

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15260

研究課題名(和文) Non-coding RNA Y1のiPSリプログラミングにおける役割の解明

研究課題名(英文) Analysis of Non-coding RNA Y1 during iPS reprogramming

研究代表者

五條 理志 (Gojo, Satoshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90316745

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：Non coding RNA RNY1 (Y1)はiPS細胞誘導時に一過性に発現する因子で、ノックダウンすることでiPS細胞への誘導効率が減少する。そこでY1と相互作用するR060タンパク質を中心に、その分子メカニズムを検討しDDX6というRNA代謝に関わる因子が同定した。DDX6をノックアウトした細胞でもiPS誘導は激減した。我々は、RNY1/R060/DDX6 axisはiPS化に必須な間葉上皮移行に関わっていることを見出し、その分子モデルを一連のmiRNAsとの関連の中で作出した。

研究成果の概要(英文)：Non coding RNA RNY1 (Y1) is a transiently expressed factor during early iPS reprogramming, and induction efficiency to iPS cells is decreased by its knockdown. We analyzed the molecular machinery related to RNY1 and R060, which form a complex, during cellular reprogramming. DDX6 protein, which involves in RNA metabolism was identified, and the knockout cell for DDX6 also showed a drastic decrease in induction efficiency. We found that the RNY1/R060/DDX6 axis attributes to mesenchymal epithelial transition, which is essential for initial phase in iPS reprogramming. and proposed a putative molecular model for parental mRNA decay in the nexus of a set of miRNAs.

研究分野：再生医学

キーワード：Reprogramming Non-coding RNA iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

RNY1 (Y1) は 113 塩基の短い RNA 分子として細胞内に常時発現しており、その発現量は iPS 細胞や癌細胞、自己免疫不全患者にて発現が上昇することが知られている (Lerner MR., Science. 1981)。また、Y1 の配列は脊椎動物から線虫、バクテリアと様々な生物種において高度に保存されており、Y1 と相互作用するタンパク質 Ro60 も相溶性が高いことが報告されている (Teunissen SW., Nucleic Acids Res. 2000)。これらのことから、Y1 は何らかの機能を有していることが予想されるが、具体的な機能は不明なままである。このような背景の中、我々はヒト線維芽細胞 TIG-1 を用いて、OCT4, SOX2, Klf4, c-Myc (OSKM) を用いた iPS 細胞の初期 iPS リプログラミングにおける ncRNA の発現解析を試みた。この結果、Y1 の発現変化が誘導開始 3 日目の初期から大きく一過性に変化することを LncProfiler qPCR Array Kits (System Biosciences 社) を用いた網羅解析によって明らかにした。さらにこの Y1 は細胞質内に大量に存在することが明らかとなった。そこで Y1 をノックダウンしながら、OSKM による iPS リプログラミングを試みたところ、有意差を持って、3 日目における iPS 細胞特異的な遺伝子発現と 24 日目におけるその誘導効率が減少した。またノックダウンした細胞は誘導前と同様の形態を維持しており、誘導前の細胞特性を維持している可能性が高い。以上のことから Y1 は iPS 細胞誘導初期において細胞質内で何らかの機能を果たし、その誘導効率に影響を与えている可能性がある。そこで我々は Y1 と相互作用するタンパク質を探索し、その機能を解析し、初期リプログラミングにおける Y1 の作用機序について解明することを目的とする。

## 2. 研究の目的

RNY1(Y1)は脊椎動物、線虫、バクテリアと様々な生物にて、その存在が確認されている保存性の高い non-coding RNAs (ncRNAs)として知られている。また、肺がんや大腸がん由来の組織片、それらの由来癌細胞にて発現の高いことも報告されている。長年の間、この Y1 は、癌細胞や自己免疫疾患患者にて発現量が多い RNA として報告されてきたが、その機能は不明な点が多い。今回、我々は iPS 細胞の初期 iPS リプログラミング過程で Y1 が一過性に高発現し、ノックダウンすると iPS 細胞誘導効率が減衰することを明らかにした。そこでこの Y1 の機能を解明し、初期 iPS リプログラミングにおける作用機序を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

Y1 は Ro60 タンパク質と相互作用することが報告されている。そこで Ro60 タンパク質を免疫沈降法にて回収し、質量分析装置にて解析を行い、候補タンパク質を特定する。特定し

たタンパク質はウェスタンブロット法にて免疫沈降法したサンプル内に存在するかを確認した後、候補タンパク質を絞り込む。次にこれらのタンパク質と Ro60 タンパク質の局在を免疫細胞染色法にて局在を確認し、siRNA による局在の動態を評価する。また機能解析を行うために候補タンパク質の CRISPR 法による KO 細胞株を樹立し、iPS リプログラミングに与える影響も評価していく。

候補タンパク質の探索と同定

Y1 は細胞質に多く含有していたことから、ヒト線維芽細胞 TIG-1 の細胞質タンパク質のみを回収し、Ro60 抗体を用いてウェスタンブロットを行い、タンパク質の存在を確認する。確認後、細胞質タンパク質溶液と Ro60 抗体を用いて免疫沈降法を行い、Ro60 抗体と結合するタンパク質溶液を回収する。回収したタンパク質溶液は Ro60 が濃縮されていることから Y1 も濃縮されていることが予想されるため、Y1 の定量的 PCR (qPCR) 法にて Y1 の存在量を、Ro60 抗体にて Ro60 のタンパク質量をそれぞれ評価する。その後、これらの Ro60 抗体を用いた免疫沈降サンプルは SDS-PAGE にて電気泳動し、そのままゲルを銀染色法にて染色する。染色後、コントロール抗体で免疫沈降したサンプルよりも濃いバンドを確認し、その部位を切り出す。切り出したサンプルは質量分析装置にて解析を行い (外部委託を予定)、解析されたペプチド断片は、Mascot search web app ([http://www.matrixscience.com/search\\_form\\_select.html](http://www.matrixscience.com/search_form_select.html)) にて解析し、候補タンパク質を探索する。これらの候補タンパク質は細胞質内に局在しているという条件で絞り込み、核内のみ局在しているタンパク質は候補から除外する。

次にウェスタンブロット法を用いて、Ro60 抗体にて免疫沈降したサンプルとこれらの候補タンパク質が共に免疫沈降されているかを解析していく。この際、コントロール抗体にて沈降するタンパク質も除外し、Ro60 抗体にて沈降し、バンドの強度 (タンパク質存在量) が大きいタンパク質を Y1-Ro60 複合体との候補タンパク質とし (図 8)、次年度に解析していく。また候補タンパク質抗体にて免疫沈降したサンプルが Ro60 抗体にてウェスタンブロットできるかも合わせて確認する。

これらの解析が終了次第、候補タンパク質の機能解析を進める。具体的な手法は次年度の計画に記載する。

候補タンパク質の機能解析と Y1 との関連性についての評価

前年度に質量分析装置にて選択した候補タンパク質と Y1 の相互作用を見るために、siY1 による候補タンパク質の挙動を解析する。具体的には Y1 をノックダウンした TIG-1 を用いて、候補タンパク質の変化をリプログラミング前と後 (誘導 3 日目) にて評価する。細胞内のタンパク質の局在は抗体を用いた細胞染色を用い、リプログラミング中の細胞を OCT4

陽性細胞として、OCT4 陽性細胞内の局在変化を解析する。さらに免疫沈降法とウェスタンブロット法を用いて、候補タンパク質の存在量の変化も合わせて解析する。また候補タンパク質の機能もそれぞれの候補タンパク質の特性に合わせた形で解析を試みる。これらの遺伝子発現解析を網羅的に行い、siY1 が細胞に与える影響を評価し、その機能の推測に利用する。これにより、候補タンパク質が既知の機能とは異なっているもその新しい機能を推測することは可能となる。

### CRISPR を用いたゲノム編集と iPS 細胞誘導とその機能評価

候補タンパク質が存在しない条件での iPS リプログラミングが可能かどうかについても評価する。こちらは CRISPR テクノロジーを用いてゲノム編集を行い、細胞内にて候補タンパク質が発現しない細胞を誘導する。本研究室は既にレンチウイルスベクター lentiCRISPR v2 (Addgene Plasmid #52961) を用いた CRISPR テクノロジーを日常的に利用しているため、複数の候補タンパク質のノックアウト細胞も容易に作製、樹立することができる。樹立した細胞はウェスタンブロット法にて、候補タンパク質がほぼ存在しないことを確認した後、通常の OSKM を用いた iPS リプログラミングを行い、誘導効率の変化をゲノム編集前の細胞と比較し、誘導効率に変化があるかどうか解析する。

### 4. 研究成果

#### 候補タンパク質の探索と同定

線維芽細胞 (TIG-1、ヒト胎児肺由来線維芽細胞、ref) に CytoTune-iPS 2.0 (MBL 社) を用いて iPS リプログラミングを誘導した。誘導三日後に細胞の細胞質分画のみを回収し、RO60 抗体にて免疫沈降し、SDS-PAGE をかけた。さらに分子量を 6 分画に分け、各分画を LC-MS/MS 解析 (東京都医学総合研究所 亀谷富由樹氏の協力) したところ、合計 12 種のタンパク質が検出された (図 1)。このうち、western blotting 法にて Co-IP されるタンパク質として DDX6 を同定できた (図 2)。また市販されている組換え RO60 タンパク質、DDX6 タンパク質 (Abcam 社) を反応させ、BLItz system (プライムテック株式会社) にて解析したところ、この両者に強い結合能が存在していた (図 3)。

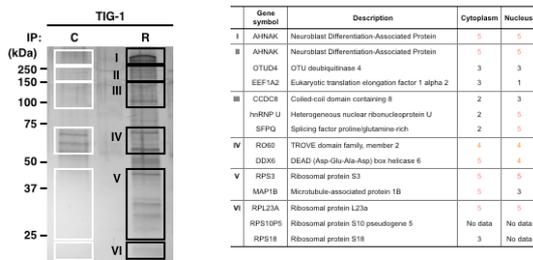
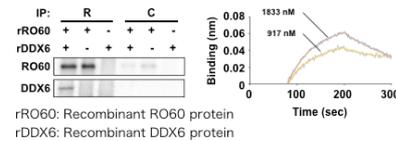


図1 LC-MS/MS解析結果

### 図2 Co-IP with RO60 and DDX6 antibody

C: Cntrl Ab, R: RO60 Ab, D: DDX6 Ab

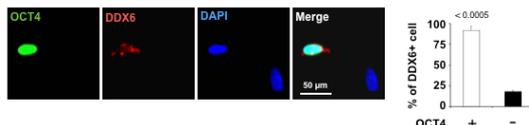


rDDX6 (nM)	rRO60 (nM)	KD (nM)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	X <sup>2</sup> (1/s)	R <sup>2</sup>
193	917	6.2E-07	7.4E+03	4.6E-03	0.0023	0.98
193	1833	9.5E-07	6.6E+03	6.2E-03	0.0019	0.99

### 図3 Protein-Protein interaction analysis

#### 候補タンパク質の機能解析と Y1 との関連性についての評価

同定した DDX6 タンパク質は細胞質内の processing body (PB) と呼ばれる foci にて RNA 代謝の中心的役割を果たしており、RNA の分解、転写抑制、RNA の decapping に関与していることが報告されている (Mathys H., Mol Cell. 2014., Liu J. Nat Cell Biol. 2005., Sheth U. Science. 2003.)。そこで DDX6 と iPS リプログラミングの関係を調べるためにリプログラミング細胞の DDX6 の挙動を解析することにした。誘導三日目におけるリプログラミング中の細胞を OCT4 陽性細胞としたとき、OCT4 陽性細胞と DDX6 の foci 形成は 86% 以上の確率で合致しており (図 4)、リプログラミング時に何らかの役割を果たしている可能性が高い。



### 図4 OCT4 positive cells formed DDX6 foci in the cytoplasm

次に Microarray を用いて RNY1 をノックダウンした細胞とコントロールを比較したところ (Paired t-tests)、ノックダウンした細胞で細胞分裂に関与する因子が有意に増加していることが明らかとなった (図 5)。通常、iPS リプログラミング初期 (~day3) は細胞分裂速度が低下し、細胞内のリプログラミングが促進するとされているため、RNY1 ノックダウンは細胞がリプログラミングされにくい細胞内環境であると予想される。

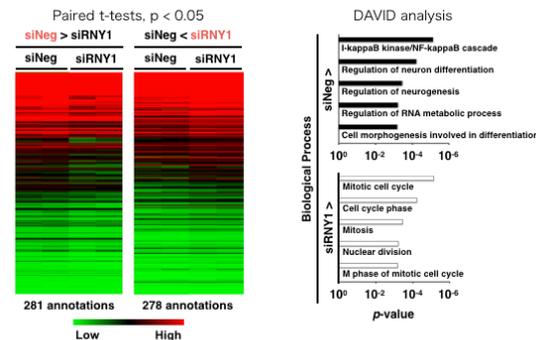
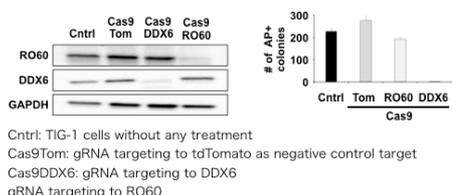


図5 Global gene expression analysis

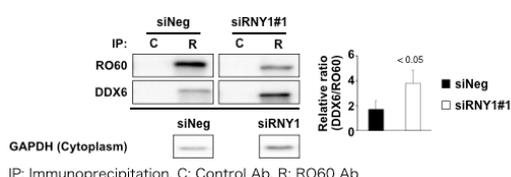
## CRISPRを用いたゲノム編集とiPS細胞誘導とその機能評価

CRISPR/Cas9 systemにてDDX6を破壊したTIG-1にiPSリプログラミング誘導したところ、コロニー形成能が極端に減衰した(図6)。またRNY1ノックダウンした細胞はDDX6とRO60の結合量が増加しており(図7)、RNY1とRO60を介した何らかの制御系の存在が予想される。



Cntrl: TIG-1 cells without any treatment  
Cas9Tom: gRNA targeting to tdTomato as negative control target  
Cas9DDX6: gRNA targeting to DDX6  
gRNA targeting to RO60

**図6 DDX6 protein has an important role in reprogramming cells**



IP: Immunoprecipitation. C: Control Ab, R: RO60 Ab

**図7 Binding Ratio between siRNAs**

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計0件)

現在、投稿準備中。

〔学会発表〕(計3件)

1. Kami D., Kitani T., Toyoda M., Gojo S. Non-coding Y-RNA1 is essential for iPS cell reprogramming. International Society for Stem Cell Research 13th Annual Meeting. Stockholm, Sweden. 2015.
2. Kami D., Kitani T., Gojo S. Maternal RNAs degradation is essential for iPS reprogramming. International Society for Stem Cell Research 14th Annual Meeting. San Francisco, USA. 2016.
3. Kami D., Kitani T., Gojo S. Role in RNA metabolism of processing on RNA helicase DDX6 during iPS reprogramming. International Society for Stem Cell Research 16th Annual Meeting. Melbourne, Australia. 2018.

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

○出願状況(計0件)

該当なし

○取得状況(計0件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等

該当なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

五條 理志 (Gojo Satoshi)

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号: 90316745

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし

### (4) 研究協力者

該当なし