

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04044

研究課題名(和文) Sox2/TBP複合体のクロマチンリモデリング活性と多能性誘導能のメカニズム解析

研究課題名(英文) Chromatin remodeling and Induction of pluripotency via Sox2/TBP complex

研究代表者

伊藤 敬 (ITO, Takashi)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・教授

研究者番号：90306275

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：リプログラミングに重要な因子Sox2が基本転写因子であるTBPと複合体を作ることを明らかにした。SOX2/TBP複合体はクロマチン形成能を有していた。さらにSox2/TBP複合体はRNA Pol II とPol I のプロモーター領域と転写調節領域のクロマチンをリモデリングしそれらの転写を活性化する。細胞内でSOX2とTBPはRNA Pol II とPol I のプロモーター領域と転写調節領域に結合し、ノックダウンによりそれらの結合が減弱し、rDNA とOCT3/4の転写が抑制された。これらの結果はSOX2とTBPはRNA Pol II とPol I の転写に重要な働きを示唆する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

Oct3/4, Sox2, Klf4, cMycによる分化細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングは再生医学領域への応用が期待され社会的にもインパクトの大きい領域である。実際に細胞核内で引き起こされる現象にはまだまだ未知の部分が多い。今回の実験によりSox2/TBP Complexはクロマチン構造変換能を有することを明らかにし、リプログラミングとエピジェネティクスの接点を明らかにしていく上で重要な発見である。詳細な機能の解明によりリプログラミングを含む再生医学領域に貢献できると考える。

研究成果の概要(英文)：It has been discovered that Reprogramming of somatic cells achieved by combination of the four transcription factors Oct4, Sox2, Klf4, and c-Myc. However detailed mechanisms of this reprogramming remained to be clarified. Recently we identify unique SOX2 complex including stoichiometric amount of TBP without TAFs. SOX2/TBP Complex plays role in chromatin assembly. In addition, SOX2/TBP facilitated chromatin remodeling around promoter region of both RNA Pol II and Pol I, resulting in their transcriptional activation in vitro. Both SOX2 and TBP bound to core promoter or enhancer region of both RNA Pol II and Pol I. Knockdown of SOX2 or TBP resulted in decreased rDNA and OCT3/4 expression together with diminished their binding to core promoter and enhancer region in vivo. These results indicated unique complex including SOX2 and TBP plays a role both in Pol I and Pol II transcription.

研究分野：生化学

キーワード：クロマチン SOX2 TBP リプログラミング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

1957年 Waddington が提唱した Epigenetic landscape の概念は、細胞に見立てたボールが細胞分化に見立てた谷間に転がり落ちる様を描出し、一旦、分化の谷間に落ちるとそう簡単に大きな山は超えることができないことを示している(図1)。近年このエピジェネティクスの本体は DNA のメチル化やヒストンの翻訳後修飾で説明されている。ヒストン H3K4 のメチル化や H3K9, H3K14 のアセチル化は遺伝子転写活性化と関連するヒストン修飾であり、ヒストン H3K9, K27 のメチル化は遺伝子転写抑制と関連するヒストン修飾である。さらに H3K9 のメチル化部位や DNA シトシンのメチル化部位はそれぞれ化学修飾と HP1 やメチルシトシン結合タンパク質の相互作用などで強力に遺伝子転写が抑制を受け、凝縮しヘテロクロマチン化していると考えられる。組織特異的なヘテロクロマチンは細胞分裂を通して安定で、Waddington が提唱した Epigenetic landscape の山の部分を構成し、一旦分化した細胞はこの山を簡単には超えることができないと考えられている(総説参照 Goldberg et al., 2007)。この常識を覆し、2006年山中博士らは Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc の山中4因子を線維芽細胞に導入することにより Waddington の Epigenetic landscape における山と谷を平坦にし、分化多能性(pluripotency)を有する iPS 細胞を作ることに成功したのである(図2)。

図1 Waddington's Epigenetic Landscape, 1957

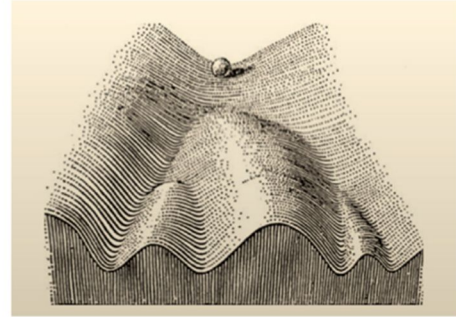
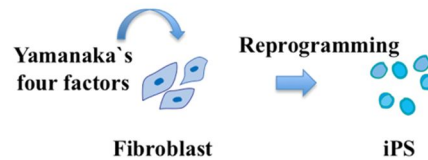


図2 Sox2, Oct3/4, Klf4, cMycによるリプログラミング



一方、分化多能性(pluripotency)を有する ES 細胞や iPS 細胞は分化細胞と比較して特殊なエピジェネティクスを有することが知られている。ヒストン蛋白の翻訳後修飾に関して、分化細胞において遺伝子転写活性化のマークであるヒストン H3K4 のメチル化とヒストン H4 のアセチル化が ES 細胞では通常の分化細胞と比較して亢進している(Azuara et al., 2006)。対照的に遺伝子転写抑制のマークであるヒストン H3K27 のメチル化は ES 細胞の細胞核全体でみると少ないが、ゲノムの特定の場所、特にヒストン H3K4 のメチル化と重複して亢進し、遺伝子転写活性化と抑制化のヒストンマークが共存することから Bivalent Chromatin Structure と呼ばれている(Bernstein et al., 2006)。Oct3/4, Sox2, Nanog などの転写活性化因子はリプログラミングのみならず、ES 細胞や iPS 細胞の分化多能性に重要な働きをしている。これら転写活性化因子の結合領域はしばしば Bivalent Chromatin Structure を呈する(Boyer et al., 2005)。

最近我々は高次クロマチン構造が ES 細胞の分化を調節していることを明らかにした。ヒストン H2A のユビキチン化酵素である Dzip3 が局所のクロマチン高次構造を作り、分化と関連した遺伝子発現を高次構造により調節している(Inoue et al, *Scientific Reports* 2015)。ES 細胞や iPS 細胞の多分化能の維持や分化細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングとクロマチン構造が密接に関連していることが明らかになりつつある。

2. 研究の目的

Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc の 4 因子を線維芽細胞に導入することにより多能性が誘導されることを示し、これにより再生医学が飛躍的に進歩した。このリプログラミングの詳細な分子メカニズムには不明な点も多い。予備実験によりこの 4 因子の一つである Sox2 が基本転写因子である TBP を含むサブユニットと Complex を作ることを明らかにした。本研究では Sox2/TBP Complex のサブユニットを同定し、これらサブユニットがリプログラミングに与える影響を培養細胞の遺伝子ノックダウンにより調べる。さらに試験管内遺伝子転写により Sox2 と Sox2/TBP Complex の違いを分子レベルで明らかにする。これらの研究は Oct3/4, Sox2, Klf4, cMyc の 4 因子によるリプログラミングの分子メカニズムの一端を明らかにする。

3. 研究の方法

今回の基盤研究の予備実験として、我々はタグ付き Sox2 を ES 細胞に導入し、精製したところサブユニットとして基本転写因子 TBP を含む複合体(Sox2/TBP Complex)を構成していることを

明らかにした(図3)。リプログラミングにおいて、本来分化細胞では抑制を受けている多能性幹細胞特異的な遺伝子の転写を可能にするためには、Sox 2 を含む山中4因子が、クロマチン高次構造と関連したエピジェネティックな転写抑制機構を転換する機能を有することが推測される。我々が同定した Sox2/TBP Complex がどのようにして多分化能の維持やリプログラミングに貢献しているかを明らかにする。

ES 細胞や iPS 細胞の多分化能の維持や分化細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングに於ける Sox2/TBP Complex の機能を明らかにする。

(1) Sox2/TBP Complex は Sox2, Core Histones, subunit a, b, c, d, e, f, TBP, h より構成されている。複合体の機能を明らかにするためには、構成要素のタンパク質を同定することは大きな糸口となる。Core Histones は LC-Mas/Mas により同定することができた。平成 28 年サブユニットの一つ g が TBP である事を同定したが、この complex には TFIID の他のサブユニットである TAFs は含まれていない点がユニークで興味深い。LC-Mas/Mas により subunit a, b, c, d, e, f, h の同定を試みる。

(2) ES 細胞や iPS 細胞の多分化能の維持に subunit a, b, c, d, e, f, TBP, h が必須であるか否かを明らかにする(図4)。

(3) 分化細胞から多能性幹細胞へのリプログラミングに subunit a, b, c, d, e, f, TBP, h が必要であるか否かを明らかにする(図5)。

(4) 試験管内遺伝子転写系を用いて Sox2 単体と TBP を含む Sox2/TBP Complex の違いを明らかにする。

(5) Core Histones を有する Sox2/TBP Complex のクロマチン構造変換能に関して詳細に調べる。

Core Histones を有する Sox2/TBP Complex のクロマチン構造変換能に関してスーパーコilingアッセイにより調べる。この研究期間内に rSox2 のどのモチーフがクロマチン構造変換能を有するかを調べる。さらにこのモチーフが遺伝子転写に与える影響を試験管内転写により調べる。

図3 Sox2 complexの精製

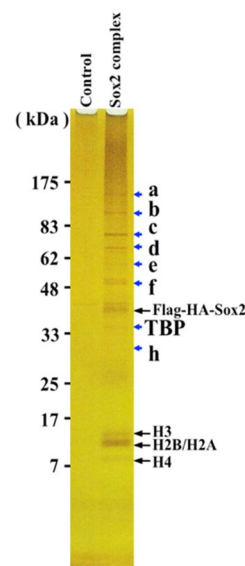


図4 Sox2 Complex a-h のノックダウン(KD)によるES細胞多分化能の変化

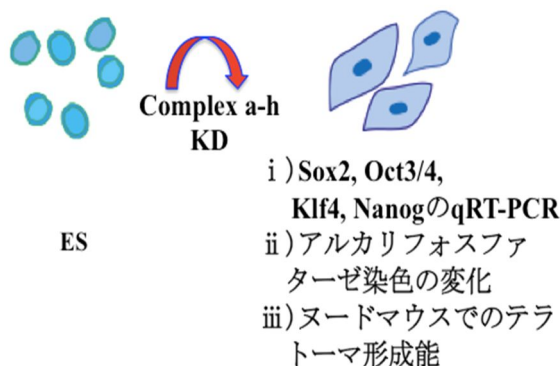
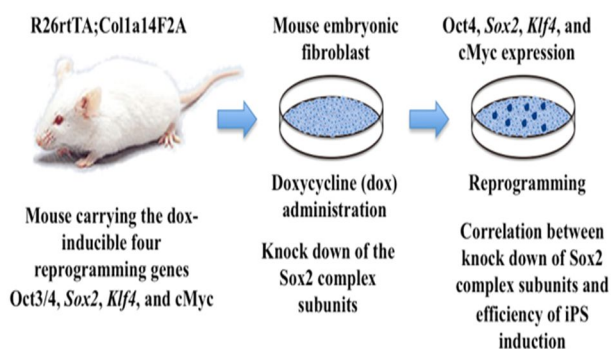


図5 Sox2 complex がリプログラミングに与える影響



4. 研究成果

Sox2 結合領域を従来転写研究に用いられている AdE4 プロモーターに連結したプラスミドにより Sox2 単体と Sox2/TBP Complex の違いを明らかにした。クロマチンを用いて局所への結合能、クロマチンのリモデリング活性、転写活性化レベルなどを調べた。プラスミド DNA による実験で Sox2/TBP Complex がクロマチン特異的に転写を活性化することを明らかにした。

Core Histones を有する Sox2/TBP Complex のクロマチン構造変換能に関してスーパーコilingアッセイにより調べた。陽性コントロールとしてプラスミド DNA, Core Histones とクロマチン形成因子 rNAP-1, rACF によりヌクレオソームを形成する。スーパーコilingが導入されるとヌ

クレオソーム形成能があることがわかる。rNAP-1 の代わりに rOct3/4、rSox2 又は Sox2/TBP Complex を加え、スーパーコイルで示されるヌクレオソーム形成能があるか否かを調べたところ、rSox2 にクロマチン構造変換能があることが明らかとなった (図6)。rSox2 又は Sox2/TBP Complex が遺伝子転写に与える影響を試験管内転写により調べた。Sox2 結合領域を従来転写研究に用いられている AdE4 プロモーターに連結したプラスミドにより Sox2 単体と Sox2/TBP Complex の違いを明らかにした (図7)。Sox2/TBP Complex は Sox2 単体よりもクロマチンのリモデリング、転写活性化とも高い値を示した。Sox2/TBP の Chip seq のデータ解析を行うと RNA Pol III に加えて RNA Pol II の転写にも関与するらしいことを明らかにした。RNA Pol II の転写プラスミドに Sox2 結合領域を挿入しクロマチンリモデリングと転写活性化に関して調べた。Sox2/TBP Complex は Sox2 単体よりも RNA Pol II の転写領域のクロマチンのリモデリング、転写活性化とも高い値を示した。これらの成果は Oct3/4, Sox2, などの因子がリボソームへの転写にも影響を与えリプログラミングを協調的に進めることを明らかにしたものである。

図6 Super coiling assayによるクロマチン構造変換の検討

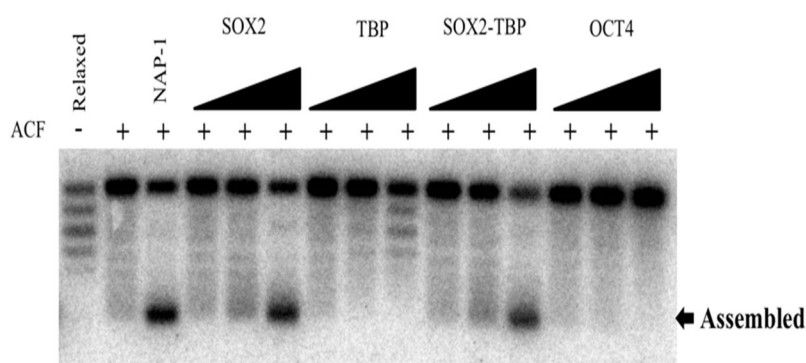
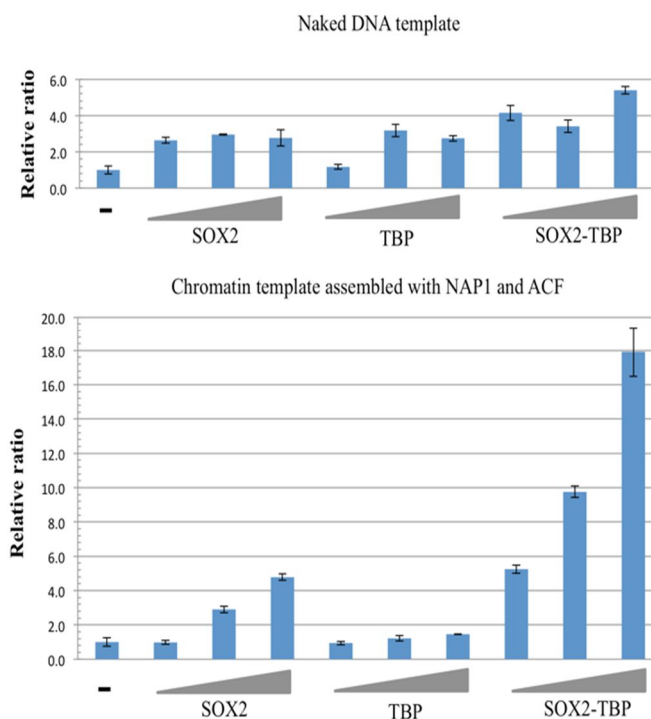


図7 SOX2-TBP complexはクロマチン特異的に遺伝子転写を活性化する



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakagawa Takeya, Yoneda Mitsuhiro, Higashi Miki, Ohkuma Yoshiaki, Ito Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Enhancer function regulated by combinations of transcription factors and cofactors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 808 ~ 821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12634	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasui Kiyoshi, Izumida Mai, Nakagawa Takeya, Kubo Yoshinao, Hayashi Hideki, Ito Takashi, Ikeda Hiroaki, Matsuyama Toshifumi	4. 巻 501
2. 論文標題 MicroRNA-3662 expression correlates with antiviral drug resistance in adult T-cell leukemia/lymphoma cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 833 ~ 837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.159	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Maeda Katsutoshi, Yoneda Mitsuhiro, Nakagawa Takeya, Ikeda Kazuhiro, Higashi Miki, Nakagawa Kaori, Miyakoda Mana, Yui Katsuyuki, Oda Hiroaki, Inoue Satoshi, Ito Takashi	4. 巻 23
2. 論文標題 Defects in centromeric/pericentromeric histone H2A T120 phosphorylation by hBUB1 cause chromosome missegregation producing multinucleated cells	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Genes to Cells	6. 最初と最後の頁 828 ~ 838
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12630	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato, M., Yoneda, M., Takeshima, Y., Amatya, V.J., Higashi, M., Nakagawa, T., and Ito, T.	4. 巻 62
2. 論文標題 The MAP3K2-ERK5 pathway upregulates cyclin D1 expression through histone H2A (Thr120) phosphorylation by VRK1.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Medica Nagasakiensia	6. 最初と最後の頁 15-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shi Lin, Fujioka Kurumi, Sakurai-Ozato Nami, Fukumoto Wataru, Satoh Kenichi, Sun Jiyong, Awazu Akinori, Tanaka Kimio, Ishida Mari, Ishida Takafumi, Nakano Yukiko, Kihara Yasuki, Hayes C. Nelson, Aikata Hiroshi, Chayama Kazuaki, Ito Takashi, Awai Kazuo, Tashiro Satoshi	4. 巻 190
2. 論文標題 Chromosomal Abnormalities in Human Lymphocytes after Computed Tomography Scan Procedure	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Radiation Research	6. 最初と最後の頁 424 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1667/RR14976.1	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yasui K, Izumida M, Nakagawa T, Kubo Y, Hayashi H, Ito T, Ikeda, H, Matsuyama, T.	4. 巻 501
2. 論文標題 MicroRNA-3662 expression correlates with antiviral drug resistance in adult T-cell leukemia/lymphoma cells.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 833-837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.04.159.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto, S., Hagihara, T., Horiuchi, Y., Okui, A., Wani, S., Yoshida, T., Inoue, T., Tanaka, A., Ito, T., Hirose, Y. and Ohkuma, Y.	4. 巻 22
2. 論文標題 Mediator cyclin-dependent kinases upregulate transcription of inflammatory genes in cooperation with NF-kappaB and C/EBPbeta on stimulation of Toll-like receptor 9.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Genes Cells	6. 最初と最後の頁 265-276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/gtc.12475.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Higashi, M., Yoneda, M., Nakagawa, T., Ikeda, M., and Ito, T.	4. 巻 511
2. 論文標題 miR-222 regulates proliferation of primary mouse hepatocytes in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 644-649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2019.02.093	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Takashi Ito
2. 発表標題 Histone H2A Thr 120 phosphorylation results in cancer via up regulation of Cyclin D1
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

長崎大学医学部生化学 http://www.med.nagasaki-u.ac.jp/biochem/

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	中川 武弥 (NAKAGAWA Takeya) (50363502)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教 (17301)	
研究分担者	米田 光宏 (YONEDA Mitsuhiro) (80508367)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・講師 (17301)	
研究分担者	今村 優子 (IMAMURA Yuko) (50610937)	長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・特任研究員 (17301)	