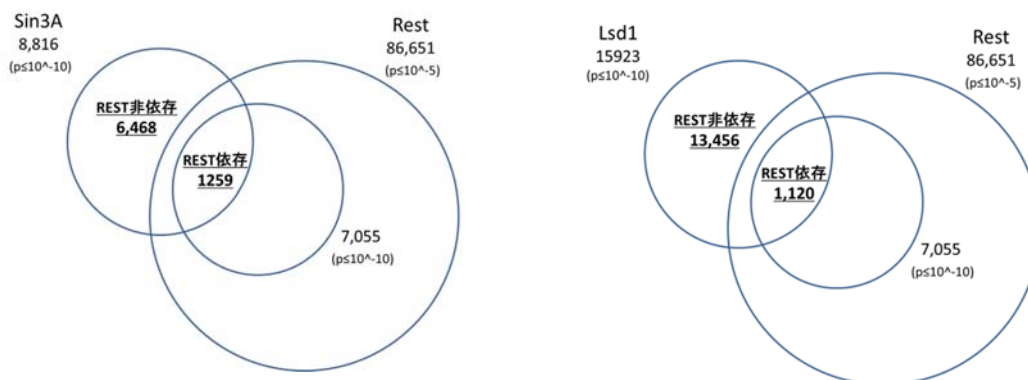


図 3-9. Rest、Sin3A と Lsd1 の結合サイトの比較

REST 依存・非依存の Sin3A と Lsd1 の結合遺伝子

Rest 依存・非依存的に結合している Sin3A と Lsd1 の機能の違いを調べるために、それぞれが結合している遺伝子を調べた。結合部位から 10 kb 以内に Refseq に登録されている mRNA の転写開始点が存在する遺伝子のうち最も近傍に存在する遺伝子を抽出し、結合遺伝子とした。Rest 依存的な結合遺伝子は、Sin3A では 629 遺伝子、Lsd1 では 537 遺伝子であった。Rest 非依存的な結合遺伝子は、Sin3A では 4316 遺伝子、Lsd1 では 4975 遺伝子であった。これらの遺伝子について、GO (Gene Ontology)解析を行った(表 3-5)。

表 3-5. Rest 依存・非依存の Sin3A と Lsd1 の結合遺伝子の GO 解析

process	Rest依存的なSin3Aの結合遺伝子	全遺伝子中の数	p値	process	Rest非依存的なSin3Aの結合遺伝子	全遺伝子中の数	p値
transport	95	1569	6.58E-09	transcription, DNA-dependent	553	1579	5.80E-31
ion transport	44	539	4.20E-08	regulation of transcription, DNA-dependent	577	1683	1.48E-29
regulation of membrane potential	11	45	1.82E-07	cell cycle	209	486	1.17E-23
regulation of ion transmembrane transport	18	142	1.16E-06	phosphorylation	241	650	4.83E-17
neurotransmitter secretion	7	19	1.54E-06	chromatin modification	99	203	3.72E-16
synaptic transmission	14	97	3.83E-06	protein transport	180	469	1.26E-14
neurotransmitter transport	9	39	4.07E-06	protein phosphorylation	207	572	1.39E-13
nervous system development	22	253	4.08E-05	in utero embryonic development	93	209	2.72E-12
neuron differentiation	10	67	6.90E-05	negative regulation of transcription, DNA-dependent	150	399	1.30E-11
process	Rest依存的なLsd1の結合遺伝子	全遺伝子中の数	p値	process	Rest非依存的なLsd1の結合遺伝子	全遺伝子中の数	p値
ion transport	40	539	3.29E-08	transcription, DNA-dependent	670	1579	3.94E-48
transport	82	1569	4.45E-08	regulation of transcription, DNA-dependent	699	1683	2.61E-46
regulation of ion transmembrane transport	18	142	1.16E-07	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	278	602	1.22E-26
nervous system development	22	253	3.52E-06	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	217	451	8.03E-24
potassium ion transport	15	136	7.57E-06	positive regulation of transcription, DNA-dependent	220	488	1.02E-19
regulation of transcription, DNA-dependent	78	1683	1.03E-05	negative regulation of transcription, DNA-dependent	188	399	1.53E-19
ion transmembrane transport	14	133	2.58E-05	multicellular organismal development	329	824	1.81E-18
regulation of membrane potential	8	45	3.42E-05	cell cycle	196	486	6.07E-12
synaptic transmission	11	97	9.54E-05	cell differentiation	210	531	9.45E-12
neuron differentiation	9	67	1.11E-04	chromatin modification	98	203	1.30E-11

p 値は超幾何分布の確率関数により計算した。

Rest 依存的な Sin3A と Lsd1 の結合遺伝子群には、Rest の主なターゲットである神経にかかわる機能を持った遺伝子が有意に濃縮されていた(Johnson et al. 2008; Whyte et al. 2012)。Rest 非依存的な Sin3A の結合遺伝子群には、主に転写制御、細胞周期、リン酸化、ヒストン修飾、タンパク質輸送や胚発生に関わる遺伝子が濃縮されていた。Rest 非依存的な Lsd1 の結合遺伝子群においても、転写制御、細胞周期、細胞分化、クロマチン修飾に関わる遺伝子が濃縮されていた。

ES 細胞で行った mRNA-Seq のデータを用いて、各結合遺伝子群の転写量を比較した(図 3-10)。1 rpkm 以上の発現量を示した遺伝子の割合を比べたところ、Rest 依存的な Sin3A と Lsd1 の結合遺伝子ではそれぞれ 65%、67%であったのに対して、Rest 非依存的な Sin3A と Lsd1 の結合遺伝子では 92%、88%であった。Sin3A 及び Lsd1 は Rest 非依存的に結合している場合、高い割合で転写されている遺伝子に結合していることを示した。Rest 非依存的な Lsd1 の結合に関して、Lsd1 が活性型のエンハンサーに結合していることが知られている(Whyte et al. 2012)。Rest 非依存的な Lsd1 の結合が、発現している遺伝子の周囲で観察されたことは、Lsd1 が活性型のエンハンサーに結合していることによる影響も考えられる。

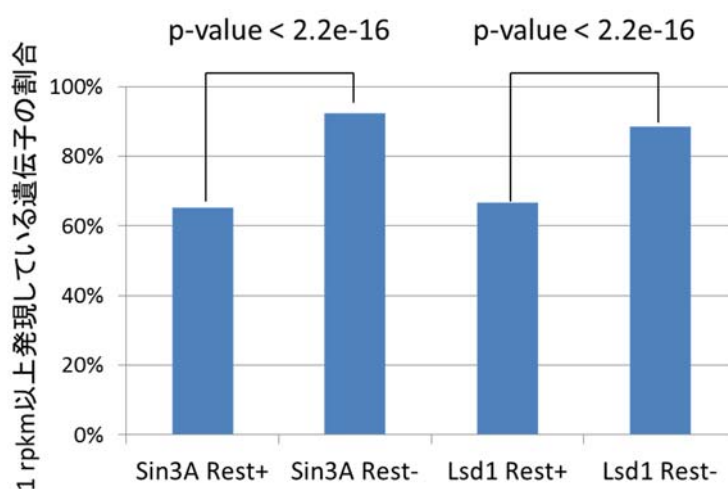


図 3-10. Rest 依存・非依存 Sin3A と Lsd1 の結合遺伝子の発現
それぞれの結合遺伝子のうち、mRNA-Seq により測定した発現量が 1 rpkm 以上の遺伝子の割合を示した。p 値は Fisher の正確確率検定により計算した。

Rest 依存・非依存的な Sin3A と Lsd1 結合部位とヒストン修飾の比較

Rest 依存・非依存的に結合している Sin3A と Lsd1 がヒストン修飾に与える影響がどのように異なるのかを調べるために、ヒストン修飾との比較を行った。Pol2、H3K4me3、H3ac、H3K4me1 と H3K27ac は 10^{-10} 以下のピークを、H3K27me3、H3K9me2 と H3K9me3 は 10^{-5} 以下のピークを用いた。Rest 依存・非依存的な Sin3A と Lsd1 の結合部位とこれらのマーカーとの重複を調べた(図 3-11)。

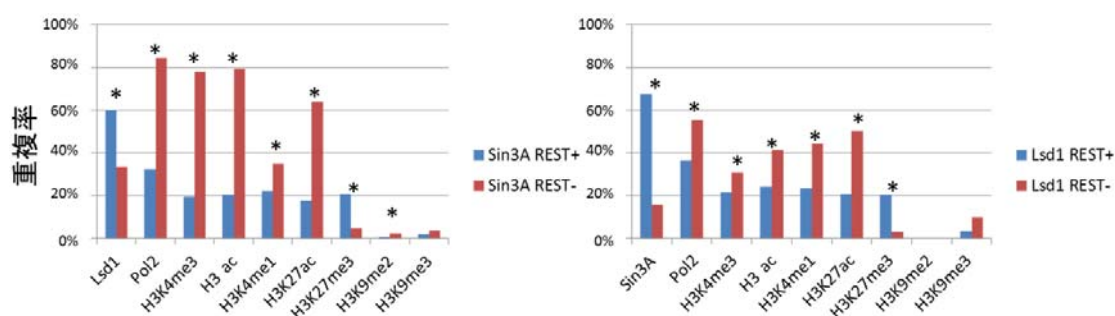


図 3-11. Rest 依存・非依存 Sin3A と Lsd1 結合部位とヒストン修飾

Rest 依存・非依存的な Sin3A と Lsd1 の結合部位とヒストン修飾マーカーの重複の割合。

*は p 値が 0.01 以下のもの。p 値は Rest 依存・非依存的な結合の間で Fisher の正確確率検定により計算した。

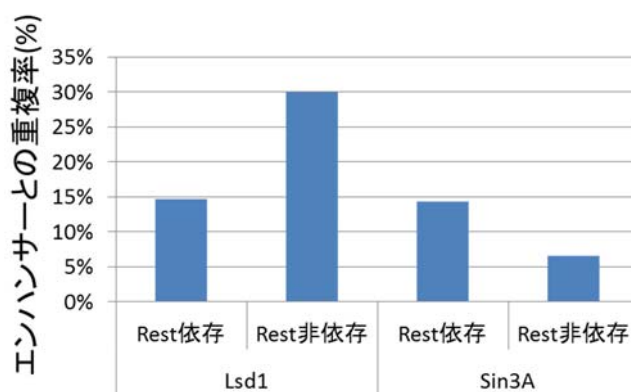


図 3-12. Rest 依存・非依存 Sin3A と Lsd1 の結合部位とエンハンサーとの比較

Rest 依存・非依存的に結合している Sin3A と Lsd1 のエンハンサーとの重複率。Rest 依存と非依存で Fisher の正確確率検定により計算した結果、p 値は両者とも 2.2×10^{-16} 以下であった。

Rest 非依存的な Sin3A と Lsd1 は、転写活性化に関わり転写開始点付近に見られる H3K4me3 と H3ac、エンハンサーで見られる H3K4me1 と H3K27ac や転写開始点付近とエンハンサーの両方に見られる Pol2 が、Rest 依存的な結合部位よりも高い割合で観察された。特に Rest 非依存的な Sin3A 結合部位では Pol2、H3K4me3 と H3ac が 8 割程度と非常に高い割合で重なっていた。これは、Sin3A がプロモーター領域の CpG アイランドに結合する Tet1 と相互作用して共局在しているという報告と矛盾しない結果である(Williams et al. 2011b)。また、Rest 非依存的な Lsd1 の結合部位では、H3K4me1 と H3K27ac が 5 割程度と高い割合で検出された。それに対して、Sin3A と Lsd1 の Rest 依存的な結合部位では発現抑制にかかわる H3K27me3 が高い割合で検出された。これは、Sin3A と Lsd1 と共結合している Rest の結合部位に見られた H3K27me3 を反映していると考えられる(図 3-7)。

H3K4me1 や H3K27ac の修飾は転写開始点付近でも観察されることが知られており(Barski et al. 2007)、必ずしも H3K4me1 が見られる領域がエンハンサー領域というわけではない。エンハンサーでは H3K4me1 の修飾が高レベルであり、転写に関わる H3K4me3 の修飾が低レベルであることが知られている(Kim et al. 2010)。H3K4me1($p \leq 10^{-10}$) のピークが検出された領域のうち H3K4me3($p \leq 10^{-5}$) のピークが検出されなかった領域をエンハンサーとして定義して、Sin3A と Lsd1 の結合部位との比較を行った(図 3-12)。Rest 非依存的な Sin3A は 5%程度と重複している割合が少なかったが、Rest 非依存的な Lsd1 は 30%程度がエンハンサーに結合していることを示した(図 3-13)。Lsd1 は ES 細胞において活性型のエンハンサーに結合していることが示されており(Whyte et al. 2012)、今回の結果からも確認できた。

また、Rest 依存的な結合と比べると割合は低かったが、2000 か所以上で Sin3A と Lsd1 が Rest 非依存的に共局在していることが明らかになった(図 3-11, 3-13)。このことから、Sin3A と Lsd1 の両者を Rest 非依存的にリクルートする転写因子が存在している可能性が考えられた。

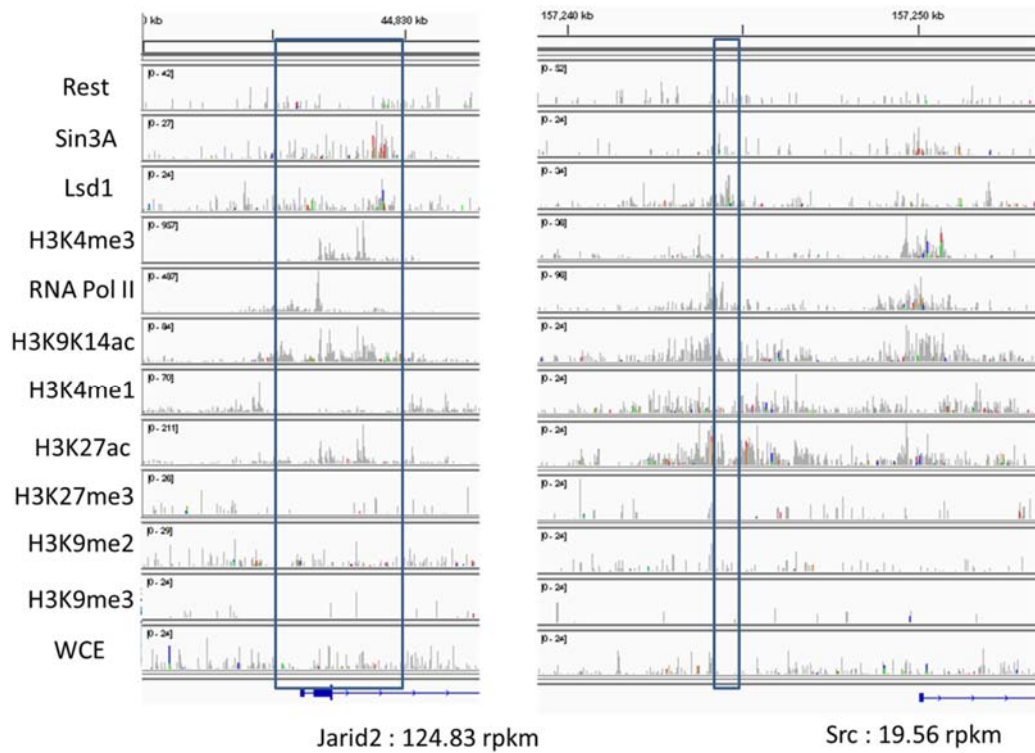


図 3-13. Rest 非依存的な Sin3A と Lsd1 の結合部位とヒストン修飾
 左は Jarid2 の転写開始点付近への Sin3A と Lsd1 の結合。右は Src のエンハンサーへの Lsd1 の結合。

ES 細胞の重要な転写因子の結合部位と Sin3A と Lsd1 の結合部位の比較

ES 細胞の重要な転写因子について、多能性維持に関わる転写因子である Oct4、Nanog、Sox2、Smad1 と Stat3 が Oct4 centric module、自己複製に関わる転写因子 c-Myc、n-Myc、Zfx、E2F1 が Myc-centric module と呼ばれるクラスターをゲノム上で形成していることが示されている(Chen et al. 2008; Ng and Surani 2011)。また、転写因子 Klf4、Esrrb、Tcfcp2l1 は Oct4-centric module と Myc-centric module の両方に含まれていることが知られている。また、Sin3A と Lsd1 がこれらの転写因子と関係していることが知られている。Sin3A 複合体と Lsd1 を含む NuRD 複合体が Oct4 と Nanog と相互作用していることが報告されている(Liang et al. 2008; Whyte et al. 2012)。Lsd1 と c-Myc については、ラット繊維芽細胞において相互作用が示されてる(Amente et al. 2010)。本研究の解析からも、Sin3A の結合配列には Klf4 の結合モチーフが、Lsd1 の結合配列には Ctfc、Klf4、既知の Oct4、Stat3 と Sox2 の結合モチーフがそれぞれ濃縮されていることを示した(表 3-4)。

ES 細胞において、重要なこれらの転写因子と Sin3A と Lsd1 との関係を明らかにするために、Rest 依存・非依存の Sin3A と Lsd1 の結合部位を、Oct4-centric module と Myc-centric module の転写因子を含む 13 種類の転写因子と PRC2 のサブユニットである Suz12 を含む 2 種類のクロマチン修飾酵素の ChIP-Seq データ(Chen et al. 2008)と比較した。また、Lsd1 と相互作用することが知られている CoRest と NuRD 複合体のサブユニットである Mi2-b の ChIP-Seq のデータ(Whyte et al. 2012)との比較も行った。MACS により検出された p 値が 10^{-5} 以下のピークを解析に用いた(表 3-3)。Rest 依存・非依存の結合部位のうち、各因子と重複している割合を調べ、Rest 依存と非依存の間で差があるのかを検定した(図 3-14)。

Myc-centric module の転写因子は Rest 非依存的に結合している Sin3A と Lsd1 の両者と高い割合で共局在していた(図 3-15)。Oct4-centric module の転写因子は Rest 非依存的な Lsd1 とは高い割合で重複していたが、Sin3A とは Nanog 以外の転写因子は Rest 非依存と依存で有意な差は見られず、重複している割合はいずれも 6%以下とほかの因子と比べてかなり低い割合であることが分かった。モチーフ検索の結果からも Sin3A の結合配列から Oct4 のモチーフは検出されておらず(表 3-4)、Sin3A と Oct4 との相互作用が報告されているが、実際は Sin3A が Oct4 と相互作用して結合している割合は非常に少ないことが示唆された。Rest 非依存の Lsd1 はリプレッサーである Ctfc とともに高い割合で共局在していることを示した。Ctfc の結合モチーフは Lsd1 のモチーフ解析からも検出されていた(図 3-2、表 3-4)。

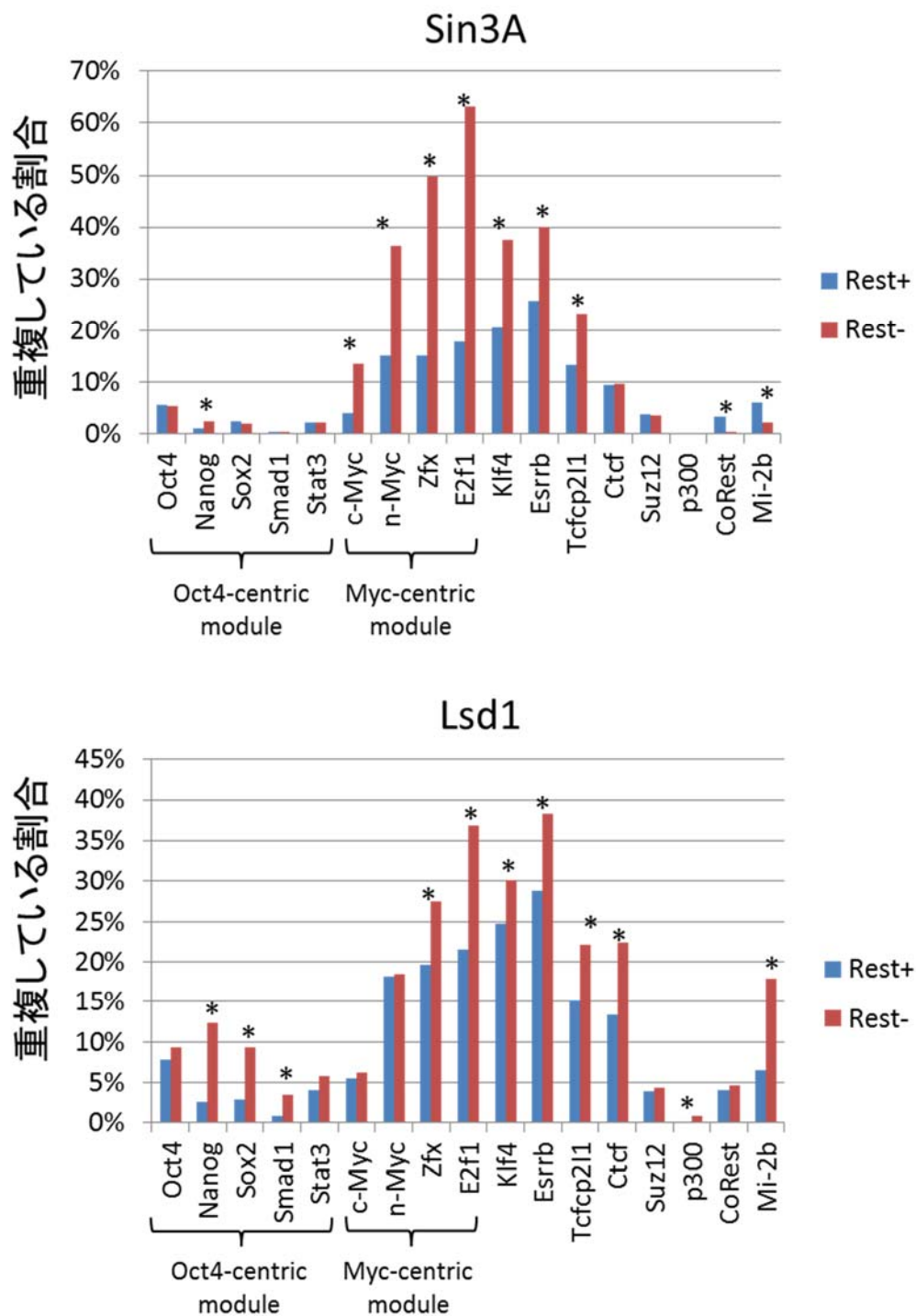


図 3-14. Nanog、Oct4、Sox2 と Rest 依存・非依存の Sin3A・Lsd1 結合部位の重複率
 ES 細胞で重要な転写因子と Rest 依存・非依存的に結合している Sin3A と Lsd1 の結合部
 位の重複率の比較。*は p 値が 0.01 以下のもの。p 値は Fisher の正確確率検定により計
 算した。

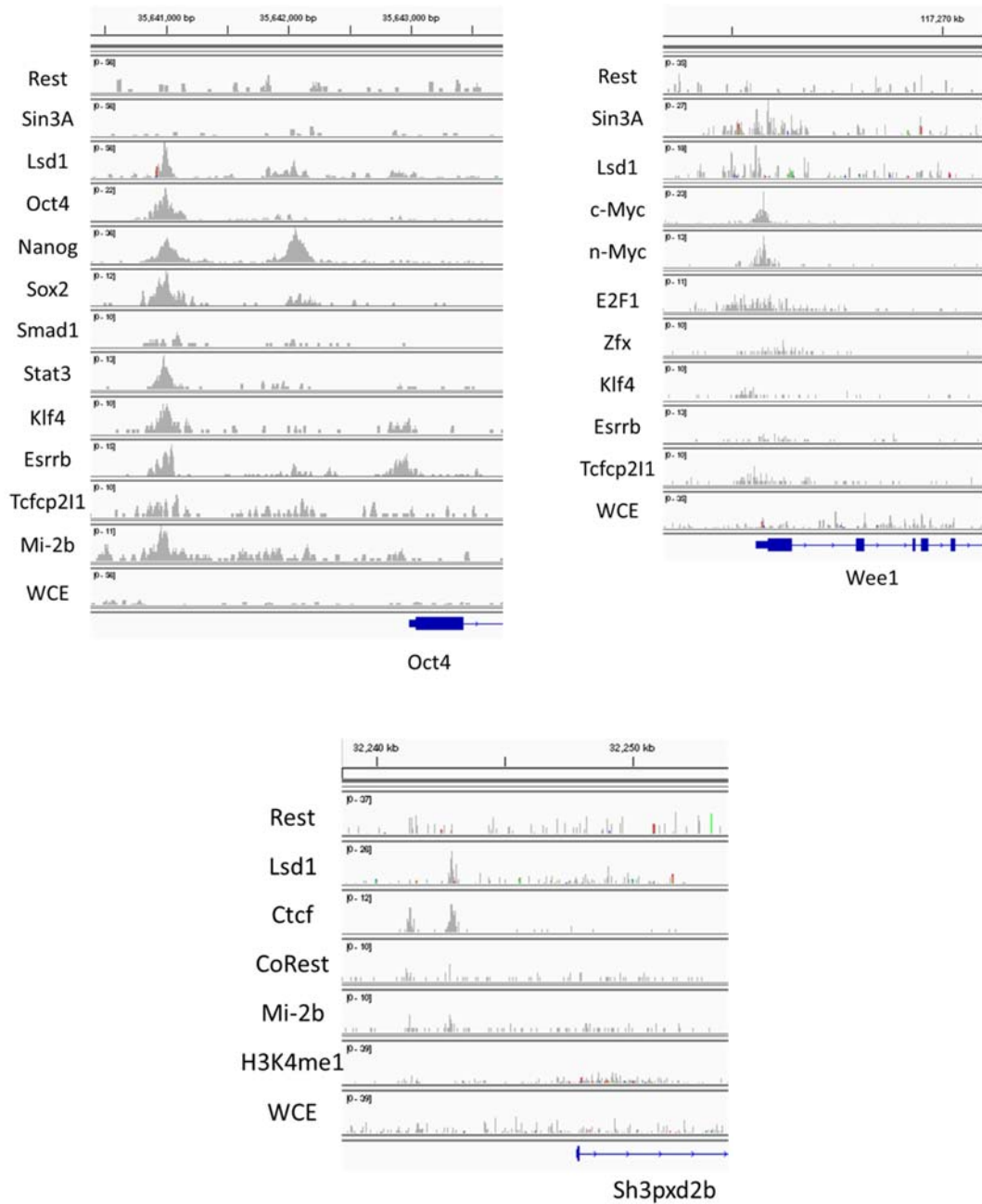


図 3-15. Oct4-centric module、Myc-centric module と Ctf と Sin3A と Lsd1 の比較
 上段左は Oct4 のエンハンサーへの Oct4-centric module の転写因子を介した Lsd1 の結合。
 上段右は Wee1 の転写開始点周辺への Myc-centric module の転写因子群との共結合。下段
 は Lsd1 と Ctf の共結合。

Tet1 の結合部位の同定

Williams et al. 2011b において、Tet1 による Sin3A のリクルートが示されており、Sin3A の結合部位の 2/3 程度が Tet1 の結合部位と重なっていることから、Tet1 が Lsd1 もリクルートしている可能性が考えられた。Lsd1 と Tet1 の結合部位を比較するために、Williams et al. 2011b においてマウス ES 細胞 E14TG2a で行われた 2 種類の Tet1 抗体による ChIP-Seq のデータから、Tet1 の結合部位の検出を行った(表 3-3)。Tet1 をノックダウンした細胞とコントロール shRNA を導入している細胞で Tet1 の C 末端側を認識する抗体を用いて行われた ChIP-Seq のピークをそれぞれ Tet1_C_shTet1、Tet1_C_shSCR と、同様の細胞で N 末端側を認識する抗体で行われた ChIP-Seq のピークをそれぞれ Tet1_N_shTet1、Tet1_N_shSCR とした。コントロール shRNA を導入した細胞で検出されたピーク ($p \leq 10^{-10}$) から、抗体の非特異的な結合によるピークを除くために Tet1 ノックダウン条件下で検出されたピーク ($p \leq 10^{-5}$) と位置が重複したピークを除いたものを Tet1 の結合部位として使用した。Tet1 の C 末端側を認識する抗体のデータから 39,457 か所、N 末端側を認識する抗体のデータから 20,574 か所の Tet1 結合部位を同定した(図 3-16)。

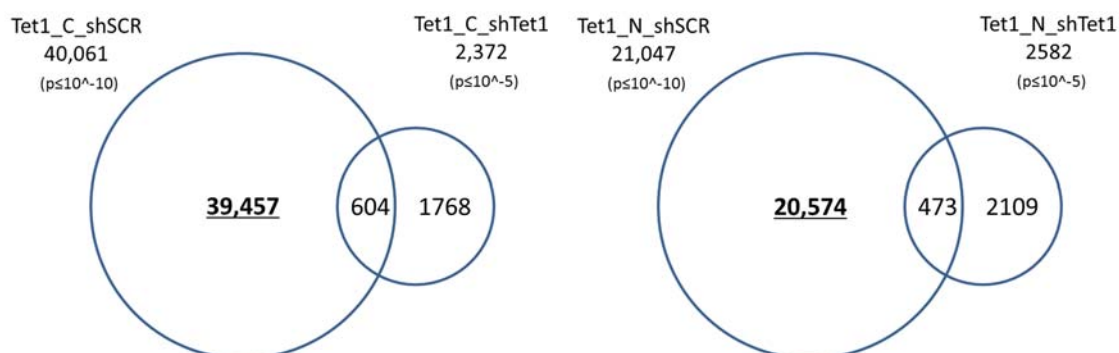


図 3-16. Tet1 の結合部位

Tet1 と Sin3A と Lsd1 の結合部位の比較

2 種類の Tet1 の ChIP-seq の少なくともどちらかで検出された結合部位に重複している Rest 依存・非依存的な Sin3A と Lsd1 の結合部位の数を調べた(図 3-17)。Rest 依存的な結合部位では Sin3A の 473 か所(37.6%)、Lsd1 の 425 か所(37.9%)が Tet1 と共局在していた。Rest 非依存的な結合部位では、Sin3A の 3822 か所(50.8%)、Lsd1 の 4565 か所(33.9%)が Tet1 と共局在していた。

Rest 非依存的な Lsd1 の結合部位と Tet1 の結合部位の重複率が高かったことから、Lsd1 が Rest 非依存的に Tet1 にリクルートされている可能性を示した(図 3-18)。さらに、Rest 依存的な Sin3A と Lsd1 の結合部位も Tet1 との高い重複率を示したことから、Rest 複合体が Tet1 をリクルートしている、もしくは、Tet1 により Rest 複合体がリクルートされている可能性を示した。

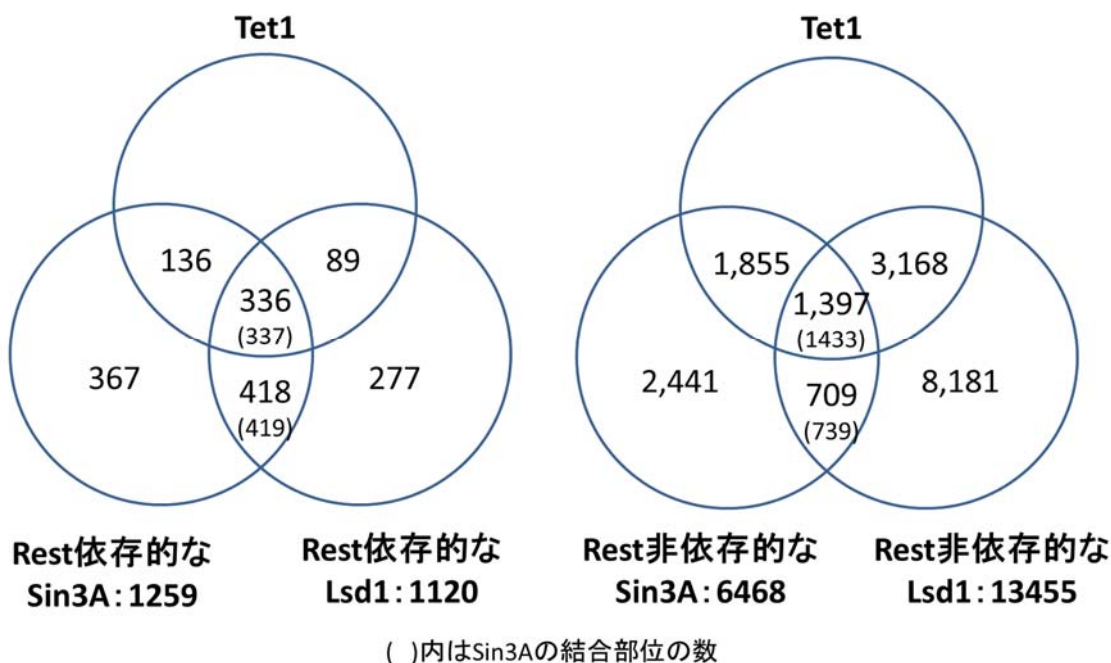


図 3-17. Tet1 と Sin3A と Lsd1 の結合部位の比較

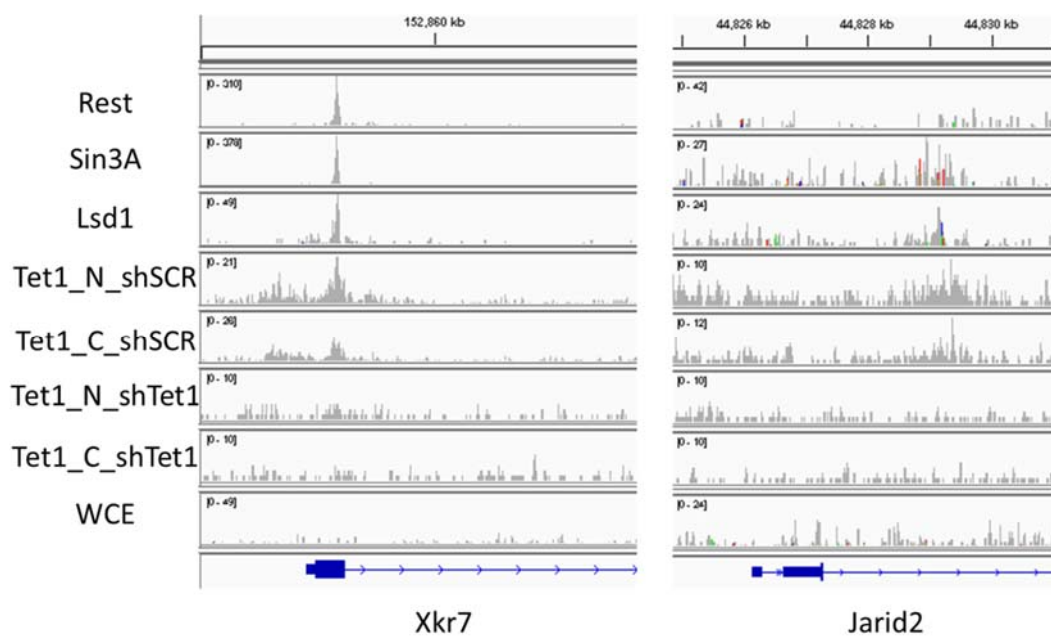


図 3-18. Sin3A と Lsd1 と Tet1 の結合部位との比較

左は Tet1、Rest、Sin3A と Lsd1 の共結合。右は Rest の結合が見られない Tet1、Sin3A と Lsd1 の共結合。

Tet1 と Lsd1 の相互作用の検証

Tet1 と PRC2 はゲノム上での共局在が顕著に観察されるのにもかかわらず、共免疫沈降によっては安定的な相互作用は示されていない(Wu et al. 2011; Williams et al. 2011b)。Tet1 との相互作用ではなく、Tet1 の酵素活性により誘導される 5-メチルシトシンの脱メチル化が Tet1 が結合している CpG 領域への PRC2 の結合を促進する可能性も考えられている(Williams et al. 2011a)。Rest や Lsd1 についても PRC2 と同様に相互作用ではなく酵素活性によって Tet1 と共局在した可能性も考えられたため、Rest と Lsd1 の抗体で共免疫沈降(Co-immunoprecipitation : Co-IP)実験により Tet1 と Rest または Lsd1 との相互作用の検証を行った(図 3-19)。Rest、Lsd1、PRC2 のサブユニットである Suz12 と Tet1 との相互作用が示されている Sin3A に対する抗体を用いて Co-IP を行った。その結果、Rest と Lsd1 のどちらの抗体で Co-IP した場合でも Tet1 のタンパク質が検出された。また、ここでは示していないが、再度免疫沈降実験をしても再現性が得られた。Suz12 の Co-IP によっても Lsd1 が検出されており、Lsd1 と PRC2 の両方が Rest 複合体に含まれているためだと考えられた。

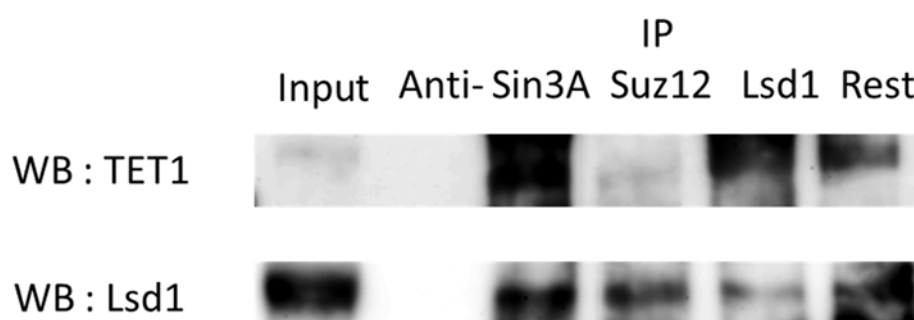


図 3-19. 共免疫沈降実験

3-2. 考察

Rest 複合体の形成様式と遺伝子発現制御

転写因子 Rest と Sin3A 複合体に含まれる足場タンパク質である Sin3A と CoRest 複合体に含まれるヒストン脱メチル化酵素 Lsd1 の ChIP-Seq から、Rest の結合部位のグループ分けを行った(図 3-3)。その結果、Rest の結合様式には R+/S+/L+、R+/S+/L-、R+/S-/L+ と R+/S-/L- の 4 つのタイプが存在していた(図 3-4)。Rest による遺伝子抑制には Rest のみでは不十分で、Sin3A や CoRest などの補因子うち、少なくとも 1 つ以上と複合体を形成している部位でのみ遺伝子発現抑制が行われることが示されている(Yu et al. 2011)。Rest のノックダウンによる遺伝子発現変化は、R+/S+/L+ の結合遺伝子群のみ有意な遺伝子上昇が確認された(図 3-6、表 3-6)。それに対して、R+/S+/L-、R+/S-/L+ と R+/S-/L- の結合遺伝子群では、Rest ノックダウンによって有意な遺伝子発現変化は見られなかった。Rest 複合体が安定的に形成されている場合に遺伝子抑制が起こることを確認できた。また、ヒストン修飾との比較により、Sin3A と Lsd1 と複合体を形成している場合のみ、Rest 結合部位周辺に H3K27me3 の修飾が検出された。Rest 複合体と PRC2 に関しては、G9a を介した相互作用が示されている(Mozzetta et al. 2014)。ES 細胞における Rest の結合部位には、Rest の欠損によって Rest 結合部位への PRC2 の結合が低下して H3K27me3 の修飾レベルが低下する結合部位と、Rest の欠損により Rest 結合部位周辺への PRC2 の結合が亢進して H3K27me3 の修飾が上昇する結合部位の両方が存在することが報告されている(Dietrich et al. 2012)。以上のことから、Sin3A と CoRest 複合体の両方を含む安定的な Rest 複合体では、PRC2 がリクルートされ H3K27me3 の修飾を起こして遺伝子発現の抑制を行っていることを示唆した。

表 3-6. Rest の複合体形成と H3K27me3 と Rest による遺伝子発現抑制との関係

Sin3A	Lsd1	H3K27me3	Restによる遺伝子発現抑制
+	+	+	+
+	-	-	-
-	+	-	-
-	-	-	-

Rest 複合体と Tet1 の相互作用について

Tet1 は CpG アイランドの 5-メチルシトシン(5mC)をヒドロキシメチルシトシン(5-hmC)に変換することで DNA の脱メチル化を誘導する酵素である(Tahiliani et al. 2009)。Tet1 は CpG アイランドに結合する CXXC zinc finger domain を有し、Tet1 がその酵素活性非依存的に CpG アイランドに Sin3A をリクルートすることが示されている(Williams et al. 2011b)。Rest、Sin3A と Lsd1 が複合体を形成しているサイトの約半分で Tet1 が共局在していることを示した(図 3-17, 3-18)。また、Rest の抗体を用いた Co-IP によって Rest が Tet1 と相互作用していることを示した(図 3-19)。以上のことから、安定的に形成された Rest 複合体が Sin3A を介して Tet1 をリクルートしている、もしくは、Tet1 によって Rest 複合体がリクルートされることが示唆された。

Tet1 と PRC2 はゲノム上での顕著な共局在が観察されており、Tet1 のノックダウンによって PRC2 のリクルートが阻害されることが示されている(Wu et al. 2011)。また、Co-IP によって、Tet1 と PRC2 のサブユニットである Suz12 との間には弱い相互作用しか検出されていなかった(図 3-19) (Williams et al. 2011b)。PRC2 と Tet1 とのゲノム上への共結合には、Rest を介した PRC2 と Tet1 の相互作用が一定の役割を担っている可能性がある。

Rest 非依存的な Sin3A と Lsd1 の結合遺伝子とヒストン修飾

Rest の結合部位と Sin3A と Lsd1 の結合部位をそれぞれ比較したところ、Sin3A と Lsd1 の結合の大部分は Rest に依存しないものであることを示した(図 3-9)。Rest 依存的に Sin3A と Lsd1 は神経系の遺伝子に結合しており、それに対し、Rest 非依存には細胞周期やヒストン修飾や分化に関わる遺伝子に有意に結合していることを示した(表 3-5)。結合遺伝子のうち、mRNA-Seq により 1 rpkm 以上の発現を示した遺伝子の割合は、Rest 非依存的な Sin3A や Lsd1 の結合遺伝子では 9 割程度と非常に高い割合であった。Rest 非依存的に Sin3A や Lsd1 が結合している遺伝子は、そのほとんどが一定以上発現していること示した(図 3-10)。また、転写開始点付近で観察される転写活性化に関わるクロマチンマーカースとの比較から、Rest 非依存的な Sin3A の 8 割以上、Rest 非依存的な Lsd1 の 3 割程度が活性型の転写開始点付近に結合していることが明らかになった(図 3-11)。エンハンサーとの比較から、Rest 非依存的な Lsd1 の 3 割程度がエンハンサーに結合しているのに対して、Rest 非依存的な Sin3A のうちエンハンサーに結合しているのは比較的少数であった(図 3-12)。以上のことから、Rest 非依存的な Sin3A と Lsd1 はほとんどが転写の行われている遺伝子周辺に結合しており、Sin3A は主に転写開始点付近に、Lsd1 は転写開始点付近とエンハンサーにそれぞれ結合していることを示した。Sin3A は転写開始点付近に結合して遺伝子の抑制に機能していることが示されているが(Williams et al. 2011b)、今回の結果ではそのほと

んどが発現している遺伝子に結合しており、抑制に働いていない可能性も考えられた。Lsd1 は活性型のエンハンサーに結合していることが示されており、分化に伴うエンハンサーの活性の迅速な抑制へ寄与している(Whyte et al. 2012)。

Sin3A、Lsd1 と ES 細胞特異的な転写因子

ES細胞の多能性維持と自己複製に重要な転写因子はゲノム上で転写因子のクラスターを形成しており、多能性に関わる転写因子 Nanog、Oct4、Sox2 を中心に Smad1、Stat3 などを含む Oct4-centric module と自己複製に関わる転写因子である c-Myc、n-Myc と E2F1 や Zfx などを含む Myc-centric module が存在する(Chen et al. 2008; Ng and Surani 2011)。また、Klf4、Esrrb や Tcfep2l1 は両方のクラスターに含まれている。

今回、Sin3A と Lsd1 の結合配列を用いて、それぞれに濃縮されている既知のモチーフ検索を行った(表 3-4)。Sin3A の結合配列には Myc-centric module に含まれる n-Myc や Klf4 のモチーフが検出された。Lsd1 の結合配列からは Oct4-centric module に含まれる Oct4、Sox2、Stat3、Klf4 とリプレッサーである Ctf1 の既知の結合モチーフが検出された。Lsd1 の結合配列に共通する配列モチーフの検出からも、Ctf1 の結合コンセンサス配列と類似したモチーフが検出された(図 3-2)。

Sin3A と Lsd1 の ChIP-Seq データと、Chen et al. 2008 において行われた Oct4-centric module や Myc-centric module に含まれる転写因子群や Ctf1 などの ChIP-Seq データとの比較を行った(図 3-14, 3-15)。モチーフ検索の結果と同様に、Rest 非依存的な Sin3A は Myc-centric module の転写因子群と、Lsd1 は Ctf1 と Oct4-centric module と新たに Myc-centric module の転写因子群との共局在が示された。Sin3A 複合体と Lsd1 を含む NuRD 複合体が Oct4 と Nanog によってリクルートされることが知られている(Liang et al., 2008)。Rest 依存的な Lsd1 と Oct4-centric module との間には顕著な共局在が確認されたが、Rest 非依存的な Sin3A が Oct4-centric module と共局在している割合は 5%以下と少なく、モチーフ検索において検出されたのも両方の module に共通して存在する Klf4 のみであった。Sin3A のうち Oct4-centric module と協調的に働いているものは、非常に少ないことを示した。Sin3A は c-Myc や n-Myc とヘテロダイマーを形成する転写因子である Max と相互作用することが知られており(Laherty et al. 1997)、Max との相互作用を介して Myc-centric module にリクルートされていることが考えられる。Sin3A は c-Myc を脱アセチル化することで、その転写促進活性を抑制することが知られている(Nascimento et al. 2011)。Sin3A をノックアウトした内部細胞塊では、c-Myc によって活性化される遺伝子の発現が低下することが示されている(McDonel et al. 2012)。ラットの細胞において、c-Myc と Lsd1 が相互作用して、Lsd1 の脱メチル化反応の副産物である H₂O₂ が c-Myc による転写活性化を促進することが報告されている(Amente et al. 2010)。以上のことから、ES 細胞において、Sin3A

と Lsd1 が協調的に Myc による転写促進活性を調節している可能性を示唆した。また、Ctcf と Lsd1 との共局在を示した。これは、Lsd1 の H3K4me1/2 に対する脱メチル化活性が、Ctcf による遺伝子発現抑制に寄与を示しているのかもしれない。

Tet1 と Lsd1 について

Sin3A は Tet1 と相互作用しており、結合部位の比較から ES 細胞において Sin3A の結合部位の約 2/3 が Tet1 と共局在していることが示されている(Williams et al. 2011b)。今回の結果から、Sin3A と Lsd1 が Rest 非依存的にも 2000 か所以上で共局在していることを示した(図 3-11)。以上のことから、Tet1 が Sin3A だけでなく Lsd1 もリクルートしている可能性が考えられた。Tet1 と Rest 非依存的な Lsd1 の結合部位の比較を行ったところ、Lsd1 の結合部位のうち 34%程度が Tet1 と共局在していることが示された(図 3-17, 3-18)。また Lsd1 抗体を用いた Co-IP により、Tet1 と Lsd1 との相互作用を示した(図 3-19)。Tet1 は Sin3A だけでなく、Lsd1 のリクルートも行うことを示唆した。Tet1 は CpG アイランドに結合し、Sin3A、Lsd1 や PRC2 などの種々の複合体を直接的、間接的にリクルートすることで遺伝子発現抑制を行っていると考えられる。

4. ES 細胞と EpiS 細胞における Rest 複合体結合部位の比較解析

結果と考察

ES 細胞と EpiS 細胞の細胞状態の確認

免疫化学染色により、本研究で用いた ES 細胞及び EpiS 細胞の未分化状態の確認を行った(図 4-1)。ES 細胞と EpiS 細胞の共通の未分化マーカーである Nanog と Oct4 は両方の細胞で発現していることを確認した。また、ES 細胞特異的に発現している遺伝子である Pecam1 の発現は ES 細胞でのみ確認することができた(Tesar et al. 2007)。

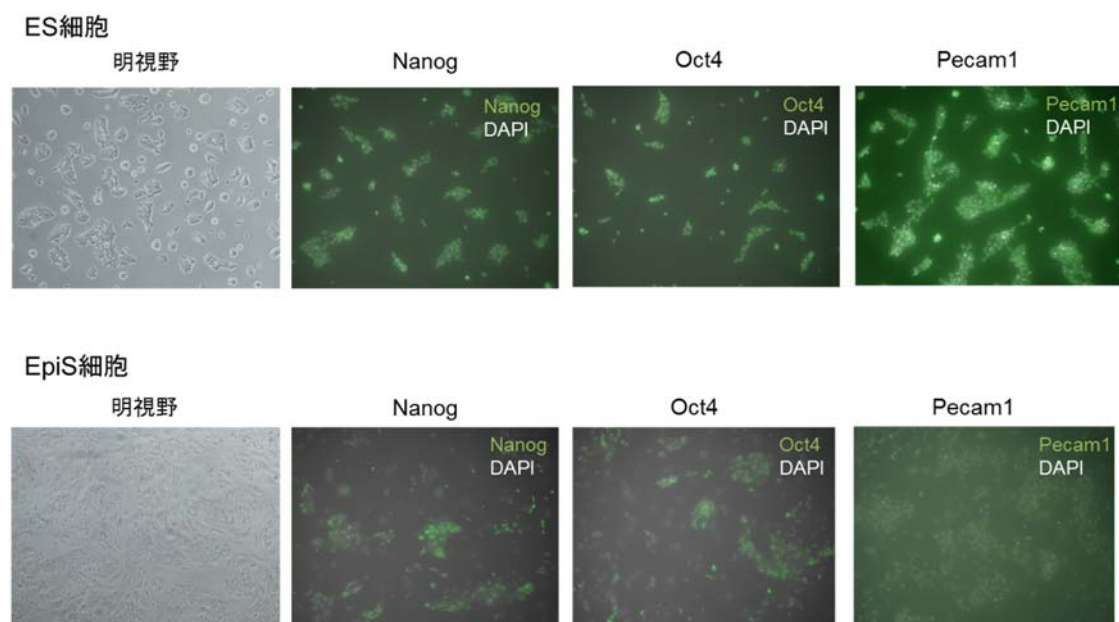


図 4-1. ES 細胞と EpiS 細胞の未分化マーカーと ES 細胞特異的マーカーの発現

さらに、TSS-Seq と qRT-PCR により、ES 細胞と EpiS 細胞それぞれに特異的に発現するマーカー遺伝子の発現を比較した(図 4-2)。ES 細胞特異的に高発現することが知られている Rex1、Klf4 と Tbx3 は EpiS 細胞に比べて ES 細胞で、EpiS 細胞特異的に高発現する Eomes、Cer1 と Fgf5 は EpiS 細胞でそれぞれ高発現していることが、両方の手法により確認することができた。また、ES 細胞と EpiS 細胞において同程度の発現が確認されている Nanog、Oct4 と Cdh1 についても両方で大きな発現の変わらないことを確認した。さらに、今回の解析対象である Rest、Sin3A と Lsd1 の発現量は ES 細胞と EpiS 細胞でほぼ同じ発現量を示していた。

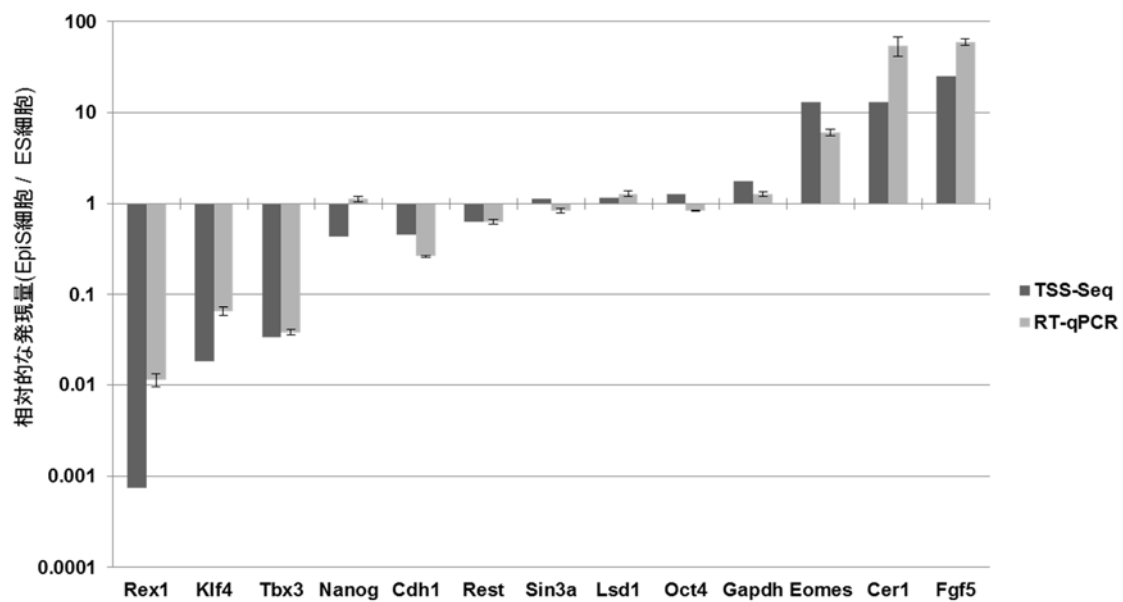


図 4-2. ES 細胞マーカーと EpiS 細胞マーカーの転写量の比較

TSS-Seq と qRT-PCR により計測した ES 細胞に対する EpiS 細胞での発現量。qRT-PCR では、Actb 遺伝子をコントロールとした $\Delta\Delta Ct$ 法により、ES 細胞に対する EpiS 細胞での相対的な発現量を計算した。図中に示した遺伝子に対するプライマーの配列は表 2-1 に示した。

マウス EpiS 細胞での ChIP-Seq

マウス EpiS 細胞を用いて、ES 細胞と同様に、Rest、Sin3A、Lsd1、Pol 2 と 7 種類のヒストン修飾の ChIP-Seq を行った(表 4-1)。両細胞でのヒストン修飾と Pol2 の ChIP の qPCR による評価は図 4-3 に示した。Rest、Sin3A と Lsd1 の ChIP-Seq データに関しては、ES 細胞と同様に MACS によりピーク検出をした(Zhang et al. 2008)。シークエンスで得られた総タグ数、ピーク検出に用いたタグ数と得られたピークの数(表 4-1)に示した。

表 4-1. EpiS 細胞の ChIP-Seq のシークエンスタグ数とピーク数

	WCE	Rest	Sin3A	Lsd1
総タグ数	107,222,325	25,629,113	42,311,069	173,308,363
ピーク検出に用いたタグ数(ChIP)		25,629,113	42,311,069	74,000,000
ピーク検出に用いたタグ数(WCE)		7,000,000	19,000,000	107,222,325
全ピーク数($p \leq 10^{-5}$)		16,931	56,097	108,803
ピーク数($p \leq 10^{-5}$)		2,951	6,377	51,985

	Pol2	H3K4me3	H3ac	H3K4me1
総タグ数	134,959,099	55,901,394	93,457,043	47,768,462
	H3K27ac	H3K27me3	H3K9me2	H3K9me3
総タグ数	63,773,975	62,369,462	43,357,641	38,434,995

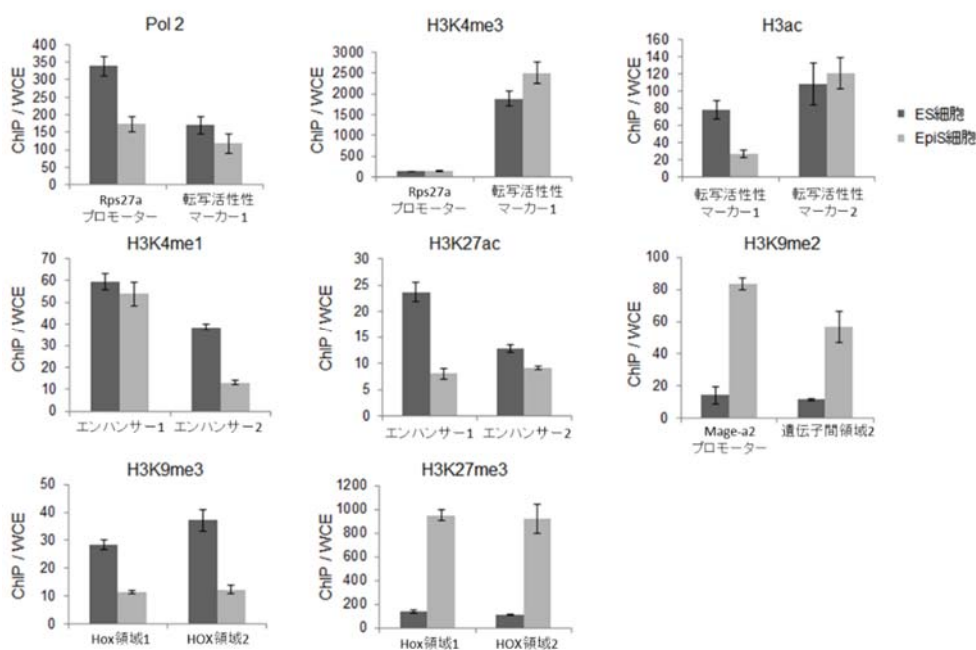


図 4-3. ヒストン ChIP の qPCR による確認

表 2-2 のプライマーを用いた。コントロールとして、転写活性性マーカー(Pol2、H3K4me3、H3ac)とエンハンサーマーカー(H3K4me1、H3K27ac)では遺伝子間領域 1 のプライマーを、H3K9me2 では Rps27a プロモーターのプライマーを、H3K9me3 と H3K27me3 では転写活性性マーカー濃縮領域 1 のプライマーを用いた。

ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 複合体の結合パターンの同定

Rest 複合体の構成因子である Rest、Sin3A、Lsd1 の結合部位のうち、RefSeq のコーディング遺伝子の 5'末端上流 50kbp 以内もしくは遺伝子領域に含まれる Rest の結合部位を解析に用いた。Rest、Sin3A、Lsd1 の結合部位は ES 細胞でそれぞれ 4,632、7,949、13,003 か所、EpiS 細胞で 1,477、3,126、41,093 か所であった (表 4-2)。Rest の結合部位を Sin3A と Lsd1 との重複パターンから、Rest+Sin3A+Lsd1+ (R+/S+/L+)、Rest+Sin3A+Lsd1- (R+/S+/L-)、Rest+Sin3A-Lsd1+ (R+/S-/L+) と Rest のみ(R+/S-/L-)の 4 つのパターンに分類した(表 4-3)。ES 細胞ではそれぞれのタイプの結合部位は 628、402、284、3,318 か所、EpiS 細胞では 301、39、492、645 か所であった(表 4-3)。

表 4-2. ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 複合体の結合部位の数

コーディング遺伝子の結合部位	Rest	Sin3A	Lsd1
ES細胞	4,632 (5,552)	7,949 (9,371)	13,003 (11,156)
EpiS細胞	1,477 (1,823)	3,126 (4,116)	41,093 (16,685)
ノンコーディング遺伝子の結合部位	Rest	Sin3A	Lsd1
ES細胞	604 (597)	1,195 (872)	2,156 (1,298)
EpiS細胞	165 (165)	372 (359)	5,990 (2,005)

ES 細胞と EpiS 細胞における Rest、Sin3A と Lsd1 の結合部位の数。括弧内に結合遺伝子の数を示した。

表 4-3. Rest 複合体の結合パターン

コーディング遺伝子の結合部位	R+/S+/L+	R+/S+/L-	R+/S-/L+	R+/S-/L-
ES細胞	628 (997)	402 (676)	284 (472)	3,318 (4,176)
EpiS細胞	301 (500)	39 (52)	492 (623)	645 (830)
ノンコーディング遺伝子の結合部位	R+/S+/L+	R+/S+/L-	R+/S-/L+	R+/S-/L-
ES細胞	76 (80)	69 (77)	44 (55)	415 (451)
EpiS細胞	33 (43)	6 (6)	57 (60)	69 (71)

ES 細胞と EpiS 細胞における Rest 複合体の結合様式の異なる結合部位の数。括弧内に結合遺伝子の数を示した。

いくつかのサイトについて qPCR 解析による確認を行った(図 4-4)。先行研究と同様に、Rest のみが結合している結合部位は、他のタイプの結合部位に比べて低い ChIP-Seq のシグナル強度を示した(図 4-5)(Yu et al. 2011)。Rest が単独で結合しているような結合の弱い結合部位では遺伝子発現抑制に対して影響がない傾向が示されている(図 3-6)。R+/S-/L- の結合部位は活性を持たない可能性が高いため、それらを除いて以降の解析を行った。

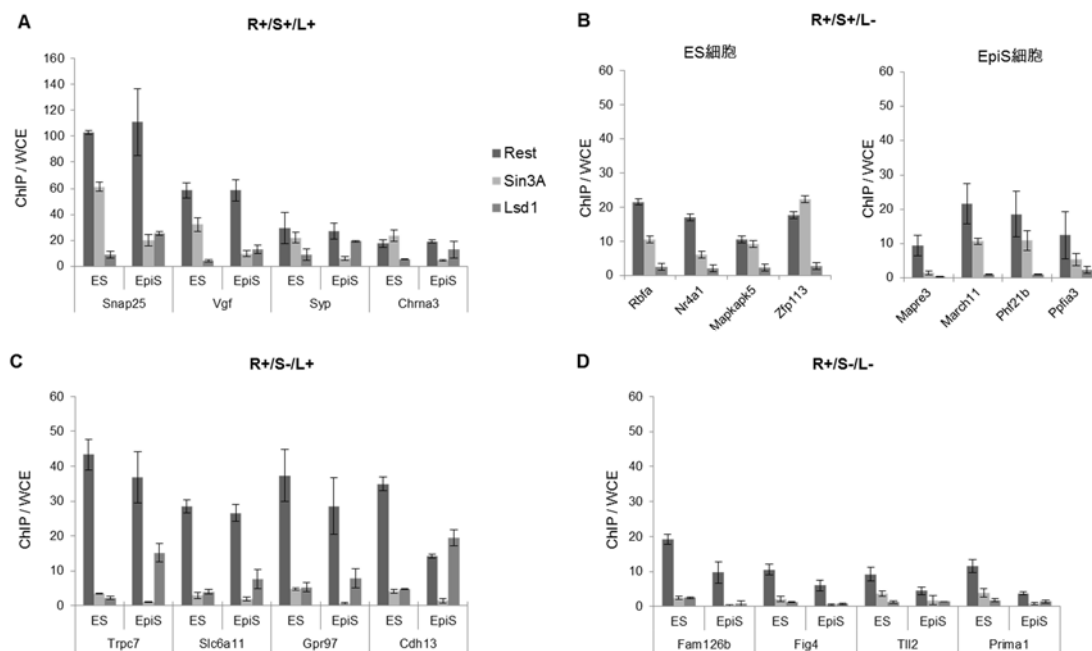


図 4-4. 検出された Rest 複合体結合部位の ChIP-qPCR による確認 R+/S+/L+ (A)、R+/S+/L- (B)、R+/S-/L+(C)と R+/S-/L-(D)の Rest 結合部位に対する ChIP-qPCR の結果を示した。プライマーは表 2-2 で示したものを用いた。△△Ct 法のコントロールとして、遺伝子領域 1 のプライマーを用いた。

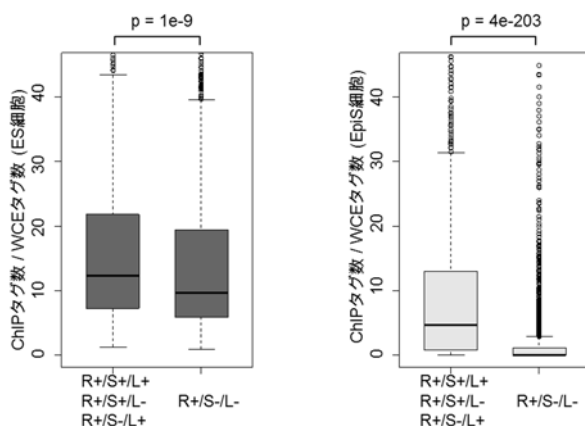


図 4-5. Rest 複合体の結合様式と ChIP-Seq のシグナル強度 ES 細胞と EpiS 細胞での R+/S-/L-とそれ以外の結合部位の結合強度を示した。総タグ数で標準化した WCE のタグ数で、標準化した ChIP のタグ数を割った値を結合強度とした。

ES 細胞と EpiS 細胞の結合部位の比較

ES 細胞と EpiS 細胞で Rest 複合体の結合パターンの比較を行った。どちらの細胞においても ChIP-qPCR 解析からは同程度の濃縮が確認されたのにも関わらず(図 4-4)、ES 細胞が 1,314 か所、EpiS 細胞が 832 か所であり、ES 細胞の方が明らかに多くの結合部位が検出された(図 4-6、表 4-4)。細胞間の Rest 結合部位の比較から、EpiS 細胞の結合部位のうち、8% (59 か所)は EpiS 細胞特異的な結合部位であったに対して、92% (685 か所) は ES 細胞においても結合がみられた。EpiS 細胞の結合部位の大部分は、ES 細胞においても Rest が結合していることを示した。EpiS 細胞に対して、ES 細胞に特異的な結合部位は 629 か所と EpiS 細胞に比べて 10 倍以上も多く存在していた。このことから、Rest による制御は ES 細胞において選択的に行われており、EpiS 細胞においては ES 細胞よりも限られた遺伝子に対して行われていると考えられた。図 4-7 に ES 細胞と EpiS 細胞に共通に見られた結合部位(A)、ES 細胞特異的に見られた結合部位(B)と EpiS 細胞特異的に見られた結合部位(C)の例を示した。

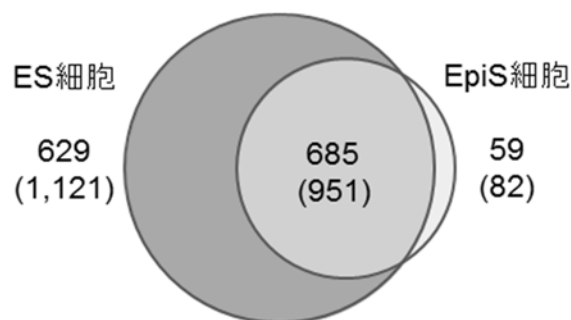


図 4-6. ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 結合部位の比較

ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 結合部位の比較から分類した結合部位の数。括弧内には結合遺伝子数を示した。

表 4-4. ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 複合体結合部位の重複

コーディング遺伝子の結合部位	合計	R+/S+/L+	R+/S+/L-	R+/S-/L+
ES細胞特異的	629 (1,121)	211 (393)	229 (435)	189 (350)
共通 (ES)	685 (951)	417 (624)	173 (255)	95 (125)
共通 (EpiS)	773 (1,032)	294 (491)	11 (18)	468 (589)
EpiS細胞特異的	59 (82)	7 (10)	28 (34)	24 (38)
ノンコーディング遺伝子の結合部位	合計	R+/S+/L+	R+/S+/L-	R+/S-/L+
ES細胞特異的	105 (129)	31 (35)	39 (50)	35 (46)
Common (ES)	84 (86)	45 (48)	30 (31)	9 (9)
Common (EpiS)	85 (104)	31 (35)	4 (4)	50 (54)
EpiS細胞特異的	11 (17)	2 (8)	2 (2)	7 (7)

細胞特異性と結合様式の異なる Rest 結合部位の数。括弧内には各カテゴリーに属する Rest 結合遺伝子の数を示した。

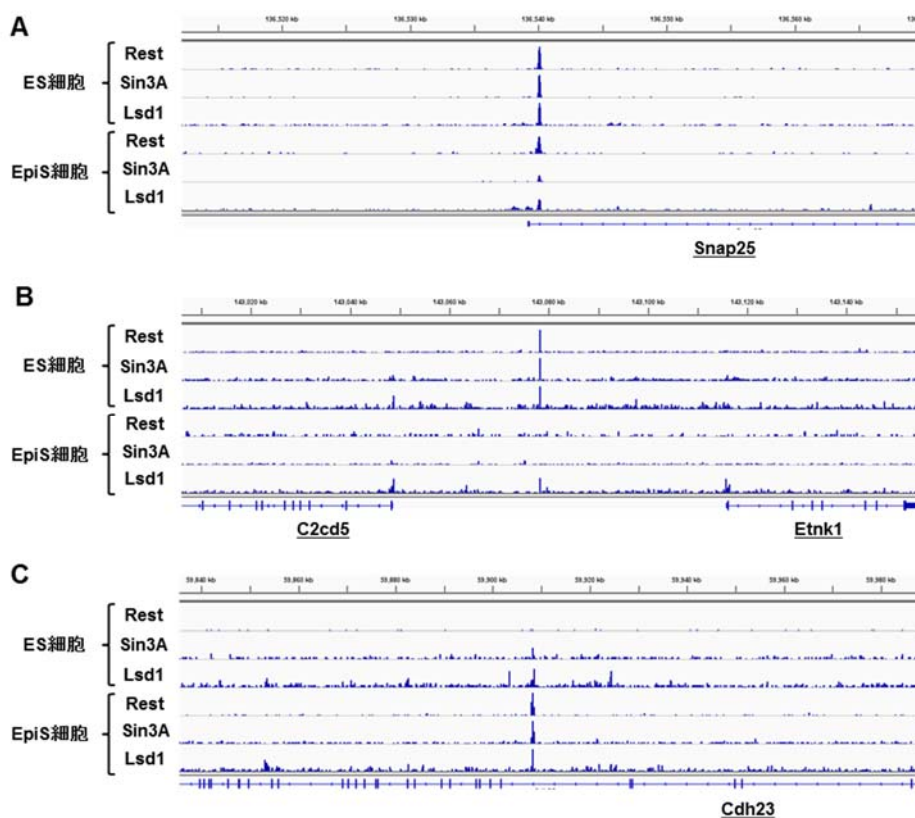


図 4-7. ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 複合体の結合部位

ES 細胞と EpiS 細胞で共通(A)、ES 細胞特異的(B)、EpiS 細胞特異的(C)に結合している結合部位をそれぞれ示した。

細胞特異性が異なる Rest 結合部位の機能解析

Rest の結合部位を ES 細胞特異的、EpiS 細胞特異的、共通の結合部位に分類した(表 4-4)。それぞれのタイプの結合が見られる遺伝子群に対して、gene ontology 解析(GO 解析)を行った(表 4-5)。共通の結合が検出された遺伝子群においては神経発生に関わる遺伝子が濃縮されているのに対して、ES 特異的な結合が見られる遺伝子群にはクロマチン修飾やシグナル伝達関連の GO term を持つ遺伝子が濃縮していた。EpiS 細胞特異的な結合をしている遺伝子群からは有意な GO term は得られなかった。さらに KEGG PATHWAY Database のパスウェイに対応づいた遺伝子のデータを用いて、それぞれのタイプの Rest 結合遺伝子群で濃縮されているパスウェイを調べた(Kanehisa et al. 2014)。共通した結合が見られる遺伝子群には神経系の働きに関わる様々なパスウェイに属する遺伝子が濃縮されていたのに対して、ES 細胞特異的な結合が見られる遺伝子群にはインスリンシグナリングなどの神経と関係のないパスウェイの遺伝子が濃縮されていた(表 4-6)。

結合部位の結合強度を ChIP-Seq のタグの密度から算出して比較したところ、ES 細胞特異的、EpiS 細胞特異的な結合部位と比べて、共通の結合部位で有意に結合が強いことを示した(図 4-8)。それぞれのグループの結合配列のコンセンサス配列を検出するために、MEME-ChIP による de novo の配列モチーフの検出と類似するモチーフの検索を行った(表 4-7) (Machanick and Bailey 2011; Gupta et al. 2007; Portales-Casamar et al. 2009)。共通の結合部位と ES 細胞特異的な結合部位からは既知の Rest のコンセンサス配列が検出されたのに対して、EpiS 細胞特異的な結合部位からは検出されなかった。コンセンサス配列が検出できなかった EpiS 細胞特異的な結合部位に含まれるモチーフについて、さらに詳細な解析をするために、マトリックス検索により配列内に含まれる既知のモチーフを検索し、他のグループの結合部位に対して EpiS 細胞の結合部位に有意に濃縮している配列モチーフの探索を行った(表 4-8)。EpiS 細胞特異的な結合部位には、Rest とのゲノム上での共局在が示されている Oct4 を含む様々な転写因子のコンセンサス配列が濃縮されていた (Johnson et al. 2008)。また、本研究で行った ES 細胞における Tet1 との比較から、Rest と Tet1 の相互作用も確認された(図 3-17、19)。これらの結果は、Rest が自身の DNA 結合活性に依存せずに、Oct4 や Tet1 などの他の転写因子を介してゲノム上に結合していることを示しているのかもしれない。

表 4-5. ES 特異的と共通の Rest 結合部位の結合部位の GO 解析

	GO ID	GO term	遺伝子数	p値
ES 特異的	GO:0006950	response to stress	20	8.00E-05
	GO:0007283	spermatogenesis	30	2.00E-04
	GO:0030529	ribonucleoprotein complex	30	7.00E-04
	GO:0004672	protein kinase activity	44	1.00E-03
	GO:0005694	chromosome	28	2.00E-03
	GO:0004674	protein serine/threonine kinase activity	36	3.00E-03
	GO:0016874	ligase activity	32	6.00E-03
	GO:0006412	translation	22	0.01
	GO:0016568	chromatin modification	22	0.02
	GO:0007399	nervous system development	26	0.02
共通	GO:0045202	synapse	70	5.00E-24
	GO:0005216	ion channel activity	59	2.00E-19
	GO:0043025	neuronal cell body	61	1.00E-17
	GO:0030425	dendrite	50	4.00E-16
	GO:0034765	regulation of ion transmembrane transport	35	7.00E-16
	GO:0005244	voltage-gated ion channel activity	34	2.00E-15
	GO:0043005	neuron projection	48	2.00E-14
	GO:0006813	potassium ion transport	29	9.00E-13
	GO:0030424	axon	37	5.00E-12
	GO:0055085	transmembrane transport	46	5.00E-09

ES 細胞特異的(上)、共通(下)の結合遺伝子群に濃縮していた GO term とその GO term を持つ遺伝子数。p 値は超幾何分布の確率関数により計算した。

表 4-6. ES 特異的と共通の Rest 結合部位の結合部位のパスウェイ解析

	KEGG ID	パスウェイ名	遺伝子数	p値
ES 特異的	path:mmu05322	Systemic lupus erythematosus	32	2.00E-13
	path:mmu03010	Ribosome	12	3.00E-03
	path:mmu00600	Sphingolipid metabolism	7	7.00E-03
	path:mmu04612	Antigen processing and presentation	10	0.01
	path:mmu05100	Bacterial invasion of epithelial cells	9	0.01
	path:mmu04144	Endocytosis	20	0.02
	path:mmu05412	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	9	0.02
	path:mmu04910	Insulin signaling pathway	13	0.04
共通	path:mmu04080	Neuroactive ligand-receptor interaction	31	1.00E-04
	path:mmu04010	MAPK signaling pathway	26	5.00E-04
	path:mmu04020	Calcium signaling pathway	19	7.00E-04
	path:mmu04260	Cardiac muscle contraction	10	2.00E-03
	path:mmu00534	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate	5	6.00E-03
	path:mmu04950	Maturity onset diabetes of the young	5	6.00E-03
	path:mmu05014	Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	7	0.01
	path:mmu04912	GnRH signaling pathway	10	0.02
	path:mmu04730	Long-term depression	8	0.02
	path:mmu00310	Lysine degradation	6	0.02

ES 細胞特異的(上)、共通(下)の結合遺伝子群に濃縮していたパスウェイとそのパスウェイに属する遺伝子数。p 値は超幾何分布の確率関数により計算した。

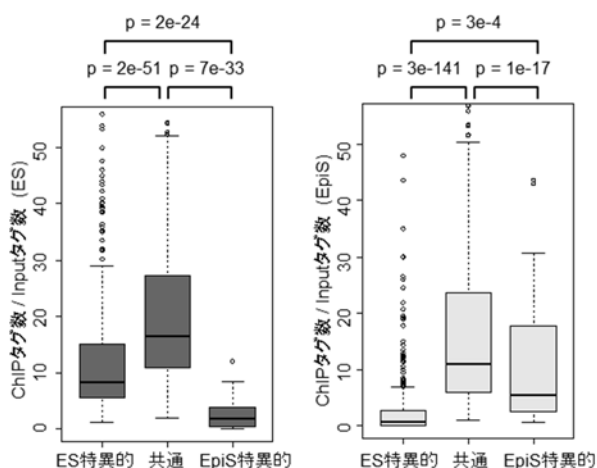


図 4-8. 結合の細胞特異性と結合強度

ES 細胞(左)と EpiS 細胞(右)における結合の細胞特異性の異なる結合部位の Rest の ChIP-Seq のシグナル強度。p 値はウィルコクソンの符号順位検定により計算した。

表 4-7. de novo のモチーフ検出



転写因子	モチーフ	E-value
ES 特異的	REST 	6e-196
共通	REST 	3e-1003
EpiS 特異的	モチーフなし	

表 4-8. EpiS 細胞特異的な結合部位に濃縮していた転写因子のコンセンサス配列

転写因子	MatrixID	結合部位の数	p値
Cdx1	V\$CDXA_02	13	6E-9
Pou3f2	V\$POU3F2_02	12	2E-7
Pou3f2	V\$POU3F2_01	11	2E-6
Zbtb16	V\$PLZF_02	10	2E-6
Oct4	V\$OCT4_02	10	4E-6
Foxj2	V\$FOXJ2_02	8	3E-5
Nkx2-5	V\$NKX25_02	12	6E-5
Alx1	V\$CART1_01	4	2E-4
Pou3f1	V\$TST1_01	10	2E-4

EpiS 細胞特異的な Rest 結合部位に濃縮していた配列モチーフ。p 値は超幾何分布の確率関数により計算した。

ES細胞と EpiS細胞での Rest 複合体の結合様式の違い

ES細胞と EpiS細胞において、Rest と Rest 複合体の構成因子である Sin3A と Lsd1 との共結合パターンを比較した(図 4-9、表 4-3、表 4-4)。ES細胞における Rest 複合体での結合様式は、R+/S+/L+が 628 ヶ所(48%)、R+/S+/L-が 402 ヶ所(30%)、R+/S-/L+が 284 ヶ所(22%)であったのに対して、EpiS細胞では、R+/S+/L+が 301 ヶ所(36%)、R+/S+/L-が 39 ヶ所(5%)、R+/S-/L+が 492 ヶ所(59%)であった(表 4-3)。全体に占める R+/S+/L-の割合は ES細胞では 30%であったのに対して、EpiS細胞では 5%であった。EpiS細胞では Rest の結合部位に Sin3A のみが結合している割合が低いことが分かった。さらに、両細胞で共通の Rest 結合部位での複合体の結合様式を比較したところ、ES細胞の R+/S+/L+の結合部位の 39%と R+/S-/L+の結合部位の 73%が、EpiS細胞においては R+/S-/L+の結合部位に置き換わっていた(表 4-4)。この結果から、EpiS細胞では Rest 複合体と HDAC を含む Sin3A 複合体が ES細胞と比べて協調して働いている割合が低いことが考えられた。

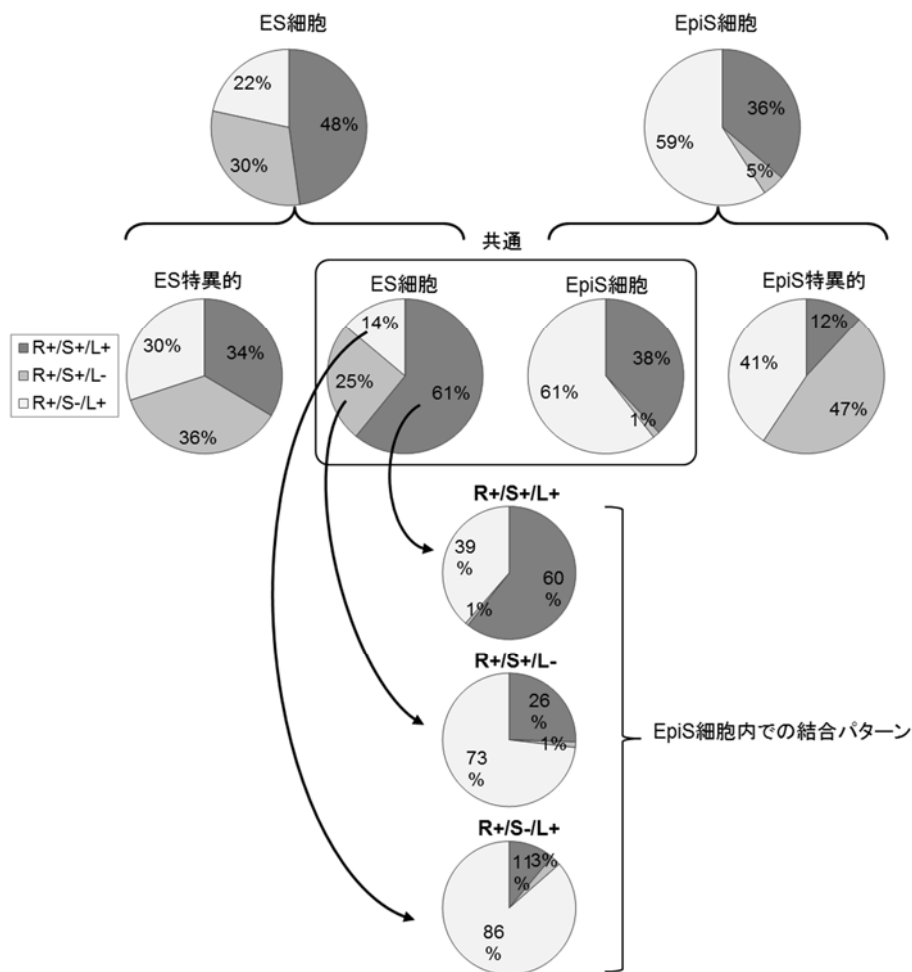


図 4-9. ES細胞と EpiS細胞での Rest 複合体の結合パターンの違い

Rest 結合部位周辺のヒストン修飾のパターンとの比較

ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 結合部位周辺のクロマチン状態の違いを解析するために、7 種類のヒストン修飾と Pol2 の ChIP-Seq との比較を行った(図 4-10)。まず、ES 細胞特異的な結合部位周辺の ES 細胞と EpiS 細胞のクロマチン修飾のパターンを比較した。ES 細胞において、Rest の結合シグナルが検出されているのにも関わらず、Pol2、H3K4me3 や H3ac などの転写の活性化に関わるクロマチン修飾が検出された(図 4-10A、B、D)。それら活性性マーカーのシグナルは、Rest の ChIP-Seq のシグナルが弱いほど強くなる傾向が観察された。EpiS 細胞の対応する領域での Rest とクロマチン修飾のシグナルを調べたところ、ES 細胞と比べて EpiS 細胞では Rest のシグナルは低下し、反対に活性性マーカーのシグナルは亢進していた。抑制性のヒストン修飾についても解析を行ったところ、H3K9me2 のシグナル強度は Rest が結合している ES 細胞で有意に高いことが示された(図 4-10E)。Rest が結合している ES 細胞においても転写活性性マーカーが観察されてはいたが、ES 細胞特異的な Rest の結合が結合部位周辺の活性性のクロマチン状態の抑制に寄与していると考えられた。

共通の結合部位では、Rest の結合は ES 細胞と EpiS 細胞で同等のシグナルが検出されたが、周囲のクロマチン修飾パターンは ES 細胞と EpiS 細胞では異なっていた(図 4-10A、B)。ES 細胞では活性性のヒストン修飾のシグナルはほとんど見られなかったのに対して、EpiS 細胞においてははっきりとしたシグナルが検出された(図 4-10B)。とりわけ H3ac のシグナルは EpiS 細胞において 3 倍程度亢進しており、もっとも有意であった(図 4-10D)。また、EpiS 細胞において、H3K4me3 と Pol2 のシグナルが上昇、H3K9me2 のシグナルが低下していた(図 4-10D、E)。EpiS 細胞では、ES 細胞と比較して Sin3A のシグナルが低下していた(図 4-10A)。このことから、EpiS 細胞における Sin3A の Rest 結合部位への結合強度の低下により HDAC のリクルート効率も低下し、H3ac が上昇したのではないかと考えられた。また、H3ac の亢進により、他の活性性マーカーも上昇したのではないかと考えた。

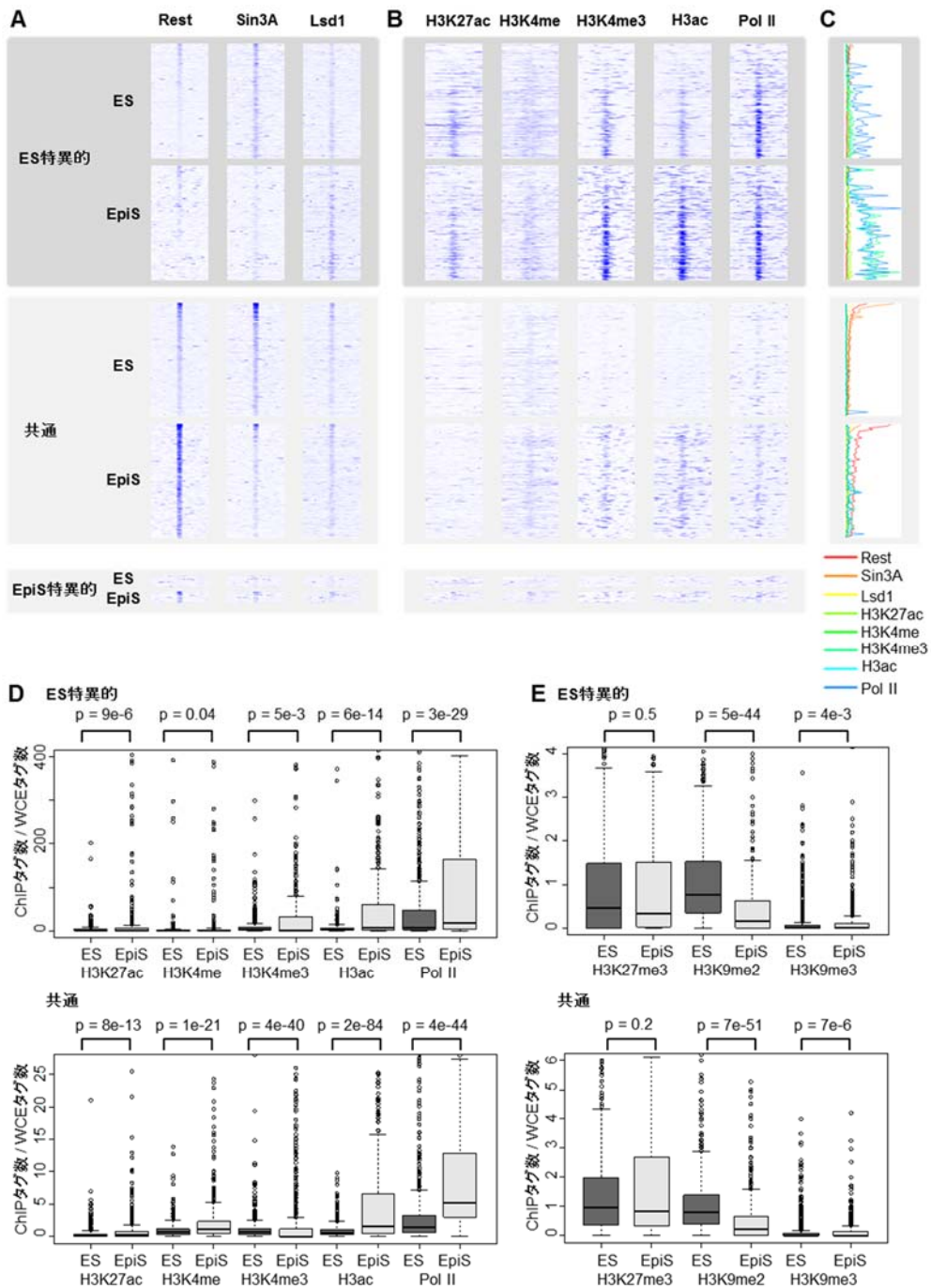


図 4-10. Rest 結合の細胞特異性とヒストン修飾

(A, B) Rest 複合体の因子(A)とヒストン修飾(B)の Rest 結合部位から±500 bp 以内の領域のシグナル強度。ChIP でのシグナルが WCE に対して 25 倍以上の領域を青で示した。(C) ChIP-Seq のシグナルの積算値。(D, E) ES 細胞特異的と共通の Rest 結合部位と周辺の活性性及びエンハンサーマーカ(D)と抑制性のマーカ(R)のシグナル強度の比較。p 値はウィルコクソンの符号順位検定により計算した。

Rest 結合遺伝子の転写量の比較

Rest 複合体が、結合している遺伝子の発現量にどのような影響を与えるのかを調べるために、ES 細胞と EpiS 細胞において TSS-Seq による発現解析データの比較を行った。TSS-Seq は mRNA のキャップ構造を HiSeq2000 のシーケンス用のアダプターオリゴに置換することで、転写開始点(TSS)から下流の配列を決定できる方法である。そのタグの数から細胞の中に含まれる mRNA の量を測定することができる。TSS-Seq のデータの評価のために、13 遺伝子について ES 細胞に対する EpiS 細胞の相対的な発現量を TSS-Seq と qRT-PCR で比較し、どちらの手法においても、ほとんどの遺伝子で同様の傾向が確認できた(図 4-2)。

TSS-Seq から、ES 細胞に対する EpiS 細胞の相対的な発現量を算出した(図 4-11B、D)。ES 細胞特異的な結合遺伝子は、EpiS 細胞においては Rest による抑制が解除されて遺伝子発現が上昇していると考えた。しかし、共通の結合遺伝子や EpiS 細胞特異的な結合遺伝子に比べると有意ではあったが、EpiS 細胞での大きな発現上昇は確認できなかった(図 4-10B)。さらに、ES 細胞特異的な結合遺伝子と他のタイプの結合遺伝子の元の発現量を比較したところ、ES 細胞特異的に結合しているターゲット遺伝子は他のタイプの遺伝子に比べて、転写量のレベルが高いことが分かった(図 4-10A)。

同様に、Rest 複合体の結合様式と転写量の関係についても調べたが、細胞特異性での比較と異なり、それぞれのグループには有意な違いが見られなかった(図 4-10C、D)。

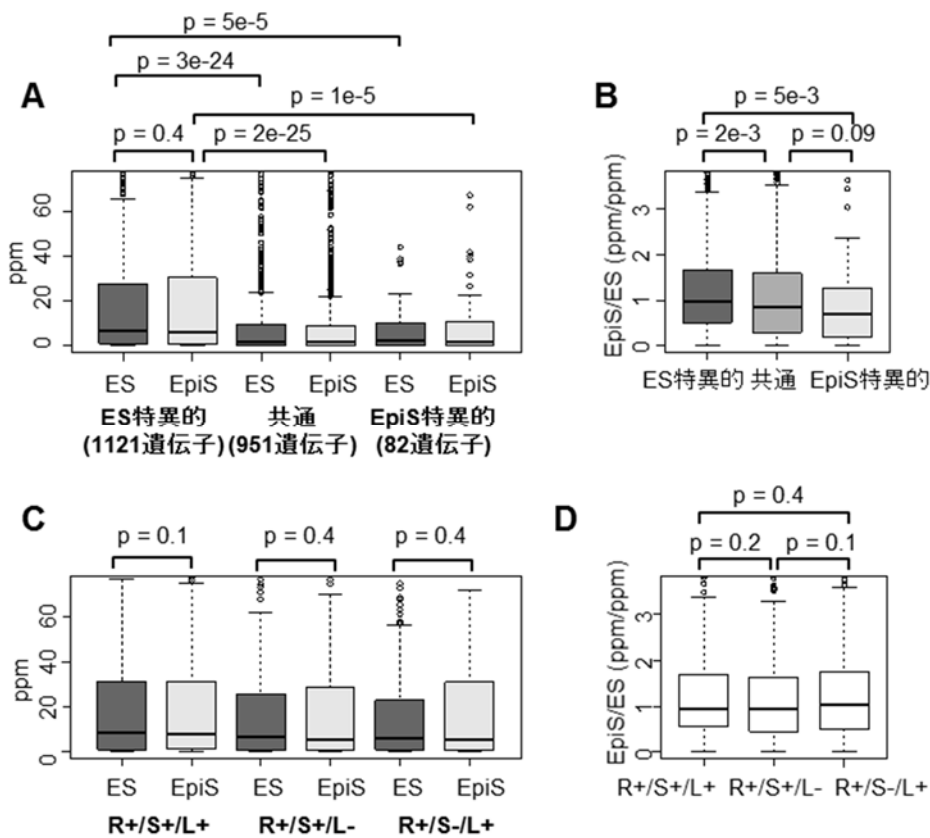


図 4-11. Rest 複合体の結合と ES 細胞と EpiS 細胞での発現量との関係
 (A、C) Rest 複合体の結合の細胞特異性(A)と結合様式(C)が異なる遺伝子の ES 細胞と EpiS 細胞における発現量。(B、D) Rest 複合体の結合の細胞特異性(B)と結合様式(D)が異なる遺伝子の ES 細胞の発現量に対する EpiS 細胞での発現量。p 値はウィルコクソンの符号順位検定により計算した。

Rest のターゲット遺伝子と Rest の結合部位のパターンについて

Rest の結合パターンと Rest による発現抑制との関係を調べるために、mRNA-Seq 解析により計測した ES 細胞での Rest ノックダウンによる発現変化データとの比較を行った。ノックダウンの効率は図 3-5 と同様に qRT-PCR により確認した(図 4-12A)。Sin3A と Lsd1 の発現量は Rest によって影響を受けないことも示された。Rest ノックダウンにより、2 倍以上の発現の亢進が見られた遺伝子を Rest のターゲット遺伝子とした。Rest の 8 つのターゲット遺伝子について、qRT-PCR を行いノックダウンによる遺伝子発現の亢進を確認した(図 4-12B)。

ES 細胞特異的と共通の結合遺伝子について、Rest ノックダウンによる発現量への影響を調べた(表 4-10)。必ずしも転写量が亢進するわけではなかったが、Rest ノックダウンによって 2 倍以上発現上昇が確認できた遺伝子は、ES 細胞特異的な結合遺伝子では 60 個 (5%)、共通の結合遺伝子では 143 個(15%)であった。発現が上昇する遺伝子の割合は、ES 細胞特異的なものよりも共通の結合遺伝子で高いことがわかった。ノックダウンで発現の低下が確認された ES 細胞特異的な Rest ターゲット遺伝子と共通のターゲット遺伝子の一覧は表 4-10、11 に示した。

同様に、Rest 複合体の結合様式と発現亢進した遺伝子との比較を行った(表 4-10)。共通の Rest 結合遺伝子では、R+/S+/L+結合遺伝子のうちの 19%、R+/S+/L-の 11%と R+/S-/L+の 8% が Rest ノックダウンにより 2 倍以上に亢進していた。また、ES 細胞特異的な結合遺伝子では R+/S+/L+の 6%、R+/S+/L-の 7%と R+/S-/L+の 3%で発現が亢進していた。

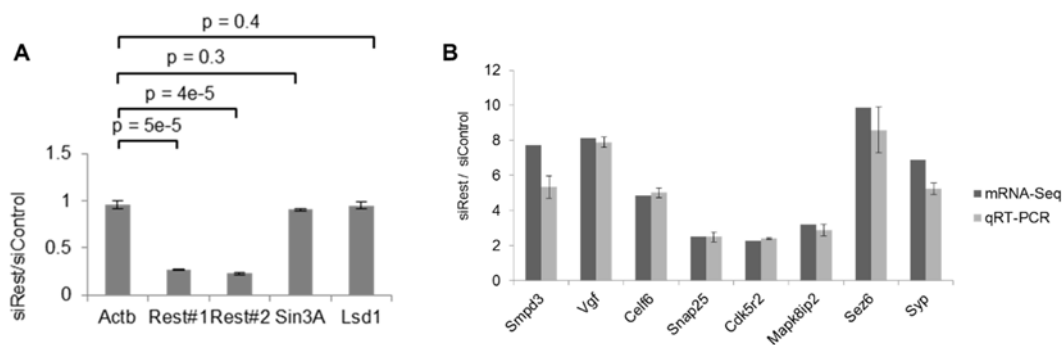


図 4-12. siRest によるノックダウンの確認

(A) siRest によるノックダウン効率。#1 と#2 は Rest の異なる位置に設計したプライマーである。p 値は t 検定により計算した。(B) siRest によるターゲット遺伝子の亢進の確認。プライマーは表 2-1 のものを用いた。△△Ct 法のコントロールとして、Gapdh のプライマーを用いた。

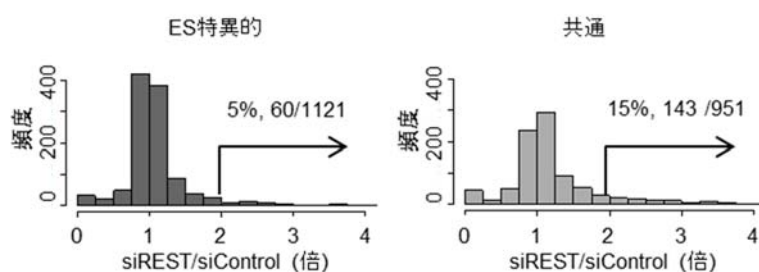


図 4-13. siRest による Rest 結合遺伝子の発現変化

コントロール siRNA を導入した ES 細胞に対する siRest を導入した細胞での発現量のヒストグラム。結合遺伝子の数に対する 2 倍以上亢進したターゲット遺伝子の割合を矢印の上を示した。

表 4-9. Rest 複合体の結合部位と Rest のターゲット遺伝子の関係

カテゴリー	コーディング遺伝子			ノンコーディング遺伝子		
	R+/S+/L+	R+/S+/L-	R+/S-/L+	R+/S+/L+	R+/S+/L-	R+/S-/L+
ES特異的(全体)	393	435	350	35	50	46
ES特異的(ノックダウンにより 2倍以上上昇)	23 (6%)	29 (7%)	10 (3%)	0 (0%)	3 (6%)	4 (9%)
共通(全体)	624	255	125	48	31	9
共通(ノックダウンにより 2倍以上上昇)	117 (19%)	27 (11%)	10 (8%)	7 (15%)	1 (3%)	0 (0%)

ES 細胞特異的と共通の結合遺伝子の数と、Rest ノックダウンによって 2 倍以上の発現亢進が観察されたターゲット遺伝子の数。括弧内に各カテゴリーに属する結合遺伝子中のターゲット遺伝子の割合を示した。

表 4-10. ES 細胞特異的な Rest のターゲット遺伝子

group_id	RefSeqID	Description	GeneSymbol	fold(siREST/siControl)	Chromosome	Start	End	Strand
125	NM_001190352	transmembrane protein 132B	Tmem132b	2.1	chr5	126012787	126272953	+
863	NM_001081141	gamma-aminobutyric acid (GABA) B receptor, 2	Gabbr2	2.5	chr4	46676769	47004586	-
902	NM_183224	family with sequence similarity 19, member A3	Fam19a3	2.3	chr3	104570322	104580465	-
1075	NM_001168521.NM_172795	sterile alpha and HEAT/Armadillo motif containing 1	Sarm1	2.5	chr11	78285831	78311256	-
1253	NM_021491	sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral	Smpd3	7.7	chr8	108776447	108861888	-
1739	NM_001029873	unc-13 homolog A (C. elegans)	Unc13a	7.1	chr8	74150611	74195656	-
1818	NM_007606	carbonic anhydrase 3	Car3	2.3	chr3	14863537	14872373	+
1863	NM_175499	SLIT and NTRK-like family, member 6	Slitrk6	2.0	chr14	111147799	111154371	-
2715	NM_008225	hematopoietic cell specific Lyn substrate 1	Hcls1	2.5	chr16	36935068	36963300	+
3534	NM_152229	nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1	Nr2e1	2.0	chr10	42281776	42303394	-
3759	NM_008782	paired box gene 5	Pax5	4.7	chr4	44544377	44723312	-
4727	NM_001033479	predicted gene 1527	Gm1527	3.5	chr3	28791538	28825646	+
4800	NM_023463	lymphocyte antigen 6 complex, locus G6C	Ly6g6c	2.6	chr17	35204269	35206993	+
4858	NM_182694.NM_182696	gametogenetin	Ggn	2.0	chr7	29955228	29958952	+
4900	NM_010199.NM_183064	fibroblast growth factor 12	Fgf12	3.6	chr16	28160183	28753288	-
4942	NM_001101483	transmembrane protein 22	Tmem22	2.2	chr9	100452606	100471504	-
5144	NM_010077	dopamine receptor D2	Drd2	10.4	chr9	49148766	49215819	+
5208	NM_183311	transmembrane protein 145	Tmem145	2.8	chr7	26091126	26101214	+
5699	NM_008596	synaptophysin-like 2	Sypl2	2.2	chr3	108015183	108029517	-
5783	NM_133996	apolipoprotein N	Apon	5.7	chr10	127691186	127692957	+
5991	NM_013550	histone cluster 1, H3a	Hist1h3a	2.4	chr13	23853721	23854255	-
6167	NM_001034909	predicted gene 6034	Gm6034	2.6	chr17	36179905	36195590	+
6245	NM_181345	nucleophosmin/nucleoplasmin 2	Npm2	2.5	chr14	71047108	71053288	-
6882	NM_023852	RAB3C, member RAS oncogene family	Rab3c	2.6	chr13	110844395	111070414	-
7865	NM_008344	insulin-like growth factor binding protein 6	Igfbp6	5.0	chr15	101974616	101979943	+
7916	NM_001011732	X Kell blood group precursor related family member 7 homolog	Xkr7	5.1	chr2	152857587	152895111	+
8032	NM_153131	unc-5 homolog A (C. elegans)	Unc5a	3.1	chr13	55090792	55107379	+
8833	NM_133229	ipply3 homolog (zebrafish)	Ipply3	2.4	chr16	94550028	94553542	+
8866	NM_008718	neuronal PAS domain protein 1	Npas1	5.5	chr7	17041069	17062129	-
9201	NM_019444	receptor (calcitonin) activity modifying protein 2	Ramp2	2.7	chr11	101107647	101109564	+
9238	NM_010350	glutamate receptor, ionotropic, NMDA2C (epsilon 3)	Gria2c	2.9	chr11	115110492	115128557	-
9288	NM_001098203.NM_010430	hypermethylated in cancer 1	Hic1	2.0	chr11	74979066	74983757	-
9416	NM_027222	RIKEN cDNA 2010001M09 gene	2010001M09Rik	2.3	chr18	35806918	35809021	-
9479	NM_177667	tetratricopeptide repeat domain 22	Ttrc22	5.0	chr4	106295053	106312792	+
10030	NM_009872	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 2 (p39)	Cdk5r2	2.3	chr1	74901602	74904306	+
10139	NM_026315	RIKEN cDNA 1700011L22 gene	1700011L22Rik	4.0	chr8	81734328	81772482	-
11484	NM_001163760.NM_001163761	RIKEN cDNA 6430548M08 gene	6430548M08Rik	2.1	chr8	122638051	122689207	+
11644	NM_001081017	unc-79 homolog (C. elegans)	Unc79	4.7	chr12	104187068	104422207	+
12915	NM_145217	DIRAS family, GTP-binding RAS-like 1	Diras1	2.8	chr10	80482334	80488122	-
13687	NM_001080943	zinc finger, DHHC-type containing 22	Zdhc22	17.7	chr12	88324330	88329626	-
13864	NM_199065	SLIT and NTRK-like family, member 1	Slitrk1	2.4	chr14	109309205	109313456	-
13971	NM_139228	rhomboid, veinlet-like 3 (Drosophila)	Rhbdl3	2.7	chr11	80114413	80169488	+
15171	NM_001177900.NM_023727	retinal degeneration 3	Rd3	5.0	chr1	193801253	193811263	+
15183	NM_008207	histocompatibility 2, T region locus 24	H2-T24	2.8	chr17	36142639	36157905	-
15556	NM_008036	FBJ osteosarcoma oncogene B	Fosb	5.0	chr7	19888044	19895394	-
15998	NM_001024645	leucine rich repeat containing 16B	Lrrc16b	3.7	chr14	56109929	56127101	+
16095	NM_001145879	ATPase, H+ transporting, lysosomal accessory protein 1-like	Atp6ap1l	2.5	chr13	91023053	91044960	-
16262	NM_031396	cyclin M1	Cnmn1	2.3	chr19	43514925	43571703	+
16437	NM_001025364.NM_013648	reticulum 2 (Z-band associated protein)	Rtn2	2.1	chr7	19867972	19881513	+
16453	NM_009844	CD19 antigen	Cd19	4.5	chr7	133551961	133558384	+
16958	NM_175654	histone cluster 1, H4d	Hist1h4d	2.3	chr13	23673470	23673782	+
17160	NM_009602	cholinergic receptor, nicotinic, beta polypeptide 2 (neuronal)	Chrnrb2	8.8	chr3	89557369	89568554	-
17786	NM_001081283	transmembrane protein 28	Tmem28	2.2	chrX	97016407	97041684	+
17834	NM_194333	solute carrier family 23 (nucleobase transporters), member 3	Slc23a3	2.5	chr1	75122115	75130464	-
18004	NM_001110796.NM_011995	piccolo (presynaptic cytomatrix protein)	Pclo	2.5	chr5	14514917	14863459	+
18064	NM_001271005	RIKEN cDNA C920025E04 gene	C920025E04Rik	2.6	chr17	36245974	36248621	-
18644	NM_030707	Fc receptor-like 5, scavenger receptor	Fcrl5	2.9	chr3	87054886	87067446	-
18996	NM_175440	protease, serine, 27	Prss27	3.6	chr17	24175209	24182916	+
19043	NM_023732	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	Abcb6	2.1	chr1	75168214	75176857	-
19377	NM_020047	tumor-associated calcium signal transducer 2	Tacsit2	2.0	chr6	67484052	67485816	-

1 列目に研究室内で用いている ID、2 列目に RefSeq の ID、3 列目に遺伝子の説明、4 列目に遺伝子名、5 列目にノックダウンによる遺伝子発現の上昇率、6-9 列目に転写産物の座標及びストランドを示した。表 4-11 にも同様に示した。

Rest のターゲット遺伝子と ES 細胞での機能について

Rest のターゲット遺伝子には、ES 細胞において増殖に関係する機能が示されている遺伝子が含まれていた。 γ アミノ酪酸(GABA_A)受容体サブユニット $\beta 3$ (Gabbr3)はマウスの ES 細胞で発現する主要な GABA_A 受容体サブユニットである。Gabbr3 は ES 細胞において分化に非依存的に細胞増殖を抑制する因子であることが知られている(Andäng et al. 2008)。Gabbr3 への Rest の結合は ES 細胞と EpiS 細胞の両方に検出されたが、TSS-Seq では EpiS 細胞において ES 細胞の 2.6 倍程度の発現量を示していた(図 4-14A)。また、ES 細胞における Rest のノックダウンによって 2 倍以上亢進していることから、Rest によって負に制御されていることが確認できた。両方の細胞で Rest の結合が検出されたにも関わらず、Sin3A の結合シグナル強度は EpiS 細胞に比べて ES 細胞で高いシグナルを示していた(図 4-14B)。また、転写開始点周辺のクロマチン修飾のパターンから活性性のマーカーは EpiS 細胞において高く、Sin3A の結合強度の違いによりこの変化が誘導されていると考えられた(図 4-14C)。EpiS 細胞は ES 細胞に比べて増殖速度が遅いことが知られている。Rest による Gabbr3 の制御の違いが、ES 細胞と EpiS 細胞の増殖速度の違いに影響を与えている可能性が考えられた(図 4-14D)。

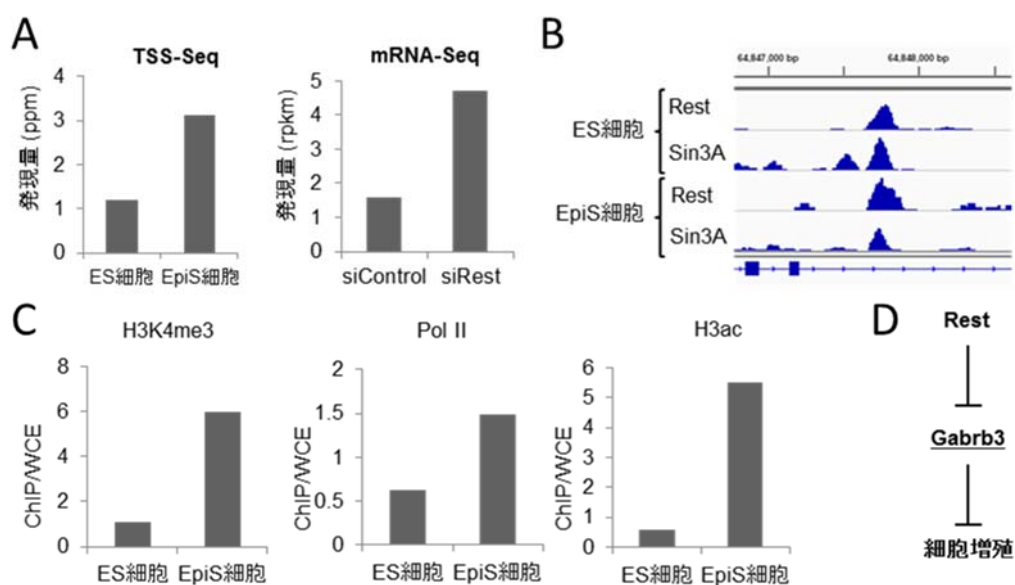


図 4-14. Gabbr3 と Rest の関係

(A)TSS-Seq により測定した Gabbr3 の ES 細胞と EpiS 細胞での発現量と、mRNA-Seq により測定した Rest ノックダウンによる Gabbr3 の発現変化。(B)Gabbr3 の Rest 結合部位への Rest と Sin3A の結合。(C)転写開始点周辺の活性性のクロマチンマーカーのシグナル強度。(D)Rest による Gabbr3 を介した細胞増殖の制御のモデル図。

また、インスリン様成長因子 2 (Igf2)に強く結合することでその活性を阻害する Igfbp6 は、ES 細胞特異的なターゲット遺伝子に含まれていた(表 4-10) (Bach 1999)。Igfbp6 の発現は EpiS 細胞において ES 細胞よりも高く、ロックダウンによる発現の亢進も確認された(図 4-15A)。Igf2 について、ヒト ES 細胞の自己増殖に重要であることが示されている (Bendall et al. 2007)。Igf2 は、EpiS 細胞において ES 細胞の 20 倍以上高い発現を示していた。EpiS 細胞において Rest による Igfbp6 の抑制が解除することで、EpiS 細胞で高発現する Igf2 の活性が適度な強さになるようにネガティブフィードバックを行っているのではないかと考えられた(図 4-15C)。また、パスウェイ解析においてインスリンパスウェイの遺伝子が ES 細胞特異的なターゲットに含まれていた(表 4-6)。インスリンパスウェイは多くの因子を Igf パスウェイと共有していることが知られている(Belfiore et al. 2009)。さらに、Igf2 の転写を促進する因子である Gli1 の周辺でも Rest の結合が検出された(図 4-15B) (Ingram et al. 2002)。Gli1 への Rest の結合はどちらの細胞でも検出することができたが、ES 細胞に比べて EpiS 細胞で強い結合強度を示していた。また、その発現量は Rest の結合の弱い ES 細胞において EpiS 細胞の 23 倍以上と高い値であった。ES 細胞における Rest ノックダウンによる遺伝子発現の上昇は見られたが、それほど大きな上昇ではなかった。これは、ES 細胞での Rest による Gli1 への抑制がそれほど強いものではなく、EpiS 細胞において特異的に強い Gli1 への抑制が行われているためだと考えられた(図 4-15C)。以上のことから、Rest は Igf2 に関わる遺伝子を選択的に調節することで、Igf2 による増殖促進を適切なレベルに保つ役割を担っていると考えた。

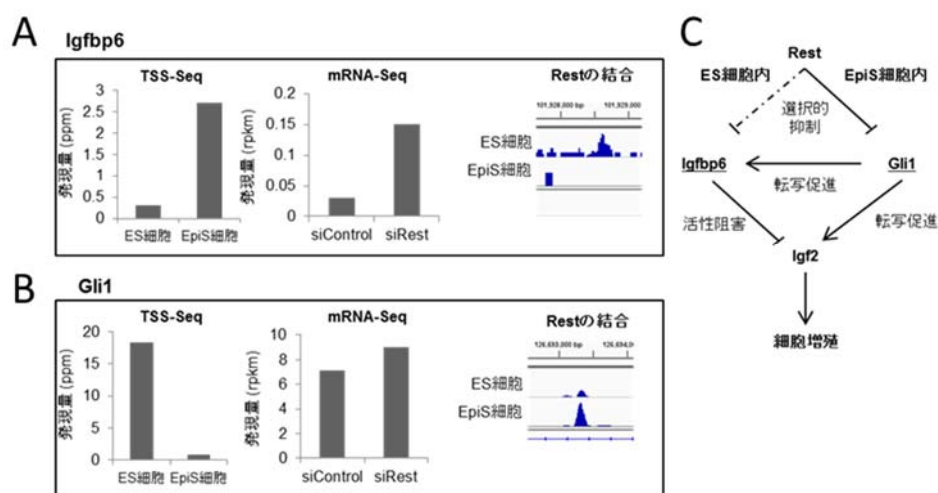


図 4-15. Igf2 の制御と Rest の関係

(A、B) Igfbp6 (A) と Gli1 (B) の TSS-Seq により計測した ES 細胞と EpiS 細胞での発現量。mRNA-Seq により測定した Rest ノックダウンによる発現変化。各遺伝子の Rest 結合部位 (Rest 結合部位は Igfbp6 の 50kbp 上流に、Gli1 の 80kbp 下流にそれぞれ存在していた)。(C) Rest による Igf2 の制御のモデル図。

ノンコーディング遺伝子に対する Rest の制御

ヒトとマウスの両方の多能性に対して、長鎖ノンコーディング RNA が重要な役割を担っていることが分かっている(Guttman et al. 2011; Wang et al. 2013)。RefSeq に登録されているノンコーディング遺伝子と TSS-Seq により 5ppm 以上の発現量を示した遺伝子間領域に存在する新規遺伝子のうち、転写開始点から 50kbp 以内、もしくは遺伝子領域内に Rest 複合体の因子の結合部位を含む遺伝子を各因子の結合ノンコーディング遺伝子とした(表 4-2)。ノンコーディング遺伝子への Rest 結合部位を、Rest 複合体の結合様式と細胞特異性により、パターン分けした(表 4-3, 4)。ノンコーディング遺伝子周辺の ES 細胞特異的、EpiS 細胞特異的、共通の Rest 結合部位の例を図 4-16 に示した。

パターン分けしたノンコーディング遺伝子周辺の Rest の結合部位と結合ノンコーディング遺伝子について、コーディング遺伝子で行ったのと同様の一連の解析を行った(図 4-16)。多くの解析において、コーディング遺伝子と同様の結果が得られた。ノンコーディング遺伝子への Rest の結合部位のうち最も多いものは ES 細胞特異的なものであり、そのシグナル強度は共通に結合している結合部位で最も強い強度を示した(図 4-17A, C)。Rest のコンセンサス配列も ES 細胞特異的もしくは共通の遺伝子からのみ検出された(図 4-17B)。Rest 結合部位周辺のヒストン修飾のシグナルについても、コーディング遺伝子と同様の傾向が確認された(図 4-17D)。以上のことから、Rest はノンコーディング遺伝子に対してもコーディング遺伝子と同様の制御をしていることを示した。さらに、Rest 結合ノンコーディング遺伝子のうち、Rest ノックダウンによって発現が変化するものを調べた。その結果、ES 特異的なターゲットノンコーディング遺伝子として、7 遺伝子、共通のターゲット遺伝子として 8 遺伝子を同定した(表 4-13)。

先行研究において、Rest が miR21 の発現を抑制することで多能性を正に制御していることが報告されていたが(Singh et al. 2008)、その後の研究においてはこの制御は否定されている(Jørgensen et al. 2009; Buckley et al. 2009)。今回の解析からも、miR21 への Rest の結合は ES 細胞と EpiS 細胞の両方で確認することはできなかった(図 4-18A)。また、miR21 の前駆体である pri-miR21 は、Rest ノックダウンの有無に関わらずほとんど発現を示さなかった(図 4-18B)。このことから、Rest による miR21 の制御は ES 細胞と EpiS 細胞のどちらでも行われていない可能性が高いことを示唆した。

さらに、コーディング遺伝子とノンコーディング遺伝子への Rest 結合部位について、その進化的な保存性を解析した。進化的な保存性の指標として PhastCons score を用いた(Siepel et al. 2005)。その結果、全体として、コーディング遺伝子の結合部位の方がノンコーディング遺伝子よりも保存性が高いことが分かった(図 4-19A)。さらに、コーディング遺伝子においては、Rest ノックダウンによって 2 倍以上の発現の亢進が見られたターゲット遺伝子の結合部位が特に高い保存性を示していた。しかし、ノンコーディング遺伝子においては、逆にターゲット遺伝子の結合部位で低い保存性が観察された(図 4-19)。これまで、

ノンコーディング遺伝子の遺伝子配列は進化的な保存性が低いことは知られていた。たとえば、ヒトにおいて、抑制性のヒストン修飾を行うポリコム複合体の足場となる長鎖ノンコーディング RNA である HOTAIR は、マウスにおいてはその配列がほとんど保存されていないことが示されている(He et al. 2011)。今回の結果から、ノンコーディング遺伝子が自身の配列だけでなく、その制御領域についても進化的な変化が起こりやすいことで、ノンコーディング RNA による制御の多様性が生まれている可能性を示唆した。

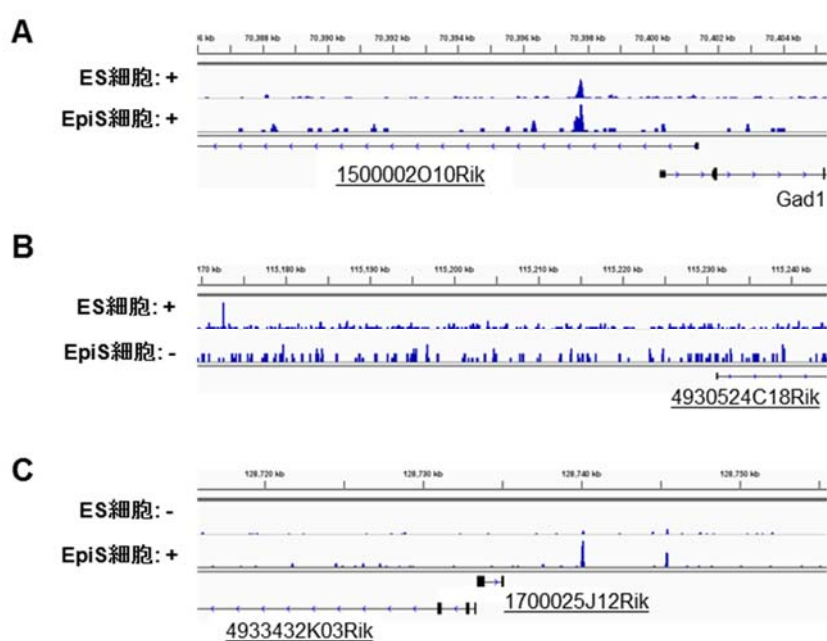


図 4-16. ES 細胞と EpiS 細胞におけるノンコーディング遺伝子への Rest の結合
ES 細胞と EpiS 細胞で共通(A)、ES 細胞に特異的(B)、EpiS 細胞で特異的(C)に結合しているノンコーディング遺伝子周辺の Rest 結合部位。下線が引かれている遺伝子がノンコーディング遺伝子を示している。

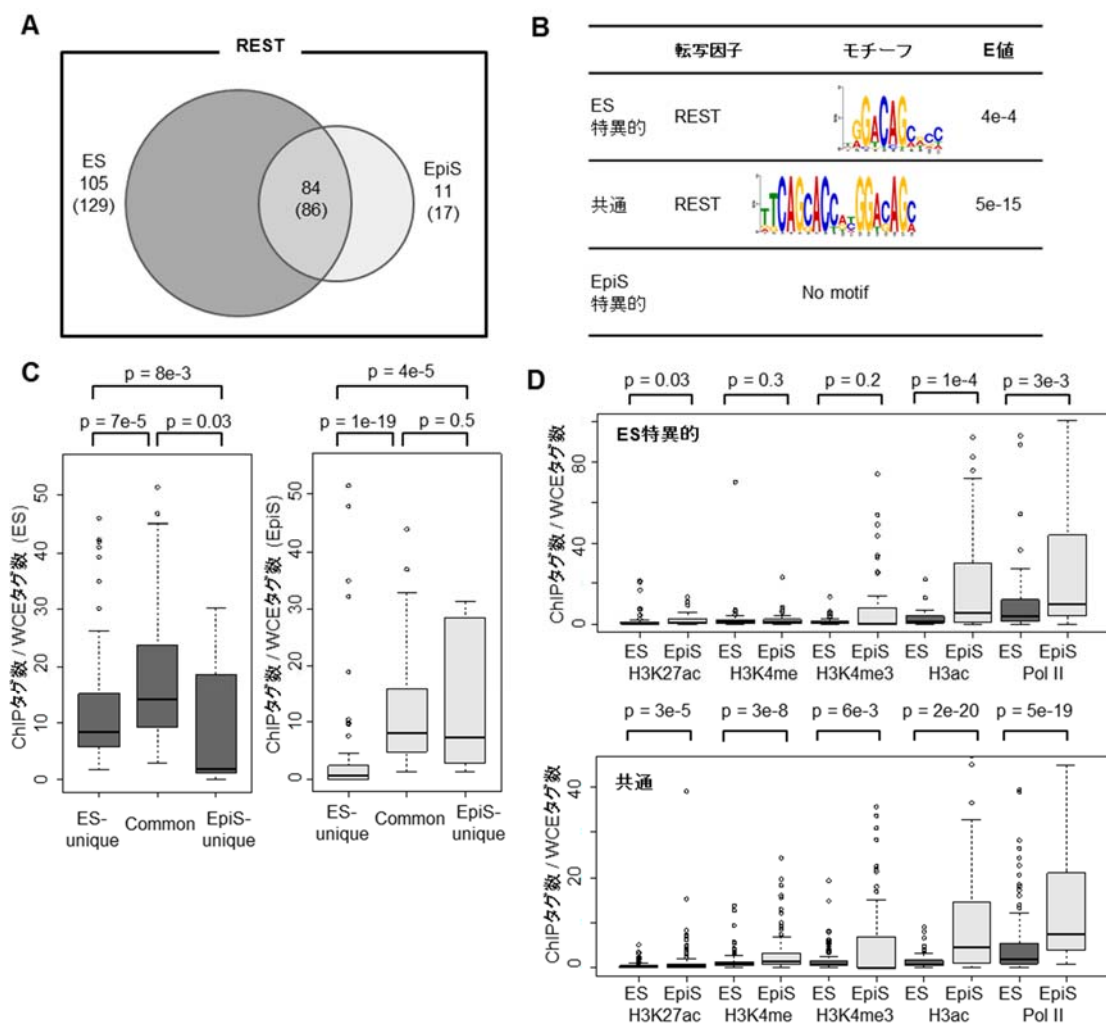


図 4-17. ノンコーディング遺伝子への Rest 結合部位の解析

(A) ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 結合部位の重複。(B) Rest 結合部位の de novo のモチーフ検出。(C) ES 細胞と EpiS 細胞での細胞特異性の異なる Rest 結合部位の ChIP-Seq のシグナル強度。(D) ES 細胞特異的と共通の Rest 結合部位周辺のクロマチンマーカーのシグナル強度。p 値はウィルコクソンの符号順位検定により計算した。

表 4-12. Rest ターゲットノンコーディング遺伝子

group_id	RefSeqID	Description	GeneSymbol	fold(siREST/siControl)	Chromosome	Start	End	Strand	category
25289	NR_046306	snoRNA DQ267102	DQ267102	2.22	chr12	110894654	110894625	+	ES-unique
25512	NR_028480	predicted gene 12238	Gm12238	4.03	chr11	55296207	55296331	+	ES-unique
i_48196				2.59		135564196	135564597	+	ES-unique
24290	NR_037988	predicted gene, 16701	Gm16701	2.50	chr1	168904153	168929861	-	ES-unique
24369	NR_001584	spermatogenesis associated glutamate (E)-rich protein 8, pseudogene 1	Speer8-ps1	7.50	chr5	14945293	14978541	+	ES-unique
24501	NR_045743	Riken cDNA D930007P13 gene	D930007P13Rik	2.94	chr15	102953500	102977259	-	ES-unique
24993	NR_028515	small nucleolar RNA, H/ACA box 7	Snora78	2.41	chr17	24856620	24856777	-	ES-unique
23598	NR_040496	RIKEN cDNA 1500002O10 gene	Gad1os	2.62	chr2	70327996	70401414	-	Common
23798	NR_040372	predicted gene 14169	Gm14169	4.00	chr2	156434933	156439158	-	Common
23985	NR_037239	microRNA 3078	Mir3078	4.02	chr14	65210021	65210108	+	Common
24448	NR_040427	predicted gene 9899	Gm9899	2.00	chr5	30876359	30890992	-	Common
25003	NR_037312	microRNA 3474	Mir3474	4.00	chr2	158464318	158464376	+	Common
25773	NR_029441	RIKEN cDNA 2810454H06 gene	2810454H06Rik	4.67	chr6	134847978	134850803	+	Common
25793	NR_035501	microRNA 1839	Mir1839	2.95	chr7	88674801	88674874	+	Common
25957	NR_040595	RIKEN cDNA 4930419G24 gene	4930419G24Rik	4.30	chr3	32923698	32937329	+	Common

1 列目に研究室で用いている ID、2 列目に RefSeq の ID、3 列目に遺伝子の説明、4 列目に遺伝子名、5 列目にノックダウンによる遺伝子発現の上昇率、6-9 列目に転写産物の座標及びストランド、10 列目に遺伝子周辺の Rest 複合体の結合の細胞特異性を示した。

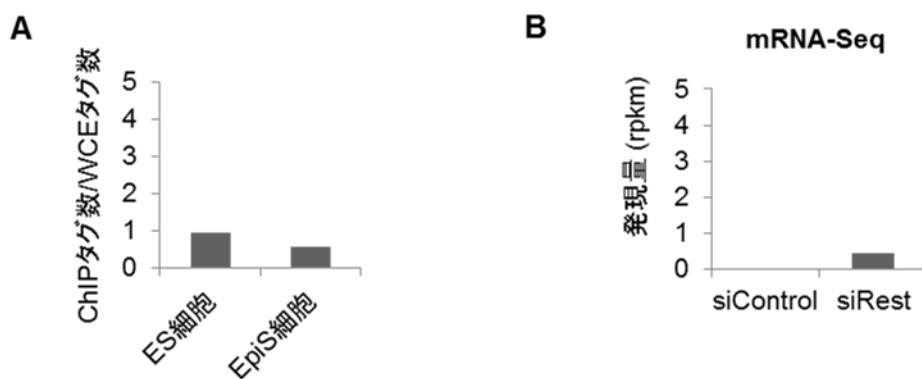


図 4-18. miR21 に対する Rest の機能について

(A) Singh et al. 2008 で示された Rest の miR21 への結合部位周辺の ChIP-Seq のシグナル強度。(B) mRNA-Seq により計測した Rest ノックダウンによる pri-miR21 の発現変化。

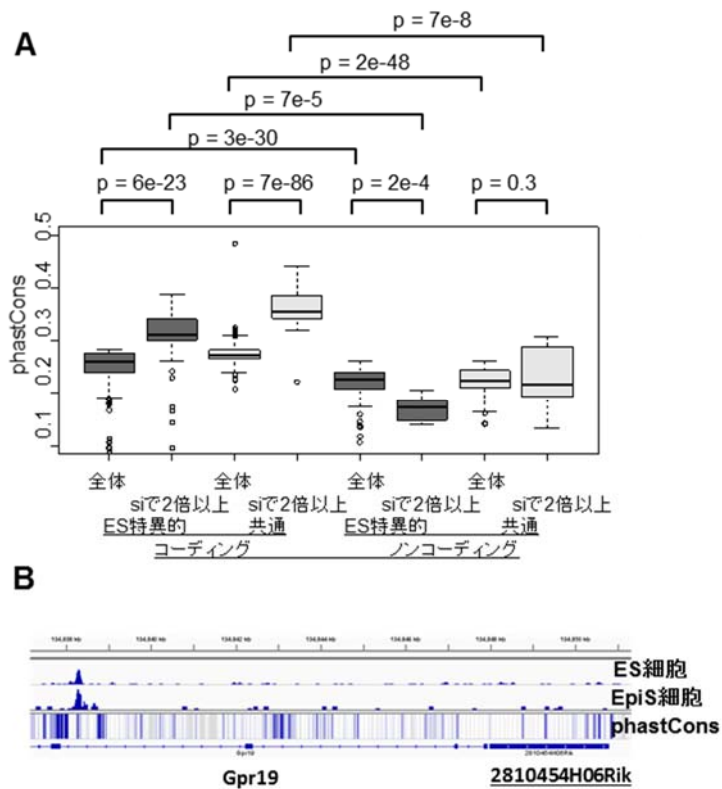


図 4-19. Rest 結合部位の進化的保存性

(A)コーディングとノンコーディング遺伝子の Rest 結合部位全体と Rest ノックダウンで 2 倍以上発現上昇したターゲット遺伝子の Rest 結合部位の PhastCons score。(B)ノンコーディング遺伝子の Rest 結合部位の例。一番下のヒートマップが PhastCons score を示している。下線が引かれた遺伝子がノンコーディング遺伝子。

5. 総括

本研究では、様々なクロマチン修飾を行う複合体を含む Rest 複合体に着目した。Rest 複合体の形成様式や結合の細胞特異性により、遺伝子発現や細胞状態にどのような影響を与えるのかについて解析を行った。

まず、Rest 複合体の構成因子である Sin3A と Lsd1 との共結合パターンを比較することで、Rest 複合体を 4 種類の結合様式に分類した。結合様式の違いと、結合遺伝子の発現レベル、Rest ノックダウンによる遺伝子発現変化や結合部位周辺のクロマチン修飾パターンとの比較を行った。その結果、Rest、Sin3A と Lsd1 がすべて結合している遺伝子群のみで Rest ノックダウンによる有意な発現の亢進が見られることを示した。また、H3K27me3 もすべての因子が結合している結合部位周辺でのみ検出された。これらのことから、Rest 複合体が安定的に形成している場合に、H3K27me3 の修飾が起こり Rest による遺伝子発現抑制が行われていると考えられた。

Rest の結合部位との比較から、Sin3A と Lsd1 の大半が Rest に依存せずにゲノム上に結合していることを示した。Rest 依存的な結合遺伝子は主に神経系に関係するものであったのに対して、Rest 非依存的に結合している Sin3A や Lsd1 は転写制御、細胞周期や分化に関わる遺伝子に結合しており、その発現量は Rest 依存的なものよりも高いことを示した。また、クロマチン修飾との比較から、Rest 非依存的な Sin3A の結合部位には転写活性化に関わるマーカーが、Lsd1 には転写活性化とエンハンサーに関わるマーカーが高い割合で存在することを示した。このことから、Sin3A が転写活性化に、Lsd1 が転写活性化やエンハンサーに関わることを示唆した。実際、Lsd1 に関しては、活性性のエンハンサーに結合していて、迅速な抑制に必要であることが先行研究により示されている。

Sin3A と Lsd1 をリクルートする因子の探索も行った。Rest 非依存的に結合している Sin3A と Lsd1 の結合部位は 2000 か所以上で重複していたことから、その両者をリクルートする因子の存在が想定された。Tet1 は Sin3A の結合部位のうち 2/3 に共結合していることや Sin3A をリクルートする機能が示されており、Tet1 が Lsd1 もリクルートする可能性が考えられた。先行研究の Tet1 の ChIP-Seq のデータから検出した Tet1 の結合部位と Lsd1 の結合部位を比較したところ、Rest 依存・非依存に関わらず Lsd1 の結合部位の 1/3 で Tet1 との共局在が観察された。Co-IP からも Tet1 と Lsd1 及び Tet1 と Rest が相互作用していることが示された。このことから、Lsd1 は Tet1 によって直接的もしくは Rest 複合体を介して間接的にリクルートされることを示唆した。また、Rest 複合体が Tet1 をリクルートしている可能性も考えられた。DNA のモチーフ解析から、Sin3A 結合配列には ES 細胞の増殖に重要な Myc-centric module の転写因子群のモチーフが、Lsd1 の結合には ES 細胞の多能性維持に重要な Oct4-centric module の転写因子群やリプレッサーの Ctf のモチーフが濃縮していることを示した。先行研究により行われた ES 細胞で重要な転写因子の

ChIP-Seq データから検出した結合部位と比較したところ、モチーフ解析の結果と同様の転写因子との共結合が観察された。このことから、Sin3A が Myc-centric module の転写因子群に、Lsd1 が Myc-centric module と Oct4-centric module の転写因子群と Ctf1 によってリクルートされている可能性を示唆した。Lsd1 と Oct4-centric module の転写因子群によるリクルートについては、先行研究においても示されている。

また、ES 細胞に加えて、EpiS 細胞においても Rest 複合体の結合部位を網羅的に同定し、細胞間で Rest 複合体の結合パターンを比較した。EpiS 細胞において、EpiS 細胞特異的な Rest の結合部位はほとんど存在せず、多くの Rest 結合部位は ES 細胞と共通した結合部位であった。それに対して、ES 細胞特異的な Rest 結合部位は、共通した Rest 結合部位と同程度存在していることを示した。このことから、Rest は EpiS 細胞に比べて ES 細胞において選択的に多様な制御が行っている可能性を示唆した。ES 細胞特異的及び共通の Rest 結合部位や結合遺伝子について解析を行った。結合遺伝子の機能は共通のものでは主に神経系で発現する遺伝子であったのに対して、ES 細胞特異的な結合をしているものではクロマチン修飾やシグナル伝達に関わる遺伝子が濃縮していた。Rest 結合部位への Sin3A と Lsd1 の共結合パターンを比較したところ、EpiS 細胞では Sin3A が共結合している割合が ES 細胞よりも少ないことが示された。また、Rest 結合部位周辺のクロマチン修飾パターンについても比較したところ、ES 細胞に比べて EpiS 細胞において H3ac をはじめとする転写活性性のマーカーが高いシグナル強度を示していた。このことは Sin3A の Rest 複合体への結合性の違いを反映しているためであると考えた。ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 結合遺伝子の発現量についても解析を行ったところ、ES 細胞特異的な結合遺伝子で有意な変化が見られたが、変化の程度はそれほど大きいものではなかった。ES 細胞における Rest のノックダウンにより発現が 2 倍以上上昇した Rest ターゲットコーディング遺伝子は 203 個、ノンコーディング遺伝子は 15 個であった。Rest のターゲット遺伝子には、マウス ES 細胞における増殖の抑制に関わる Gabrb3 遺伝子や、ヒト ES 細胞において増殖を促進する Igf2 に結合してその活性を阻害する Igfbp6 などの増殖に関わる遺伝子が含まれていることを示した。また、コーディングとノンコーディング遺伝子周辺に存在する Rest 結合部位の配列の進化的保存性の違いについても、解析を行った。その結果、ノンコーディング遺伝子への結合配列の方が低い保存性を示していた。ノンコーディング遺伝子は遺伝子配列だけでなく、その制御配列に関しても進化的な多様性が生じやすいことを示していると考えた。

以上のことから、Rest 複合体の形成の仕方によって、その抑制機能に影響を与えることを示した。また、Sin3A と Lsd1 は Rest 以外の抑制性及び活性性の様々な転写因子と共局在や相互作用をしていることを示唆した。ES 細胞と EpiS 細胞の比較から、Rest 複合体の結合パターンや形成様式が大きく異なることを明らかにした。したがって、Rest 複合体は複合体形成の仕方や結合の細胞特異性の違いによって、多様な制御を行っていることを示した。

6. 参考文献

- Amente S, Bertoni A, Morano A, Lania L, Avvedimento E V, Majello B. 2010. LSD1-mediated demethylation of histone H3 lysine 4 triggers Myc-induced transcription. *Oncogene* **29**: 3691–3702.
- Andäng M, Hjerling-Leffler J, Moliner A, Lundgren TK, Castelo-Branco G, Nanou E, Pozas E, Bryja V, Halliez S, Nishimaru H, et al. 2008. Histone H2AX-dependent GABA(A) receptor regulation of stem cell proliferation. *Nature* **451**: 460–464.
- Bach L. 1999. Insulin-like growth factor binding protein-6: The "forgotten" binding protein? *Hormone and Metabolic Research* **31**: 226-234.
- Ballas N, Grunseich C, Lu DD, Speh JC, Mandel G. 2005. REST and its corepressors mediate plasticity of neuronal gene chromatin throughout neurogenesis. *Cell* **121**: 645–57.
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K. 2007. High-Resolution Profiling of Histone Methylations in the Human Genome. *Cell* **129**: 823–837.
- Belfiore A, Frasca F, Pandini G, Sciacca L, Vigneri R. 2009. Insulin receptor isoforms and insulin receptor/insulin-like growth factor receptor hybrids in physiology and disease. *Endocr Rev* **30**: 586–623.
- Bendall SC, Stewart MH, Menendez P, George D, Vijayaragavan K, Werbowetski-Ogilvie T, Ramos-Mejia V, Rouleau A, Yang J, Bossé M, et al. 2007. IGF and FGF cooperatively establish the regulatory stem cell niche of pluripotent human cells in vitro. *Nature* **448**: 1015–1021.
- Brons IGM, Smithers LE, Trotter MWB, Rugg-Gunn P, Sun B, Chuva de Sousa Lopes SM, Howlett SK, Clarkson A, Ahrlund-Richter L, Pedersen RA, et al. 2007. Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature* **448**: 191–5.
- Buckley NJ, Johnson R, Sun Y-M, Stanton LW. 2009. Is REST a regulator of pluripotency? *Nature* **457**: E5–6; discussion E7.

- Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, et al. 2008. Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell* **133**: 1106–1117.
- Chen ZF, Paquette AJ, Anderson DJ. 1998. NRSF/REST is required in vivo for repression of multiple neuronal target genes during embryogenesis. *Nat Genet* **20**: 136–142.
- Chong JA, Tapia-Ramirez J, Kim S, Toledo-Aral JJ, Zheng Y, Boutros MC, Altshuler YM, Frohman MA, Kraner SD, Mandel G. 1995. REST: A mammalian silencer protein that restricts sodium channel gene expression to neurons. *Cell* **80**: 949–957.
- Creyghton MP, Cheng AW, Welstead GG, Kooistra T, Carey BW, Steine EJ, Hanna J, Lodato MA, Frampton GM, Sharp PA, et al. 2010. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 21931–21936.
- Dietrich N, Lerdrup M, Landt E, Agrawal-Singh S, Bak M, Tommerup N, Rappsilber J, Södersten, E, Hansen K. 2012. REST-mediated recruitment of polycomb repressor complexes in mammalian cells. *PLoS Genet* **8**.
- Fisher CL, Fisher AG. 2011. Chromatin states in pluripotent, differentiated, and reprogrammed cells. *Curr Opin Genet Dev* **21**: 140–146.
- Greber B, Wu G, Bernemann C, Joo JY, Han DW, Ko K, Tapia N, Sabour D, Sternecker J, Tesar P, et al. 2010. Conserved and Divergent Roles of FGF Signaling in Mouse Epiblast Stem Cells and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell* **6**: 215–226.
- Guo G, Yang J, Nichols J, Hall JS, Eyres I, Mansfield W, Smith A. 2009. Klf4 reverts developmentally programmed restriction of ground state pluripotency. *Development* **136**: 1063–1069.
- Gupta S, Stamatoyannopoulos JA, Bailey TL, Noble WS. 2007. Quantifying similarity between motifs. *Genome Biol* **8**: R24.
- Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, Young G, Lucas AB, Ach R, Bruhn L, et al. 2011. lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* **477**: 295–300.

- He S, Liu S, Zhu H. 2011. The sequence, structure and evolutionary features of HOTAIR in mammals. *BMC Evol Biol* **11**: 102.
- Hinrichs AS. 2006. The UCSC Genome Browser Database: update 2006. *Nucleic Acids Res* **34**: D590–D598.
- Hooper M, Hardy K, Handyside A, Hunter S, Marilyn M. 1987. HPRT-deficient (Lesch-Nyhan) mouse embryos derived from germline colonization by cultured cells. *Nature* **326**: 292–295.
- Hu G, Wade PA. 2012. NuRD and pluripotency: A complex balancing act. *Cell Stem Cell* **10**: 497–503.
- Ingram WJ, Wicking CA, Grimmond SM, Forrest AR, Wainwright BJ. 2002. Novel genes regulated by Sonic Hedgehog in pluripotent mesenchymal cells. *Oncogene* **21**: 8196–8205.
- Johnson R, Teh CHL, Kunarso G, Kee YW, Srinivasan G, Cooper ML, Volta M, Chan SSL, Lipovich L, Pollard SM, et al. 2008. REST regulates distinct transcriptional networks in embryonic and neural stem cells. *PLoS Biol* **6**: 2205–2219.
- Jørgensen HF, Chen Z-F, Merckenschlager M, Fisher AG. 2009. Is REST required for ESC pluripotency? *Nature* **457**: E4–E5; discussion E7.
- Kanai A, Suzuki K, Tanimoto K, Mizushima-Sugano J, Suzuki Y, Sugano S. 2011. Characterization of STAT6 target genes in human B cells and lung epithelial cells. *DNA Res* **18**: 379–392.
- Kanehisa M, Goto S, Sato Y, Kawashima M, Furumichi M, Tanabe M. 2014. Data, information, knowledge and principle: Back to metabolism in KEGG. *Nucleic Acids Res* **42**: D199–205.
- Kel AE, Gössling E, Reuter I, Cheremushkin E, Kel-Margoulis O V, Wingender E. 2003. MATCH: A tool for searching transcription factor binding sites in DNA sequences. *Nucleic Acids Res* **31**: 3576–3579.

- Kim T-K, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, et al. 2010. Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**: 182–187.
- Koch CM, Andrews RM, Flicek P, Dillon SC, Karaöz U, Clelland GK, Wilcox S, Beare DM, Fowler JC, Couttet P, et al. 2007. The landscape of histone modifications across 1% of the human genome in five human cell lines. *Genome Res* **17**: 691–707.
- Laherty CD, Yang WM, Jian-Min S, Davie JR, Seto E, Eisenman RN. 1997. Histone deacetylases associated with the mSin3 corepressor mediate Mad transcriptional repression. *Cell* **89**: 349–356.
- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, Homer N, Marth G, Abecasis G, Durbin R. 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* **25**: 2078–2079.
- Liang J, Wan M, Zhang Y, Gu P, Xin H, Jung SY, Qin J, Wong J, Cooney AJ, Liu D, et al. 2008. Nanog and Oct4 associate with unique transcriptional repression complexes in embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* **10**: 731–739.
- Loh Y-H, Wu Q, Chew J-L, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, et al. 2006. The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells. *Nat Genet* **38**: 431–440.
- Machanick P, Bailey TL. 2011. MEME-ChIP: Motif analysis of large DNA datasets. *Bioinformatics* **27**: 1696–1697.
- McDonel P, Demmers J, Tan DWM, Watt F, Hendrich BD. 2012. Sin3a is essential for the genome integrity and viability of pluripotent cells. *Dev Biol* **363**: 62–73.
- McLeay RC, Bailey TL. 2010. Motif Enrichment Analysis: a unified framework and an evaluation on ChIP data. *BMC Bioinformatics* **11**: 165.
- Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, Lieberman E, Giannoukos G, Alvarez P, Brockman W, Kim T-K, Koche RP, et al. 2007. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature* **448**: 553–560.

- Mozzetta C, Pontis J, Fritsch L, Robin P, Portoso M, Proux C, Margueron R, Ait-Si-Ali S. 2014. The Histone H3 Lysine 9 Methyltransferases G9a and GLP Regulate Polycomb Repressive Complex 2-Mediated Gene Silencing. *Mol Cell* **53**: 277–289.
- Mulligan P, Westbrook TF, Ottinger M, Pavlova N, Chang B, Macia E, Shi YJ, Barretina J, Liu J, Howley PM, et al. 2008. CDYL Bridges REST and Histone Methyltransferases for Gene Repression and Suppression of Cellular Transformation. *Mol Cell* **32**: 718–726.
- Nascimento EM, Cox CL, MacArthur S, Hussain S, Trotter M, Blanco S, Suraj M, Nichols J, Kübler B, Benitah SA, et al. 2011. The opposing transcriptional functions of Sin3a and c-Myc are required to maintain tissue homeostasis. *Nat Cell Biol* **13**: 1395–1405.
- Negrini S, Prada I, D'Alessandro R, Meldolesi J. 2013. REST: An oncogene or a tumor suppressor? *Trends Cell Biol* **23**: 289–295.
- Ng H-H, Surani MA. 2011. The transcriptional and signalling networks of pluripotency. *Nat Cell Biol* **13**: 490–496.
- Nichols J, Smith A. 2011. The origin and identity of embryonic stem cells. *Development* **138**: 3–8.
- Okamura D, Mochizuki K, Taniguchi H, Tokitake Y, Ikeda M, Yamada Y, Tournier C, Yamaguchi S, Tada T, Schöler HR, et al. 2012. REST and its downstream molecule Mek5 regulate survival of primordial germ cells. *Dev Biol* **372**: 190–202.
- Ooi L, Wood IC. 2007. Chromatin crosstalk in development and disease: lessons from REST. *Nat Rev Genet* **8**: 544–554.
- Orkin SH, Hochedlinger K. 2011. Chromatin connections to pluripotency and cellular reprogramming. *Cell* **145**: 835–850.
- Patterson JM, Johnson MH, Zimonjic DB, Graubert TA. 2000. Characterization of Ly-6M, a novel member of the Ly-6 family of hematopoietic proteins. *Blood* **95**: 3125–3132.
- Portales-Casamar E, Thongjuea S, Kwon AT, Arenillas D, Zhao X, Valen E, Yusuf D, Lenhard B, Wasserman WW, Sandelin A. 2009. JASPAR 2010: The greatly expanded open-access database of transcription factor binding profiles. *Nucleic Acids Res* **38**.

- Quinlan AR, Hall IM. 2010. BEDTools: A flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics* **26**: 841–842.
- Rada-Iglesias A, Bajpai R, Swigut T, Brugmann SA, Flynn RA, Wysocka J. 2011. A unique chromatin signature uncovers early developmental enhancers in humans. *Nature* **470**: 279–283.
- Robinson JT, Thorvaldsdóttir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G, Mesirov JP. 2011. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**: 24–26.
- Rosenfeld JA, Wang Z, Schones DE, Zhao K, DeSalle R, Zhang MQ. 2009. Determination of enriched histone modifications in non-genic portions of the human genome. *BMC Genomics* **10**: 143.
- Sankar S, Bell R, Stephens B, Zhuo R, Sharma S, Bearss DJ, Lessnick SL. 2013. Mechanism and relevance of EWS/FLI-mediated transcriptional repression in Ewing sarcoma. *Oncogene* **32**: 5089–100.
- Siepel A, Bejerano G, Pedersen JS, Hinrichs AS, Hou M, Rosenbloom K, Clawson H, Spieth J, Hillier LW, Richards S, et al. 2005. Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes. *Genome Res* **15**: 1034–1050.
- Silverstein RA, Ekwall K. 2005. Sin3: A flexible regulator of global gene expression and genome stability. *Curr Genet* **47**: 1–17.
- Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. 2008. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature* **453**: 223–227.
- Singh SK, Veo BL, Kagalwala MN, Shi W, Liang S, Majumder S. 2012. Dynamic Status of REST in the Mouse ESC Pluripotency Network. *PLoS One* **7**.
- Tachibana M, Matsumura Y, Fukuda M, Kimura H, Shinkai Y. 2008. G9a/GLP complexes independently mediate H3K9 and DNA methylation to silence transcription. *EMBO J* **27**: 2681–2690.
- Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y, Agarwal S, Iyer LM, Liu DR, Aravind L, et al. 2009. Conversion of 5-methylcytosine to

- 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* **324**: 930–935.
- Tanimoto K, Tsuchihara K, Kanai A, Arauchi T, Esumi H, Suzuki Y, Sugano S. 2010. Genome-wide identification and annotation of HIF-1 α binding sites in two cell lines using massively parallel sequencing. *Hugo J* **4**: 35–48.
- Tesar P, Chenoweth J, Brook F, Davies T, Evans E, Mack D, Gardner R, McKay R. 2007. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **448**: 196–199.
- Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. 2013. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform* **14**: 178–192.
- Toyooka Y, Shimosato D, Murakami K, Takahashi K, Niwa H. 2008. Identification and characterization of subpopulations in undifferentiated ES cell culture. *Development* **135**: 909–918.
- Tsuchihara K, Suzuki Y, Wakaguri H, Irie T, Tanimoto K, Hashimoto SI, Matsushima K, Mizushima-Sugano J, Yamashita R, Nakai K, et al. 2009. Massive transcriptional start site analysis of human genes in hypoxia cells. *Nucleic Acids Res* **37**: 2249–2263.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JAM. 2007. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res* **35**.
- Vallier L, Mendjan S, Brown S, Chng Z, Teo A, Smithers LE, Trotter MWB, Cho CH-H, Martinez A, Rugg-Gunn P, et al. 2009. Activin/Nodal signalling maintains pluripotency by controlling Nanog expression. *Development* **136**: 1339–1349.
- Verhulst PJ, De Smet B, Saels I, Thijs T, Ver Donck L, Moechars D, Peeters TL, Depoortere I. 2008. Role of Ghrelin in the Relationship Between Hyperphagia and Accelerated Gastric Emptying in Diabetic Mice. *Gastroenterology* **135**: 1267–1276.
- Wang Y, Xu Z, Jiang J, Xu C, Kang J, Xiao L, Wu M, Xiong J, Guo X, Liu H. 2013. Endogenous miRNA Sponge lincRNA-RoR Regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in Human Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Dev Cell* **25**: 69–80.

- Whyte W, Bilodeau S, Orlando D, Hoke H, Frampton GM, Foster CT, Cowley SM, Young R. 2012. Enhancer decommissioning by LSD1 during embryonic stem cell differentiation. *Nature* **482**: 221–5.
- Williams K, Christensen J, Helin K. 2011a. DNA methylation: TET proteins—guardians of CpG islands? *EMBO Rep* **13**: 28–35.
- Williams K, Christensen J, Pedersen MT, Johansen J V, Cloos PAC, Rappsilber J, Helin K. 2011b. TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature* **473**: 343–348.
- Wingender E. 2008. The TRANSFAC project as an example of framework technology that supports the analysis of genomic regulation. *Brief Bioinform* **9**: 326–332.
- Wu H, D'Alessio AC, Ito S, Xia K, Wang Z, Cui K, Zhao K, Sun YE, Zhang Y. 2011. Dual functions of Tet1 in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Nature* **473**: 389–393.
- Yamada Y, Aoki H, Kunisada T, Hara A. 2010. Rest promotes the early differentiation of mouse ESCs but is not required for their maintenance. *Cell Stem Cell* **6**: 10–5.
- Yu H-B, Johnson R, Kunarso G, Stanton LW. 2011. Coassembly of REST and its cofactors at sites of gene repression in embryonic stem cells. *Genome Res* **21**: 1284–1293.
- Zhang Y, Liu T, Meyer CA, Eeckhoute J, Johnson DS, Bernstein BE, Nusbaum C, Myers RM, Brown M, Li W, et al. 2008. Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). *Genome Biol* **9**: R137.

7. 論文目録

原著論文

Seki M, Masaki H, Arauchi T, Nakauchi H, Sugano S, Suzuki Y. 2014.

A comparison of the rest complex binding patterns in embryonic stem cells and epiblast stem cells. PLoS One 9: e95374.

6. 謝辞

本研究を行うにあたり、熱心な指導をいただきました菅野純夫教授、鈴木穰教授に感謝いたします。

ご多忙の中、本論文の審査を引き受けてくださいました東京大学医科学研究所 東條有伸教授、中井謙太教授、松田浩一准教授、東京大学分子細胞生物学研究所 宮島篤教授に御礼申し上げます。

実験の指導していただきましたゲノム制御医科学分野 金井昭教博士(現 広島大学放射線医科学研究所助教)、谷本幸介博士(現 東京医科歯科大学難治疾患研究所助教)、入江拓磨博士、神崎ゆかり博士に感謝いたします。

実験の指導と細胞材料の提供をしていただきました東京大学医科学研究所幹細胞治療研究センター 中内啓光教授、紙谷聡英助教(現 東海大学創造科学技術研究機構准教授)、正木英樹博士、小林俊寛博士(現 ケンブリッジ大学ガードン研究所)、実験の指導をしていただきました京都大学再生医科学研究所 末盛博文准教授に感謝いたします。

データ解析におきましては、株式会社ダイナコム若栗浩幸博士、富所布沙乃様、堀内映実様、関森悦子様、株式会社 RNAi 張捷様、菊池泰司様に感謝いたします。

実験でお世話になりました今村聖実様、阿部佳澄様、登坂真紀子様、石川由似様、昆布恵美様に感謝いたします。

博士課程の在学期間中、リサーチアシスタントとして採用していただきました組織的な大学院教育改革推進プログラム「メディカルゲノムサイエンス・プログラム」とグローバル COE プログラム「ゲノム情報ビックバンから読み解く生命圏」に感謝いたします。

本研究を行うにあたりお世話になりましたゲノム制御医科学分野の皆様感謝いたします。

最後に、私生活で支えてくれました妻貴子と 4 人の両親に感謝いたします。