

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

Myc-Nanog 複合体による Max 欠損 ES 細胞の多能性維持とアポトーシス抑制

研究代表者 平崎 正孝 (ゲノム医学研究センター)

諸言

ES (Embryonic Stem, 胚性幹) 細胞は、着床前の胚盤胞の内部細胞塊から樹立された細胞株であり、体を構成する全ての種類の細胞へと変換できる分化多能性と無限の自己増殖性という2つの特筆すべき性質を持った細胞株である。我々は、ES細胞が持つ特筆すべき性質がいかなる分子メカニズムで規定されているかの研究を、特に Myc タンパク質の機能解析を中心に行ってきた。Myc タンパク質は、アミノ酸配列が極めて似通った3つのタンパク質 (c-Myc, N-Myc と L-Myc) によりファミリーを形成している。これら全 Myc タンパク質は、少なくとも RNA polymerase II 依存的な転写促進において、パートナー因子である Max との相互作用が必要である。Myc タンパク質が、ES細胞の未分化性維持において重要な役割をしていることを初めて示したのは、米国の Dalton S. らであるが¹⁾、同グループは、2010年には c-Myc と N-Myc の二重欠損マウス ES細胞を樹立し、その ES細胞は、胚体外内胚葉へと分化すると報告した²⁾。一方我々は、2011年に Myc のパートナー因子である Max の遺伝子発現が、Doxycycline の培地への添加の有無で 100% コントロールできる Max ホモ欠損 ES細胞を樹立し、この ES細胞を用いて、ES細胞における Myc の役割を検討した。その結果、ES細胞における Max の遺伝子発現の消失は、外胚葉への選択的な分化とアポトーシスを引き起こすことを報告した³⁾。

Orkin S. らのグループは、各種転写因子に対する ChIP-sequence と網羅的な遺伝子発現解析から、Core, PRC, Myc モジュールと呼ばれる3つの転写サブネットワークの絶妙なバランスが、マウス ES細胞の特性を維持する上で中心的な働きをしていることが提唱された⁴⁾。Core モジュールは、Oct3/4, Sox2, Nanog など、ES細胞の多能性維持において極めて重要な役割を果たしていることが証明されている転写因子によりサポートされる転写サブネットワークである。一方、Myc モジュールはその名の通り Myc を中心とした遺伝子やタンパク質のネットワークで、このモジュールも、Core モジュールと同様に ES細胞の多能性を維持するための転写ネットワーク

として機能するが、Core モジュールとは独立して機能するとされている。これらの研究結果から、Myc-Max 転写複合体は、ES細胞状態の維持に極めて重要な役割を果たしているという概念が定着した。

我々は、同論文で、Max 欠損 ES細胞が呈する外胚葉への分化とアポトーシスは、Nanog の強制発現によってレスキューされ、Nanog 強制発現 Max 欠損 ES細胞は持続的に継代できる事を報告している³⁾。但し、強制発現 Nanog がどのような機構で Max 欠損 ES細胞の ES細胞状態を維持しているかに関しては現在も全く解明されていない。

そこで、私は、Nanog がどのような分子メカニズムで、Max 欠損 ES細胞が示す外胚葉への分化とアポトーシスという表現型を抑圧し、ES状態の維持に寄与しているかを明らかにすることを目的に研究を行ってきた。その結果、① LC-MS/MS 解析によって Nanog が、c-Myc 及び N-Myc と結合することを見出した。なお、この結果は、ES細胞の核抽出液を用いた共免疫沈降でも確認することができた。② Nanog は、c-Myc の N 末端に結合している事を見出した。なお、Max は、c-Myc の C 末端に結合する為、Nanog と c-Myc との相互作用に対して Max は競合しない事が示唆された。③ Max 欠損 ES細胞において発現レベルが低下している Myc モジュール遺伝子群が、Nanog の強制発現により、通常の ES細胞でのレベルまで回復することを見出した。

この様な更なる研究によって得た研究成果、特に Myc と Nanog が複合体を形成するという発見を土台に、Nanog 強制発現による Max 欠損 ES細胞のレスキュー機構の分子メカニズムの全容の解明を目指した。

結果・考察

1, Max 欠損 ES細胞における c-Myc の染色体への結合

c-Myc-Max 転写複合体は、標的遺伝子のプロモーター中の特異的配列 (E-box: CACGTG) に結合し、主に転写の促進を司る。しかし、c-Myc タンパクは、全ての機能発揮において Max を必要とする訳ではなく、tRNA 遺伝子の発現など、RNA polymerase III 依存的な転写では、Max 非依存的に作用することが知られている。また、c-Myc は Max タンパク質とは無関係に、Miz-1 (Myc-interacting

zinc-finger protein-1) との相互作用を介して, p21 や p15 の cdk inhibitor をコードする遺伝子の転写を抑制することで細胞の増殖を促進することも知られている。

これまでに多くの研究室において, マウス ES 細胞における c-Myc の標的遺伝子を調べる為に, ゲノムワイドなクロマチン免疫沈降解析 (ChIP-on-Chip, ChIP-Seq) が行われてきたが, Max 欠損型 ES 細胞における c-Myc のプロモーターへの結合を調べた例は今まで存在しない。そこで, 私は Max の欠損によって ES 細胞の自己増殖性および分化多能性の維持が損なわれる理由を探ることを目的に, Max 欠損 ES 細胞における c-Myc に対する Chip-seq を行う事を計画した。Dox を添加していない, Max を発現している状態の ES 細胞の c-Myc での chip-seq のデータと比較する事で, Max に完全に依存している c-Myc のゲノムでの結合部位を明確にすることが出来ると考えた。

そこでまず, c-Myc の chip の条件検討を行った。抗体は, Kim et al. らの論文で使用されていた, Santa Cruz 社の sc-764 を選択した。細胞の調整から染色体の切断までは, Covaris 社の truChIP Chromatin Shearing Reagent Kit を用い, Chip 部分は, ニッポンジーン社の OneDay Chip Kit を使用した。結果は, ネガティブコントロールである IgG のサンプルと比較して, 約 2 倍程度はであったが, c-Myc の Chip サンプルを調整した。

次に, このサンプルを用い, illumina 社の TruSeq ChIP Sample Preparation で Chip-Seq 用のサンプルを調整した。調整した Chip-Seq 用サンプルを illumina 社の HiSeq 2500 で Chip-Seq を行った。その結果, Max 存在下 (Dox-) で過去に報告されていた箇所にピークは見られず, テロメアなどのリピート配列が大量にデータとして抽出された。この事は, Chip 部分で使用した, ニッポンジーン社の OneDay Chip Kit が, アガロースビーズを用いている為, 不特定の染色体断片 (特にリピート配列であるテロメア部位) を濃縮させてしまった可能性が考えられた。

2, Max 欠失による ES 細胞の Bivalent クロマチン構造におけるヒストン修飾の変化

Bivalent クロマチン構造は, 転写に対して正に相関するヒストン修飾 (H3K4me3) と負に相関するヒストン修飾 (H3K27me3) が共存する特殊なクロマチン構造で, このクロマチン構造をプロモーターに持つ遺伝子からの発現は極めて低いレベルに抑えられている。但し, H3K27me3 により, 単に発現が抑制されている遺伝子とは異なり, 細胞内外からの発現促進のシグナルがインプットされると, 予め H3K4me3 の修飾を持つという理由から, そのシグナルに速やかに応答することができる。それ故, このクロマチン構造は, ES 細胞において, Pdx-1 遺伝子のような細胞の分化の方向性を決定するような遺伝子のプロモーター上によく見られる構造である。Eisenman RN. らのグループは, ES 細胞で chip-on-chip 解析を行ったところ, c-Myc は外胚葉分化マーカー (Fgf5 等) のプロモーター

にかなり選択的に結合すると報告した⁵⁾。かつ, c-Myc を強制発現させると Fgf5 遺伝子等の分化マーカーの発現が増加し, 逆に c-Myc を破壊すると遺伝子発現は減少することも示している。さらには, これら c-Myc 強制発現による外胚葉マーカー遺伝子の発現上昇は, c-Myc を介した Bivalent クロマチン構造における H3K4me3 のヒストン修飾の維持と H3K27me3 の減少によるものであると結論している。我々は, Max 欠損 ES 細胞において, 外胚葉系のマーカー遺伝子の発現が, 分化マーカー遺伝子の中で選択的に上昇することを見出しているが, Eisenman 等の報告と併せて考えると, ES 細胞において発現が押さえ込まれている外胚葉系マーカー遺伝子の発現を, Max とは相互作用していない遊離 c-Myc が活性化させる可能性が考えられた。外胚葉マーカー遺伝子の発現上昇は, c-Myc の機能による Bivalent クロマチン構造で見られるヒストン修飾の変化を介したものであると仮定し, Max 欠損 ES 細胞に対して, H3K4me3 及び H3K27me3 に対する ChIP-seq 解析を行う計画を立てた。

H3K4me3 の抗体は, abcam 社の ab8580 を, また H3K27me3 は, Millipore 社の ChIPAb+ を用いた。その他の工程は, 上記の c-Myc と同様である。Chip-Seq の結果は, H3K4me3, または H3K27me3 も c-Myc と同様にテロメアなどのリピート配列が大量にデータとして抽出された。c-Myc の場合は Chip の時点で IgG と比較して 2 倍強と chip の効率が悪いと言う懸念はあったが, H3K4me3, または H3K27me3 は, 10 倍以上と十分な濃縮が行われていたにも関わらず, 同様な傾向が見られた。

以上の結果より, 今後アガロースビーズではなく不特定の染色体の結合が少ないと考えられている磁気ビーズで chip を検討する。また, c-Myc の chip の効率が良くないので, Flag-tag などの融合タンパク質での chip も検討する事にする。

謝 辞

本研究を行うにあたり, 同部門の鈴木歩助教・上田篤ポストドクター・奥田晶彦教授からの多大なご協力に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Cartwright P, McLean C, Sheppard A, Rivett D, Jones K, Dalton S. LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism. *Development* 2005; 132: 885-96.
- 2) Smith KN, Singh AM, Dalton S. Myc represses primitive endoderm differentiation in pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 2010; 7: 343-54.
- 3) Hishida T, Nozaki Y, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Ema M, Takahashi S, Nishimoto M, Okuda A. Indefinite self-renewal of ESCs through Myc/Max transcriptional complex-independent mechanisms. *Cell Stem Cell* 2011;

9: 37-49.

- 4) Kim J, Woo AJ, Chu J, Snow JW, Fujiwara Y, Kim CG, Cantor AB, Orkin SH. A Myc network accounts for similarities between embryonic stem and cancer cell transcription programs. *Cell* 2010; 143: 313-24.
- 5) Lin CH, Lin C, Tanaka H, Fero ML, Eisenman RN.

Gene regulation and epigenetic remodeling in murine embryonic stem cells by c-Myc. *PLoS One* 2009: e7839.

研究成果リスト

本研究における研究成果の学会・出版物への発表はまだなされていない。