

研究題目 マウス ES 細胞における転写因子 Dux の発現制御機構の解明

研究組織

研究代表者：前田 亮（大阪大学大学院生命機能研究科）

共同研究者：片桐豊雅（徳島大学先端酵素学研究所）

研究分担者：立花 誠（大阪大学大学院生命機能研究科）

【1】研究の概要

[1-1]本研究の目的・概要

本研究は、マウス胚性幹細胞（ES 細胞）における転写因子 Dux の発現制御メカニズムの解明を目的とした。ES 細胞は、無限の自己複製能と多分化能を併せ持つユニークな細胞であり、再生医療への応用が期待されている。しかし、ES 細胞の性質維持の分子メカニズムは未だ不明な点が多い。近年、ES 細胞の一部の細胞集団が、受精直後の 2 細胞期胚に類似した性質を示す二細胞期様細胞へと自発的に形質転換することが明らかとなり注目を集めている。最近の研究から、この形質転換に転写因子 Dux が重要な役割を果たすことが示唆されたが、ES 細胞における Dux の発現制御メカニズムは不明なままであった。本研究では、ヒストン H3 の 9 番目のリジン残基のメチル化酵素（H3K9MT）に着目し、H3K9MT による Dux の発現抑制が ES 細胞の性質維持に重要であるという仮説を立てた。H3K9MT は、ヘテロクロマチン形成を介して遺伝子の発現を抑制することが知られており、ES 細胞の性質維持に重要なエピジェネティック制御因子である。本研究では、H3K9MT 欠損 ES 細胞を用いた網羅的な解析により、H3K9MT が Dux の発現を直接的に抑制し、ES 細胞の性質維持に寄与することを明らかにした。

[1-2]研究の方法・経過

本研究では、H3K9MT である Setdb1、G9a、Suv39h1、Suv39h2 の遺伝子をゲノム編集技術 CRISPR/Cas9 により欠損させた ES 細胞を作製した。これらの H3K9MT 欠損 ES 細胞を用いて、RNA-seq による網羅的な遺伝子発現解析と ChIP-seq によるヒストン修飾の解析を行った。RNA-seq 解析の結果、H3K9MT を全て欠損させ

た細胞では、Dux の発現が顕著に上昇することが明らかとなった（下図）。また、免疫染色の結果から、H3K9MT の全欠損により、二細胞期様細胞マーカー遺伝子である Zscan4 を発現する細胞の割合が大幅に増加することが明らかとなった。一方、ChIP-seq 解析から、野生型 ES 細胞では Dux 遺伝子座に H3K9 メチル化が集積しているのに対し、H3K9MT 欠損 ES 細胞ではそのシグナルが消失していることが明らかとなった。以上の結果から、H3K9MT は Dux 遺伝子座へ H3K9 メチル化を付加することで Dux の発現を抑制し、これにより ES 細胞の性質が維持されていることが示された。本研究は、ES 細胞の未分化性維持における Dux の重要性とそのエピジェネティック制御機構を明らかにしたものである。

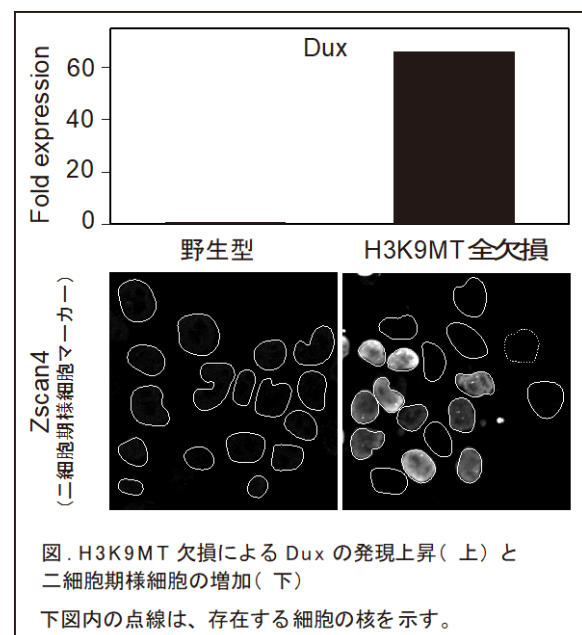


図. H3K9MT 欠損による Dux の発現上昇（上）と二細胞期様細胞の増加（下）
下図内の点線は、存在する細胞の核を示す。

【2】研究成果

[2-1]本共同研究で明らかになった研究成果

本共同研究により、次世代シーケンサー解析をおこなったことで、H3K9MT が Dux の発現抑制を介して ES 細胞の性質維持に重要な役割を果たすことが明らかとなった。野生型 ES 細胞では、H3K9MT によって Dux 遺伝子座に H3K9 メチル化が施され、Dux の発現が抑制されている。一方、H3K9MT を欠損させると Dux 遺伝子座の H3K9 メチル化レベルが低下し、Dux の発現が活性化される。その結果、Dux の標的遺伝子群の発現が上昇し、ES 細胞から二細胞期様細胞への形質転換が促進される。このことから、H3K9MT によるエピジェネティックな制御が Dux の適切な発現抑制と、それを介した ES 細胞の性質維持に重要であることが示された。Dux 単独の発現で ES 細胞の性質が大きく変化することから、本研究で得られた知見は、ES 細胞の未分化性維持の基本原則の理解に大きく貢献するものである。

[2-2]本共同研究による波及効果及び今後の発展性

多能性幹細胞の性質維持の分子メカニズムの理解は、再生医療の実現に向けた基盤研究として重要な意義を持つ。本研究で得られた、H3K9MT と Dux を介した ES 細胞の性質維持機構に関する新たな知見は、ES 細胞の未分化性維持技術の改良や、ES 細胞からの高効率な細胞分化誘導法の開発につながることを期待される。特に本研究で確立した Dux 発現誘導系は、ES 細胞の分化運命の人為的な制御に有用なツールとなるだろう。また、本研究の成果は ES 細胞の生物学的理解の深化にも大きく貢献する。二細胞期様細胞は ES 細胞に内在する特異な細胞集団として近年注目を集めているが、その正体は謎に包まれていた。本研究は、二細胞期様細胞の本態解明に向けた大きな一歩となった。二細胞期様細胞は、初期胚の性質を色濃く反映していると考えられ、その研究は初期発生の基本原則の理解にもつながるものと期待される。今後は、ヒト ES/iPS 細胞を用いた研究への展開が期待される。ヒト ES/iPS 細胞でもマウス ES 細胞と同様の Dux 制御機構が存在するのか、ヒト ES/iPS 細胞に内在する多様性と Dux の関係はどうか、ヒト多能性幹細胞への知見の展開は再生医療応用に向けた重要な課題である。本研究を基盤としたさらなる研究の発展が期待される。

【3】主な発表論文等

[3-1]論文発表

なし

[3-2]学会発表

前田 亮、H3K9 methyltransferases repress the expression of 2-cell-stage-specific genes in mESCs、第 46 回日本分子生物学会年会、神戸、2023 年 12 月 7 日

[3-3]成果資料等

なし

【4】今後の課題等

今後の課題、その他等

本研究により、H3K9MT が Dux の発現抑制を介して ES 細胞の性質維持に寄与することが明らかとなった。しかし、H3K9MT による Dux 抑制の詳細な分子機構については不明な点が残されている。H3K9MT によって形成されるヘテロクロマチン構造がどのように Dux プロモーター領域の活性を抑えているのか、クロマチンの高次構造レベルでの理解が必要である。クロマチン免疫沈降法や染色体コンフォメーション捕捉法などを駆使し、Dux 遺伝子座の立体的な制御機構の解明を進めていきたい。また本研究では、Dux 発現誘導系を利用することで、Dux による ES 細胞運命制御の分子基盤解明に向けた強力な実験系を確立した。Dux によって活性化される標的遺伝子群の機能解析を進めることで、Dux-二細胞期様細胞の本質的な性質が明らかになると期待される。次世代シーケンサーを用いたエピゲノム・トランスクリプトーム解析や、Dux 下流因子の機能スクリーニングなどにより、Dux-二細胞期様細胞の分子基盤の全容解明を目指したい。さらに、ヒト ES/iPS 細胞研究への展開を図ることが重要な課題である。ゲノム編集技術を駆使し、ヒト ES/iPS 細胞における DUX の発現制御機構の解明を進める。マウスとヒトで保存性の高い制御機構が存在するのか、ヒト固有の制御機構があるのかを見極めることで、ヒト ES/iPS 細胞の基本原則の理解へとつなげていきたい。また、ヒト ES/iPS 細胞の多様性と DUX の関係性を探ることで、ヒト ES/iPS 細胞のより精緻な品質管理や分化誘導法の開発の発展が期待できる。本研究を足掛かりとして、ES 細胞の基本原則の理解と再生医療応用の実現に向けて、研究をさらに発展させていきたい。