

「ヒストンアセチル化による転写抑制を介した細胞運命維持機構の解明」

関西学院大学 理工学部 生命科学科 柴田 幸政

1 研究の背景と目的

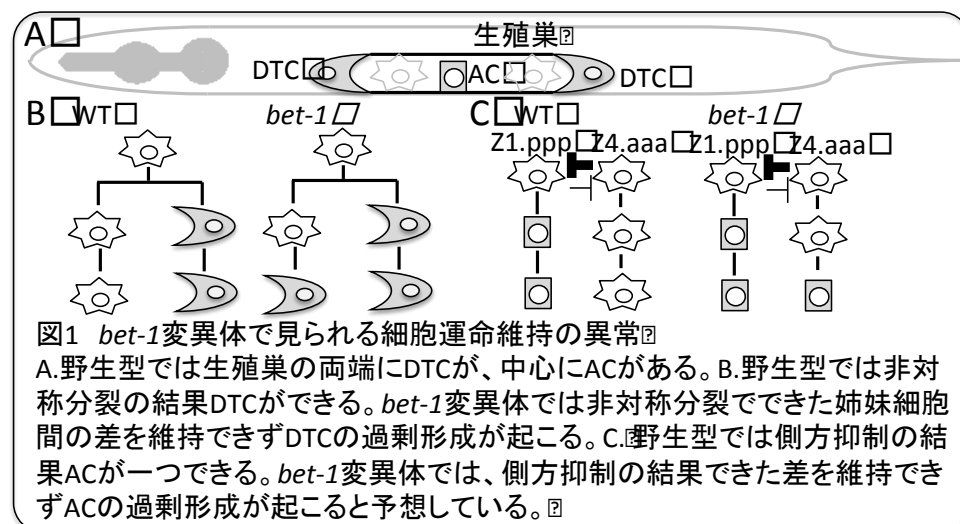
本研究では細胞運命の維持に必要な分子機構の解明を目指している。細胞運命の維持は発生及び生物の恒常性に不可欠であり、細胞が受け取った分化シグナルの履歴を記憶しておく事で、受精卵から分化した多様な細胞の差を維持する事ができる。各種の細胞はその種類毎に特異的な遺伝子を発現すると共に、不要な遺伝子はサイレンシングされている。細胞運命の維持を行うためにはこの遺伝子サイレンシングが重要になる。遺伝子サイレンシングには DNA のメチル化と、ヒストン H3K27 のメチル化が関与する事が知られている。しかし、興味深い事に線虫 *C. elegans* ではこのいずれも体細胞の細胞運命の維持に関与していない。つまり、DNA のメチル化やヒストン H3K27 のメチル化によらない遺伝子抑制機構が、細胞運命の維持に寄与していると考えられる。

実際私はこれまでに *C. elegans* アセチル化ヒストン H4 結合蛋白質 BET-1 が細胞運命の維持に関与する事を示している(Shibata, et al. ,2010, Development. v.137,p.1045)。さらに、BET-1 がヒストン H2A のバリエント H2A.z/HTZ-1 を介して転写抑制を行っている事も明らかにしている(Shibata, et al. ,2014, Development. v.141,p.209)。この BET-1 及び HTZ-1 を介した細胞運命維持機構は、中胚葉や外胚葉の多くの細胞種で細胞運命を維持している事がわかっており(Shibata, et al. ,2010, Development. v.137,p.1045)、細胞運命の維持に関わる基本的な仕組みの一つであると考えられる。

この様な、DNA のメチル化やヒストン H3K27 のメチル化によらない細胞運命維持機構は *C. elegans* 特異的なものではないと考えられる。ショウジョウバエの H3K27 メチル化酵素 E(z)の変異体でも体節内の細胞の配列に一定のパターンが見られる。ショウジョウバエには DNA のメチル化がほとんどない事から、DNA のメチル化及びヒストン H3K27 のメチル化に依らない細胞運命維持機構がここでも働いている事がわかる。

これまでの私の研究から、DNA のメチル化及びヒストン H3K27 のメチル化に依らない細胞運命維持機構には、BET ファミリー蛋白質及び H2A.z によるものがある事が明らかとなっているが、その全体像は未だ大部分が未知のままである。そこで、*C. elegans* を用いることで、あらたな細胞運命維持機構を明らかにでき、また新たな運命維持機構及び遺伝子サイレンシング機構を見つける事ができる可能性が高い。

これまでに、*bet-1* が細胞運命の維持に必要とされる新たな細胞種として、側方抑制



によって誘導されるAnchor cellという細胞を新たにみつけているので、この細胞系譜

における *bet-1* pathway の働きを調べると共に、細胞運命の維持に必要な新規な因子としてクロマチンリモデリング複合体 CeBAF の構成因子 SWSN-6 及び HAM-3 を単離したので、これらの機能解析及び BET-1 との関係を明らかにする事が本研究の目的である。

2 研究方法・研究内容

本研究では、①Anchor cell の抑制における BET-1 及び関連因子の役割の解明、②運命維持における、クロマチンリモデリング複合体 CeBAF の構成因子 SWSN-6 及び HAM-3 の役割と、*swsn-6* 及び *ham-3* と *bet-1* 関連遺伝子の遺伝的相互作用の解明、③細胞運命の維持に必要な新規遺伝子のスクリーニング、を行った。

①Anchor cell の抑制における BET-1 及び関連因子の役割の解明

AC は LIN-12/Notch シグナルを介した側方抑制により、二つの相同細胞、Z1.ppp、Z4.aaa のうちの一つから作られる。*bet-1* 変異体では AC の過剰形成が起こるが、この事は、側方抑制で生じた相同細胞間の差異も BET-1 が維持するという事を示唆する(図 1 C)のでこれを確認する。

姉妹細胞間の差の維持では(図 1 B)BET-1 は分裂直後から働き細胞自立的に必要なとされる。AC の系でも BET-1 が細胞自立的に働く事を確認し、必要な時期を明らかにする。

②運命維持における、クロマチンリモデリング複合体 CeBAF の構成因子 SWSN-6 及び HAM-3 の役割と、*swsn-6* 及び *ham-3* と *bet-1* 関連遺伝子の遺伝的相互作用の解明

本研究では AC の系でも *ham-3* 遺伝子と *swsn-6* 遺伝子が細胞運命の維持に関与する事を示す。また、*bet-1* 関連遺伝子や CeBAF 複合体関連遺伝子と、*ham-3* 遺伝子、*swsn-6* 遺伝子との遺伝的相互作用を調べた。

③細胞運命の維持に必要な新規遺伝子のスクリーニング

BET-1 はアセチル化ヒストン H4 に結合する事で、H2A.z をゲノム上にリクルートし、H2A.z が標的遺伝子の転写抑制の維持を行うと考えられる。しかし、H2A.z による転写抑制維持がどの様に行われるかはわかってない。また、ヒストン H4 のアセチル化は MYST ファミリーヒストンアセチル化酵素 MYS-1, MYS-2 によって行われると考えられる。MYS-1, MYS-2 のリクルートは細胞種毎に特定の DNA 結合因子が関わると考えられるが、この細胞種特異的な DNA 結合因子と多くの細胞種で働く比較的普遍的な因子である MYS-1, MYS-2 を繋ぐ仕組みはわかっていない。そこで、これらの因子を検索する目的で、*bet-1* 変異体と同様の異常を示す変異体のスクリーニングを行った。

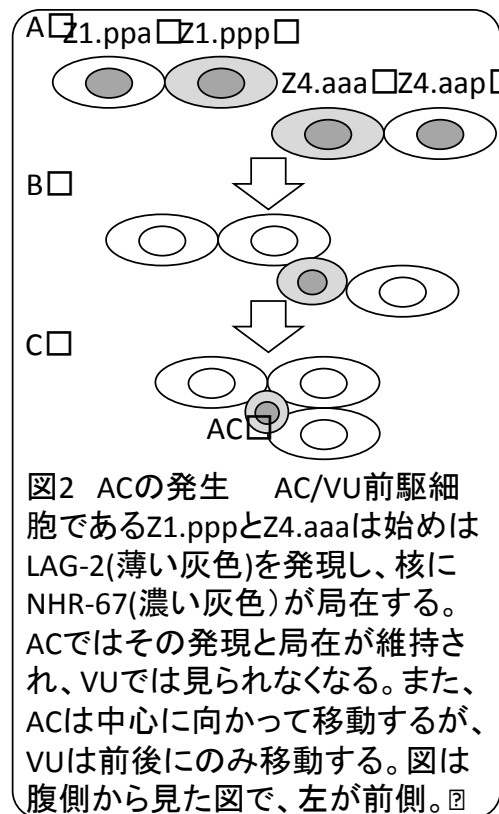
3 研究成果

①Anchor cell の抑制における BET-1 及び関連因子の役割の解明

野生型では、AC/VU 前駆細胞 Z1.ppp, Z4.aaa のうち AC になる細胞は、腹側の正中線へと移動すると共に、形態変化がおこり小さくなる。これに対し、もう一方の細胞(VU 細胞)は正中線の脇を移動する(図 3)。*bet-1* 変異体では複数の AC ができるが、その由来が Z1.ppp, Z4.aaa またはそれらの姉妹細胞である可能性を考えレスキュー実験を行った。なお、*bet-1* が細胞自立的に働く事は既に確認している。Z1.ppp, Z4.aaa またはそれらの姉妹細胞で発現する *nhr-67* 遺伝子のプロモーターで、*bet-1* 遺伝子を発現させたところ、*bet-1* 変異体で見られる AC の過剰形成の表現型がレスキューされた。この事は、過剰形成される AC が、本来 AC になるポテンシャルを持っている Z1.ppp, Z4.aaa かその姉妹細胞から作られている事がわかる。

更に、AC の過剰形成の抑制のために *bet-1* がいつ必要かを調べた、そうしたところ、孵化後 19 時間までに *bet-1* 遺伝子を発現する事が必要である事がわかった。AC/VU 前駆細胞 Z1.ppp, Z4.aaa は孵化後、16 時間までにつくられ、その後、側方抑制によってどちらか一方が AC となる事が知られている。おそらく *bet-1* 遺伝子は側方抑制の初期には必要なく、どちらの細胞が AC になるか決まった後に働いているのではないかと推測される。

最後に、AC の誘導に必要な転写因子 *hlh-2* が BET-1 によって抑制されている可能性を検討した。*bet-1* 変異体の生殖巣で *hlh-2::gfp* の発現を観察したところ、野生型に比べて *hlh-2::gfp* 陽性細胞の過剰形成を示す個体が 5 割程上昇していた。現在のところ、*hlh-2* 遺伝子が BET-1 の直接の標的遺伝子であるという証拠は得られていないが、特定の細胞種を誘導する転写因子の多くが BET-1 によって抑制されている事を考えると、*hlh-2* が BET-1 によって直接抑制されている可能性は十分考えられる。



②運命維持における、クロマチンリモデリング複合体 CeBAF の構成因子 *SWSN-6* 及び *HAM-3* の役割と、*swsn-6* 及び *ham-3* と *bet-1* 関連遺伝子の遺伝的相互作用の解明

bet-1 経路で働くヒストンアセチル化酵素をコードする遺伝子に *mys-1* 遺伝子がある。これまでに、*mys-1* バックグラウンドで DTC の過剰形成を引き起こす遺伝子として、CeBAF の構成因子をコードする *ham-3* を単離している。また、CeBAF の構成因子をコードする遺伝子 *swsn-6* の変異体が遺伝研の澤教授の研究室で単離されており DTC の過剰形成を行う事がわかっていたので、これらの解析を行った。*swsn-6* 変異体では *bet-1* の標的遺伝子として考えられる *ceh-22* 遺伝子の異所発現が見られた。*swsn-6* 変異体で見られる DTC の過剰形成はこれにより説明する事ができる。

また、*swsn-6* 及び *ham-3* のいずれもが AC の過剰形成にも関与する事を見つけている。この様に、*swsn-6* 及び *ham-3* は *bet-1* で異常が見られる複数の細胞系譜で細胞運命の維持に必要とされると考えられる。

興味深い事に、*ham-3* は単独では AC の過剰形成を引き起こさないが、基本転写調節因子で合える TFIID の構成因子 ZK1128.4 を同時に抑制することで、AC の過剰形成が引き起こされる事がわかった。この事は、TFIID も細胞運命の維持に関与する事を唆している。

さらに *bet-1*, *swsn-6*, *ham-3*, *zk1128.4* の遺伝学的な相互作用を調べた。その結果、これらの遺伝子のうち二つを同時に抑制すると、いずれも単独の抑制に比べてより重篤な異常が見られる事がわかった。この事から、これらの遺伝子はいずれも異なる遺伝学的経路で働いていると考えられる。

③細胞運命の維持に必要な新規遺伝子のスクリーニング

細胞運命の維持に必要とされる新規な遺伝子を単離同定するために、*bet-1* 変異体と同様に、生殖巣の形態形成に関わる distal tip cell (DTC)の過剰形成が起こる変異体のスクリーニングを行った。その結果 9 株の変異体を得る事ができた。この変異体のマッピングを進めた結果、2 株は *bet-1* 変異体、1 株は *unc-39* 変異体である事がわかった。また、残りの 6 株は 4 つの遺伝子に対応する事も明らかにした。

現在、更にこれらの変異体の表現型の解析を進めている。*bet-1* 変異体では DTC の過剰形成以外に、体側のドーパミン作動性神経細胞 PDE と機械刺激受容神経 AVM の過剰形成も起こる事がわかっている(Shibata, et al., 2010, Development. v.137,p.1045)。新規に単離した変異体で、これらの異常について調べたところ、少なくとも二株、2 遺伝子に関しては、PDE 及び AVM の過剰形成が見られた。これらの変異体の原因遺伝子が、*bet-1* 遺伝子と同じ遺伝的経路で働いている可能性は十分考えられるので、今後はこれらの原因遺伝子のクローニングを行っていく。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究はこれまで知られていなかった、ヒストンアセチル化及びクロマチンリモデリング因子を介した未知の細胞運命維持機構を同定し、その両者の関係を明らかにしている。細胞運命維持機構について知る事は、再生医療に大きな意味がある。特に、本研究で明らかにした分子群は分化した細胞で細胞運命の維持を行う分子機構である。これらの分子群の働きを抑制する事で、iPS 細胞の作製や、trans-differentiation の誘導を効率化できる可能性がある。

本研究で解析を行った BET-1 を含む BET ファミリー蛋白質群は癌に関与しており、運命維持機構の機能不全が疑われる。近年 BET ファミリー蛋白質の阻害剤が見いだされ(Belkina, A. C., et al, 2012, Nat. Rev. Cancer, v.12, p.465)、治療薬として期待されているが、BET ファミリー蛋白質は多くの種類の細胞で発現しており、機能阻害による影響は多岐にわたると予想できる。これに対し、本研究をとおして明らかになった BET/H2A.z をとおした分子機構についての知識は、阻害剤の作用機序の理解や、改良に繋がると期待できる。

また、BET ファミリー蛋白質や H2A.z の細胞運命の維持における役割に着目した論文は、私が神戸 CDB 及び関西学院で研究を行い発表した論文(Shibata, et al., 2010, Development. v.137,p.1045, Shibata, et al., 2014, Development. v.141,p.209)が最初である。哺乳類では、ES 細胞の未分化性の維持に H2A.z が必要である事が明らかにされる(Hu. et al, 2013, Cell Stem Cell, v.12, p.180)と共に、最近、ES 細胞からの正常な分化において H2A.z と共に BET ファミリー蛋白質 Brd2 が必要である事が報告されている(Surface. et al, 2016, Cell Reports, v.14, p.1142)。しかし、細胞運命の維持一般に H2A.z と BET ファミリー蛋白質が必要とされるかどうかはわかってない。今後、H2A.z と BET ファミリー蛋白質が他の生き物でも細胞運命の維持に必要なかどうかを明らかにする際に、本研究で得られた知見が役に立つと思われる。