

論文の内容の要旨

論文題目 多能性幹細胞におけるREST 複合体結合部位の同定と解析

氏名 関 真秀

背景

多能性幹細胞の分化抑制や多能性維持には、様々な転写抑制複合体が重要な役割を担っている。Rest は神経以外で神経に関わる遺伝子の発現抑制を行う転写因子である。近年、がんや生殖細胞などで増殖やアポトーシスなどに対しても役割を担っていることが示されてきている。Rest の ES 細胞での役割については、Rest の発現の抑制により多能性に異常が起こるといった報告と、Rest の欠損は多能性に対して影響を示さないという報告がなされている。また、Rest が多能性の維持に対して役割を持つのではなく、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。

マウス ES 細胞は着床前の胚の初期エピブラストに対応する細胞であるのに対して、EpiS 細胞は着床後の後期エピブラストから樹立される。ES 細胞と EpiS 細胞は未分化維持に必要なシグナリングパスウェイやエピジェネティックな特徴が異なる。これらの特徴において、マウス EpiS 細胞はマウス ES 細胞と比べて、よりヒト ES 細胞に近い状態であることが分かっている。EpiS 細胞はキメラ形成への寄与能の低さから、ES 細胞より制限された多能性を持つと考えられている。着床前後に起こる多能性の変化への理解や再生医療の応用のために、ES 細胞と EpiS 細胞の違いについて研究することは重要である。しかし、これらの細胞間での Rest 複合体の結合パターンの比較はなされていなかった。

Rest による遺伝子発現抑制には相互作用している Sin3A 複合体や CoRest 複合体によるヒストン修飾が重要である。Sin3A 複合体にはヒストン脱アセチル化酵素 HDAC が含まれ、CoRest 複合体には HDAC とヒストン脱メチル化酵素 Lsd1 が含まれている。Sin3A や Lsd1 は NuRD 複合体にも含まれており、Rest 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いる。未分化維持や分化における遺伝子発現制御を明らかにするために、これら複雑な Rest 複合体とその補因子の相互作用の全体像を知る必要がある。

材料・方法

本研究は、クロマチン修飾を行う複合体の形成様式が制御や細胞状態にどのような影響を与えるのかを明らかにすることを目的とした。クロマチン免疫沈降法と超高速シーケンスを組み合わせた ChIP-Seq 法により、ES 細胞と EpiS 細胞において Rest 複合体の 3 つの構成因子 Rest、Sin3A、Lsd1 と RNA pol 2 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。また、ES 細胞での Rest ノックダウンによる発現変化を mRNA-Seq 法により解析した。さらに、ES 細胞と EpiS 細胞において TSS-Seq による遺伝子発現解析を行った。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を比較することで、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。

結果と考察

Rest 複合体結合様式による機能の違い

ChIP-Seq により、Rest は 7,055 か所、Sin3A は 8,816 か所、Lsd1 は 15,923 か所の結合部位が検出された。3 つの因子の結合配列に濃縮されている転写因子結合モチーフの検索を行った結果、既知の Rest 結合モチーフが検出された。Rest 複合体の構成要素の違いによる機能的な差異を明らかにするため、Rest 結合部位への Sin3A と Lsd1 の結合によりグループ分けを行った。Rest+Sin3A+Lsd1+(R+/S+/L+) の結合部位は 744 か所(392 遺伝子)、R+/S+/L+は 217 か所(98 遺伝子)、R+/S-/L+は 207 か所(72 遺伝子)、R+/S-/L-は 4,602 か所(710 遺伝子)であった。それぞれの遺伝子について Rest ノックダウンによる遺伝子発現の変化を調べたところ、R+/S+/L+の遺伝子群のみ有意な発現上昇が確認された。各様式の結合部位とヒストン修飾との比較を行ったところ、R+/S+/L+の結合部位のみで、抑制性のヒストン修飾である H3K27me3 が濃縮されていた。Rest 複合体が安定的に形成されている結合部位において、H3K27me3 の修飾が起これ、遺伝子発現抑制が行われていると考えられる。

Sin3A と Lsd1 の Rest 非依存的な結合と Rest 以外のリクルート因子について

Sin3A は Rest 非依存的に 6,498 か所(4,316 遺伝子)、Lsd1 は 13,456 か所(4,975 遺伝子)に結合していた。Rest 依存的な結合は主に神経に関わる遺伝子で検出されたのに対し、Rest 非依存的な結合は転写制御、細胞周期や分化に関わる遺伝子で有意に検出された。それぞれの結合遺伝子のうち 1 rpkm 以上の発現を示す遺伝子の割合を比べたところ、Rest 非依存的な結合は 90%程度と有意に高い割合で発現の検出された遺伝子に結合していた。Rest 依存と非依存の違いにより、それぞれの結合遺伝子の機能や発現量に違いがあることを示した。

Rest 非依存的な結合とヒストン修飾との関係を調べた。Rest 非依存的な Sin3A の結合部位には転写活性化マーカーが 80%以上検出され、Lsd1 には転写活性化マーカーが 30-40%、エンハンサーマーカーが 30%で検出された。Sin3A は転写活性化に、Lsd1 は転写活性化とエンハンサーに関わる機能を有している可能性を示した。Lsd1 とエンハンサーの関係については、未分化

ES 細胞においてエンハンサーに Lsd1 が結合しており、分化に伴うエンハンサーの迅速な抑制を行うという報告と一致する。

Sin3A と Lsd1 の結合部位を比較したところ、Rest 非依存的に 2000 か所以上で重複していた。Rest 以外に Sin3A と Lsd1 の両方をリクルートする因子の存在が考えられた。Tet1 は Sin3A とリクルートしていて 2/3 の Sin3A 結合部位で共結合が確認されていることから、Lsd1 も Tet1 によってリクルートされている可能性が考えられた。先行研究で行われた Tet1 の ChIP-Seq と比較したところ、Lsd1 は Rest 依存的、非依存的に関わらず 1/3 程度の結合部位で Tet1 との共結合が確認された。共免疫沈降から、Tet1 と Lsd1 及び Rest との相互作用が確認された。このことから、Tet1 が直接的もしくは Rest 複合体を介して間接的に相互作用することで Lsd1 をリクルートしている可能性を示した。

ES 細胞の多能性維持に関わる転写因子群が Oct4-centric module (OCM)、自己複製に関わる転写因子群が Myc-centric module (MCM) というクラスターをゲノム上で形成している。Sin3A の結合部位からはその両者に含まれる Klf4 や MCM に含まれる N-Myc のモチーフが、Lsd1 からは Klf4 の他、リプレッサー Ctfp と 4 つの OCM に含まれる転写因子のモチーフが検出された。Sin3A や Lsd1 の結合部位と先行研究で行われた ES 細胞での 15 種類の転写因子とヒストン修飾酵素複体のサブユニットの ChIP-Seq と比較したところ、モチーフ検索と同様に Sin3A は MCM の転写因子群と、Lsd1 は OCM と MCM の転写因子群と Ctfp と有意に共結合していることが示された。Sin3A が MCM に、Lsd1 が MCM、OCM や Ctfp によってリクルートされていることを示唆した。

ES 細胞と EpiS 細胞の Rest 複合体結合部位の比較

ES 細胞と EpiS 細胞のコーディング遺伝子周辺の Rest 結合部位を比較した結果、EpiS 細胞において、特異的に結合する Rest 結合部位は 59 か所 (82 遺伝子) であるのに対して、ES 細胞と共通のものが 685 か所 (951 遺伝子) と 10 倍以上存在していた。ES 細胞特異的な結合部位は 629 か所 (1, 121 遺伝子) と多く存在していた。ES 細胞特異的な結合部位と共通の結合部位の比較を行ったところ、共通の結合部位の方が ChIP-Seq で高いシグナル強度を示した。結合遺伝子についても比較したところ、共通の結合遺伝子では神経に関わる遺伝子が濃縮していたのに対して、ES 細胞特異的な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ることが示された。Rest 結合部位への Sin3A と Lsd1 の共結合のパターン比較から、Sin3A の共結合の割合が ES 細胞に比べて EpiS 細胞で半数程度であり、大きく異なることを示した。また、ヒストン修飾については、Rest 結合部位周辺の H3ac を含む活性性のヒストン修飾のシグナルが ES 細胞よりも EpiS 細胞において高い値を示しており、Sin3A の結合性の違いの影響が考えられた。ES 細胞と EpiS 細胞の TSS-Seq により Rest の結合遺伝子の発現変化を調べたが、ES 細胞特異的な結合遺伝子であっても両者にそれほど大きな変化は見られなかった。結合遺伝子のうち、ES 細胞での Rest ノックダウンにより 2 倍以上発

現が上昇したものを Rest のターゲット遺伝子とした。共通のターゲットとして 143 遺伝子と ES 細胞特異的なターゲット遺伝子として 60 遺伝子を同定した。ES 細胞特異的な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。

ノンコーディング遺伝子周辺の Rest 結合部位についても同様の解析を行い、コーディング遺伝子の結合部位と同様の特徴を有していることを示した。さらに、コーディングとノンコーディング遺伝子の Rest 結合部位の配列の進化的保存性についても比較したところ、ノンコーディング遺伝子への結合部位の方が進化的な保存性に乏しい傾向が見られた。ノンコーディング遺伝子の配列多様性が生じやすいことは知られていたが、その制御領域についても進化的な多様性が生まれやすい可能性を示唆した。

結語

本研究では、Rest 複合体の形成の仕方によって、抑制機能の有無が左右されることを示した。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の相互作用することを示唆した。以上のことから、複合体形成の様式の違いによって、異なる機能を果たすことを示した。また、ES 細胞と EpiS 細胞の比較から、それぞれの細胞状態において、Rest 複合体は異なった制御を行っていることを示した。