

令和元年6月17日現在

機関番号：84420

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15605

研究課題名(和文) Nucleostemin欠損によるOct3/4のDNA結合能低下メカニズムの解明

研究課題名(英文) Alteration of DNA binding specificity of Oct3/4 in nucleostemin knock out ESC

研究代表者

浅賀 正充 (Asaka, Masamitsu)

国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所・医薬基盤研究所 霊長類医科学研究センター・プロジェクト研究員

研究者番号：60572865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：NucleosteminはES細胞に発現している核小体タンパク質であり、欠損により本来のES細胞の分化とは異なり、栄養外胚葉へ分化する。申請者らは、栄養外胚葉分化を阻害する転写因子であるOct4のDNA結合能が低下しているのではないかと仮定し研究を行った。

Nucleostemin欠損ES細胞を用いたChIP-seq解析を行った結果、Nucleostemin欠損によってOct4が本来結合するコンセンサス配列に結合できなくなる事を明らかにした。また、NanogまたはEsrrbの過剰発現で、Nucleostemin欠損によるOct4のDNA結合能が回復することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ES細胞は、外・中・内胚葉といった3胚葉全ての分化を達成できるが、胎盤等の胚体外組織の元となる栄養外胚葉へと変換する能力は、本来失われている能力である。Nucleostemin遺伝子欠損によるES細胞の栄養外胚葉への変換は、通常の発生とは逆であり、極めて謎である。従って、本研究成果がリプログラミングの研究分野に対して極めて大きなインパクトを与えると考えられる。また、Nucleosteminは、がん細胞でも高発現しているの、本研究からの成果は、がん研究分野に対しても影響を与えるのではないかと期待される。

研究成果の概要(英文)：Nucleostemin (NS) is a nucleolar GTP-binding protein that is expressed in various cancer cells and stem cells including embryonic stem cells (ESCs). We have previously demonstrated that knockout of NS resulted in the trophectodermal differentiation, although Oct3/4, one of the transcription factor that repress trophoctodermal differentiation, is expressed in NS knockout ESCs. Therefore, we hypothesized that DNA binding ability of Oct3/4 is impaired in NS knockout ESCs.

To address this, we carried out ChIP-seq analyses using NS knockout ESCs, and found that recognition sequence of Oct3/4 was altered in NS knockout ESCs compared with that in normal ESCs. We also revealed that overexpression of Nanog or Esrrb rescues the DNA binding ability of Oct3/4 in NS knockdown ESCs.

研究分野：分子生物学 細胞生物学

キーワード：ES細胞 Nucleostemin Oct3/4 ChIP-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Nucleostemin は核小体に局在するタンパク質であり、多くの種類のがん細胞や ES 細胞を含めた各種組織幹細胞で発現することが知られる。申請者らのグループは、Nucleostemin の欠損により ES 細胞の多分化能が維持できず、胚体外組織になることが運命付けられた栄養外胚葉細胞へと分化することがわかった。これまでの研究で、*Oct3/4* 遺伝子を欠失させると *Cdx2* の発現が亢進し、栄養外胚葉細胞へと変換することが知られている。また ES 細胞において、*Cdx2* を過剰発現すると、*Cdx2* タンパク質は *Oct3/4* とヘテロダイマーを形成することで *Oct3/4* の機能を阻害し、その結果、内在性の *Cdx2* 遺伝子の発現が上昇することが知られている。従って、栄養外胚葉への分化は主に *Oct3/4* と *Cdx2* のバランスにより調節されているといえる。上記の背景から、申請者は、Nucleostemin 欠損 ES 細胞が栄養外胚葉へと分化する理由として、*Oct3/4* の発現量減少が原因であると考えた。しかしながら、この細胞では、多くの ES 細胞マーカー遺伝子の発現が軒並み低下するにも関わらず、*Oct3/4* の発現の減少がほとんど見られないことがわかった。しかし、*Cdx2* の発現は顕著に上昇しており、Nucleostemin 欠損による栄養外胚葉分化メカニズムは不明のままであった。

2. 研究の目的

申請者らは、これらの結果を全て説明し得る分子メカニズムとして、Nucleostemin 欠損 ES 細胞では *Oct3/4* の DNA 結合能が低下しているのではないかという可能性を考えた。実際に、申請者らによる先行研究から、Nucleostemin 欠損に伴っていくつかの遺伝子プロモーターにおいて *Oct3/4* の DNA 結合能の低下が示唆された。そこで、本申請課題では Nucleostemin 欠損による *Oct3/4* の DNA 結合能低下の分子メカニズムを明らかにすることを目標として本研究課題を設定した。

3. 研究の方法

(1) 申請者らは、これまでの予備実験から Nucleostemin 遺伝子の発現の消失に伴って、少なくとも一部の遺伝子領域で *Oct3/4* の結合能が低下していることを発見した。そこで、この発見が数少ない特定の遺伝子上でのみ見られる現象であるか、もしくは *Oct3/4* によって発現が制御されることが知られている多くの遺伝子で見られる現象であるかを明らかにするため、ChIP-seq 解析を行った。

(2) *Oct3/4* の DNA 結合能が低下する原因として最初に考えられるのは、*Oct3/4* とペアを形成し、DNA に結合することが知られている *Sox2* の発現量の低下の可能性である。実際に、Nucleostemin の欠損 4 日目から *Sox2* の発現量の顕著な低下がみられる。しかし、*Oct3/4* の DNA 結合能の低下は 3 日目で観察されることから、*Sox2* の関与の可能性は低いと考えられる。そこで、実際に *Sox2* の発現量と *Oct3/4* の DNA 結合能の低下の関連を調べるために、*Sox2* を過剰発現する Nucleostemin 欠損 ES 細胞を用いて ChIP-seq を行った。

(3) 申請者らは、*Oct3/4* の翻訳後修飾であるユビキチン化が *Oct3/4* の DNA 結合能低下と関連する可能性を見出した。そこで、*Oct3/4* のユビキチン化が Nucleostemin 欠損により変化するか Flag タグ融合ユビキチンを用いて解析を行った。また、ユビキチン化できない *Oct3/4* 変異体を用いて ChIP-seq を行い、*Oct3/4* のユビキチン化と DNA 結合能について解析を行った。

(4) 申請者らは、Nucleostemin 欠損による ES 細胞の栄養外胚葉への分化が、転写因子 *Esrrb* および *Nanog* の過剰発現によって抑制されることを明らかにしている。そこでこれらの転写因子の過剰発現により *Oct3/4* の DNA 結合能が回復するか ChIP-seq により解析を行った。

4. 研究成果

(1) Nucleostemin 欠損により Oct3/4 の DNA 結合能が変化するか検討を行うために、ドキシサイクリン依存的に Nucleostemin を欠損することができるマウス ES 細胞株を用いて ChIP-seq を行った。Gene Ontology 解析

の結果、Oct3/4 が結合する遺伝子群に大きな違いは見られなかった。しかし Homer による解析の結果、ドキシサイクリン非添加の ES 細胞で観察されていた Oct3/4・Sox2 (Pou5f1::Sox2) のコンセンサス配列が、ドキシサイクリン添加後に観察できなくなった(図1)。この結果から、Nucleostemin 欠損 ES 細胞株内では Oct3/4 がコンセンサス配列に結合できない可能性が示唆された。

図1

NSKO cells Dox 0day

Rank	Motif	P-value	Best Match/Details
1		1e-20	PB0099.1_Zfp691_1/Jaspar(0.728) More Information Similar Motifs Found
2		1e-20	Pou5f1::Sox2/MA0142.1/Jaspar(0.811) More Information Similar Motifs Found
3		1e-18	Sox17(HMG)/Endoderm-Sox17-ChIP-Seq(GSE61475)/Homer(0.756) More Information Similar Motifs Found
4		1e-13	NFAT5/MA0606.1/Jaspar(0.719) More Information Similar Motifs Found
5		1e-12	ZNF354C/MA0130.1/Jaspar(0.640) More Information Similar Motifs Found

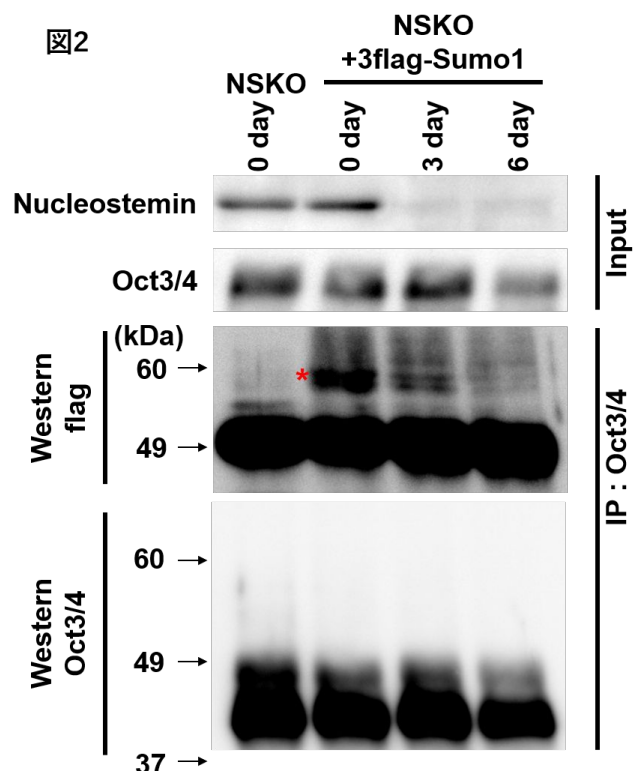
NSKO cells Dox 6day

Rank	Motif	P-value	Best Match/Details
1		1e-22	ZNF354C/MA0130.1/Jaspar(0.636) More Information Similar Motifs Found
2		1e-12	AR-halfsite(NR)/LNCaP-AR-ChIP-Seq(GSE27824)/Homer(0.617) More Information Similar Motifs Found
3		1e-12	MEIS1/MA0498.2/Jaspar(0.667) More Information Similar Motifs Found
4		1e-12	PB0099.1_Zfp691_1/Jaspar(0.744) More Information Similar Motifs Found

(2) Oct3/4 の DNA 結合能が低下する原因の 1 つとして考えられるのが、Sox2 の減少である。Sox2 は Oct3/4 とペアで DNA に結合する性質がある。Nucleostemin 欠損 ES 細胞では、ドキシサイクリン添加 4 日後に Sox2 の減少が観察され、それが原因で Oct3/4 もコンセンサス配列への結合が低下している可能性を考えた。そこで、Nucleostemin 欠損 ES 細胞に Sox2 を過剰発現することで Oct3/4 の DNA 結合能が回復するか ChIP-seq により検証を行った。その結果、Sox2 の過剰発現では Oct3/4 のコンセンサス配列への結合能は回復しなかった。従って Nucleostemin 欠損による Oct3/4 の DNA 結合能の低下は Sox2 に依存しないことが明らかとなった。

(3) 我々は、核小体に局在する Nucleostemin が直接核内局在の Oct3/4 に関与する可能性は低いと推測していた。これまでの報告で、Nucleostemin 欠損によりいくつかの核小体局在タンパク質が核内に放出される報告がある。そこで Nucleostemin 欠損により核小体に存在する因子が核小体から核内に放出されることで Oct3/4 の DNA 結合能に影響を及ぼすのではないかと推測した。申請当所は、核小体から放出される因子で Oct3/4 に関与する因子のスクリーニングを計画していた。しかし、申請者は通常の ES 細胞と Nucleostemin 欠損 ES 細胞の Oct3/4 のウエスタンブロッティングを行った際に、通常の ES 細胞で観察される本来の Oct3/4 のバンドより泳動

図2



度の遅いバンドが観察され、それが Nucleostemin 欠損細胞では減少していることを偶然発見した。そこで、申請者は Oct3/4 の翻訳後修飾が Nucleostemin 欠損により減少することで DNA 結合能が変化しているのではないかと考えた。これまでの報告で、Oct3/4 の SUMO 化により DNA の結合が上昇することが示唆されていることから、Oct3/4 の SUMO 化が Nucleostemin 欠損で減少する可能性を考えた¹。そこで、Flag タグ融合 SUMO タンパク質を発現する Nucleostemin 欠損 ES 細胞を樹立し検討を行った。その結果、Nucleostemin 欠損により Oct3/4 の SUMO 化が減少することが明らかとなった(図2)。次に、Oct3/4 の SUMO 化による DNA 結合能への影響を検討するため、SUMO 化される Oct3/4 のリジンをアルギニンに置換した Oct3/4 変異体を作成して ChIP-seq により検討を行った。その結果 SUMO 化されない Oct3/4 変異体においても通常の Oct3/4 と同様にコンセンサス配列に結合することが明らかとなった。従って、Nucleostemin 欠損で見られる Oct3/4 の DNA 結合能の変化は Oct3/4 の SUMO 化に起因しないことが明らかとなった。

(4) 申請者らはこれまでに、Nucleostemin 欠損による ES 細胞の分化が、転写因子である Nanog または Esrrb の過剰発現で抑制できることを見出している。そこで、Nucleostemin 欠損による Oct3/4 の DNA 結合の低下がこれらの転写因子により回復する可能性を ChIP-seq により検討した。その結果、Nanog または Esrrb のどちらの転写因子の過剰発現においても Nucleostemin 欠損によるよって消失する Oct3/4・Sox2 のコンセンサス配列が再び検出できるようになった(図3)。

図3

Nanog rescued NSKO cells Dox 0day

Rank	Motif	P-value	Best Match/Details
1		1e-26	Pou5f1::Sox2/MA0142.1/Jaspar(0.936) More Information Similar Motifs Found
2		1e-16	HIC2/MA0738.1/Jaspar(0.710) More Information Similar Motifs Found
3		1e-14	Pit1(Homeobox)/GCrat-Pit1-ChIP-Seq(GSE58009)/Homer(0.709) More Information Similar Motifs Found
4		1e-13	OCT:OCT(POU,Homeobox,IR1)/NPC-Brm2-ChIP-Seq(GSE35496)/Homer(0.761) More Information Similar Motifs Found

Nanog rescued NSKO cells Dox 11day

Rank	Motif	P-value	Best Match/Details
1		1e-24	Pou5f1::Sox2/MA0142.1/Jaspar(0.792) More Information Similar Motifs Found
2		1e-15	DMRT6(DM)/Testis-DMRT6-ChIP-Seq(GSE60440)/Homer(0.655) More Information Similar Motifs Found
3		1e-12	RUNX2(Runt)/PCa-RUNX2-ChIP-Seq(GSE33889)/Homer(0.719) More Information Similar Motifs Found

この結果から、Nanog または Esrrb によって Nucleostemin 欠損による Oct3/4 の DNA 結合能の低下を抑制できることが明らかとなった。

<引用文献>

- (1) Wei F, Schöler HR, Atchison ML. Sumoylation of Oct4 enhances its stability, DNA binding, and transactivation. *J Biol Chem.* 282(29):21551-60 (2007)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4件)

Belczyk-Ciesielska A, Csipak B, Hajdu B, Sparavier A, Asaka MN, Nagata K, Gyurcsik B, Bal W. Nickel(ii)-promoted specific hydrolysis of zinc finger proteins. *Metallomics.* 10(8):1089-1098. DOI:10.1039/c8mt00098k (2018) 査読有

Hirasaki M, Ueda A, Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Kohda M, Mizuno Y, Okazaki Y, Nishimoto M, Sharif J, Koseki H, Okuda A. Identification of the Coiled-Coil Domain as an Essential Mbd3 Element for Preserving Lineage Commitment Potential of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells.* 36(9):1355-1367. DOI: 10.1002/stem.2849 (2018) 査読有

Németh E, Asaka MN, Kato K, Fábrián Z, Oostenbrink C, Christensen H. E. M, Nagata K, Gyurcsik B. Chemical approach to biological safety - Molecular level control of an integrated zinc finger nuclease. *ChemBioChem.* 19(1):66-75. DOI:

10.1002/cbic.201700420 (2018) 査読有

Asaka MN, Uranishi K, Suzuki A, Hirasaki M, Nishimoto M, Okuda A. Link between embryonic stem cell pluripotency and homologous allelic pairing of Oct4 loci. Dev Growth Differ. 59(8):639-647. DOI: 10.1111/dgd.12403 (2017) 査読有

[学会発表](計 2件)

浅賀正充、平崎正孝、鈴木歩、西本正純、浦西洸介、奥田晶彦、Nucleostemin 欠損 ES 細胞における Oct3/4 転写因子の DNA 結合特異性の変化、第 14 回 霊長類医科学フォーラム、2018

浅賀正充、平崎正孝、鈴木歩、西本正純、浦西洸介、奥田晶彦、Nucleostemin KO ES 細胞における Oct3/4 転写因子の DNA 結合特異性における変化、3 領域合同若手勉強会 2017、2017

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。