

機関番号：82626

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20610008

研究課題名（和文） クロマチン因子による幹細胞の制御と安全高効率幹細胞化法への応用

研究課題名（英文） Regulatory mechanism of ES cells by a novel chromatin-related factor and its application to the reprogramming method of somatic cells.

研究代表者

栗崎 晃 (KURISAKI AKIRA)

独立行政法人 産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：60346616

研究成果の概要（和文）：

多分化能を持つES細胞では、核内のDNAを巻き取るクロマチンとよばれる構造が弛緩した特徴的な状態が観察されているが、このような核内状態が幹細胞の未分化性や多分化能を制御するしくみについてはほとんどわかっていなかった。今回、クロマチン構造を弛緩する作用を持つ因子であるTIF1 $\beta$ リン酸化体がES細胞の未分化状態の維持を容易にし、良質のiPS細胞の作成を容易にする作用があることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

Although hyperdynamic chromatin is a hallmark of pluripotent stem cells, the mechanisms that regulate these conditions of chromatin were poorly understood. In this study, we found that phosphorylated form of TIF1 $\beta$  is a critical molecule for the maintenance of pluripotency of ES cells. Moreover, phosphorylated form of TIF1 $\beta$  is effective to establish better quality of iPS cells.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 2,500,000 | 750,000   | 3,250,000 |
| 2009年度 | 1,000,000 | 300,000   | 1,300,000 |
| 2010年度 | 200,000   | 60,000    | 260,000   |
| 年度     |           |           |           |
| 年度     |           |           |           |
| 総計     | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：幹細胞医・生物学（時限付き）

科研費の分科・細目：なし

キーワード：幹細胞、クロマチン、プロテオミクス、ES細胞、iPS細胞

## 1. 研究開始当初の背景

マウス線維芽細胞にOct4, Sox2, cMyc, Klf4の4転写因子を導入するとES細胞様のiPS細胞を作成可能であることが示されたが、その効率は極めて低く幹細胞化の速度も遅く、そのメカニズムも不明であった。また、ES細胞などの多能性幹細胞ではゲノムワイドに弛緩したクロマチン状態が観察されていた

が、そのような特徴的なクロマチン状態を引き起こすしくみや多能性幹細胞特異的な転写因子ネットワークに及ぼす影響も不明であった。

## 2. 研究の目的

我々はES細胞核の詳細なプロテオミクス解析を行い、数種のクロマチン因子が多能性幹

細胞で特異的に発現し、分化に伴い急速に減少することを報告した(栗崎ら BBRC, 2005)。これらの因子の中のいくつかはゲノム DNA に直接結合しクロマチン構造をリモデリングしうる因子群であった。その中で特に、リン酸化依存的にゲノム DNA 構造を強力に弛緩させる活性を持つ TIF1  $\beta$  が幹細胞の自己複製・多能性維持を促進する活性を持つことに気づいた。本研究では、TIF1  $\beta$  の機能解析を通して、クロマチン因子による幹細胞の制御のしくみの解明と安全高効率幹細胞化法への応用の可能性について検討することを目的とした。

### 3. 研究の方法

幹細胞における TIF1  $\beta$  の作用機序を明らかにするため、特にクロマチンリモデリング活性に必須の TIF1  $\beta$  の C 末付近のリン酸化状態を模倣する変異体を作成し、マウス ES 細胞の未分化維持及び分化に及ぼす影響を解析した。また、どのようなメカニズムでこのような作用を引き起こしているか、その細胞内局在、結合タンパク質、遺伝子発現に及ぼす影響の面から解析した。また、リプログラミングに及ぼす効果についても検討した。

### 4. 研究成果

TIF1  $\beta$  を ES 細胞で過剰発現すると、LIF 非存在下でもしばらくの間未分化マーカーであるアルカリフォスファターゼ活性を維持し、Nanog や SSEA1 の発現を維持していた。

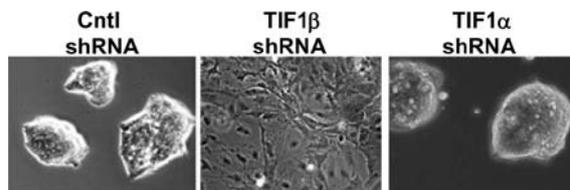


図 1. TIF1  $\beta$  の過剰発現は ES 細胞の未分化状態の維持を促進する。

一方、TIF1  $\beta$  ノックダウンすると著しく増殖が抑制され、SSEA1、Oct3/4、Nanog などの発現が低下し、分化形態を示すようになる。

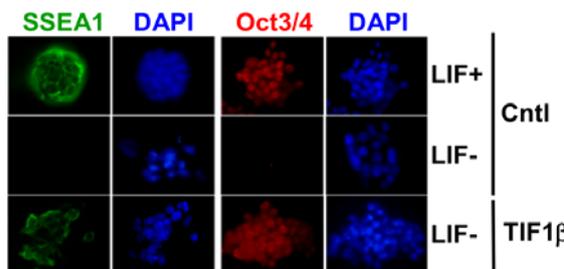


図 2. ノックダウンによる形態変化

TIF1  $\beta$  はヘテロクロマチン形成に関わる転写抑制因子として知られており、ヘテロクロ

マチン構成タンパク質 HP1 と直接結合する一方で、TIF1  $\beta$  自体が SUMO E3 リガーゼとして TIF1  $\beta$  自身を SUMO 化し、NURD 複合体等をリクルートすることでゲノムのヘテロクロマチン化を促進することが知られていた。我々は TIF1  $\beta$  が C 末のセリンのリン酸化に伴いクロマチン構造を弛緩させる作用を引き起こすという最近の報告に基づき、TIF1  $\beta$  は未分化な ES 細胞で C 末が特異的にリン酸化され、ES 細胞特異的なクロマチンの弛緩を引き起こしているのではないかと仮説を立てた。実際に TIF1  $\beta$  は未分化 ES 細胞特異的にリン酸化されており、また、ES 細胞が樹立される内部細胞塊でも特異的にリン酸化されていた。

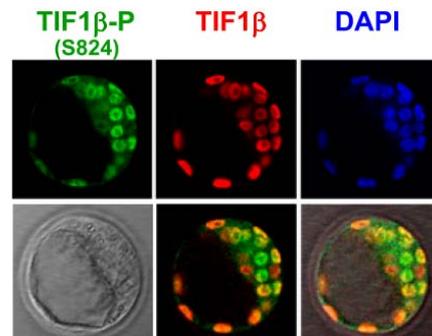


図 3. マウス胚盤胞の内部細胞塊で特異的に TIF1  $\beta$  のリン酸化が観察される。

TIF1  $\beta$  のリン酸化を模倣した S824D やリン酸化されない S824A の変異体をマウス ES 細胞で安定発現させて調べてみたところ、LIF 非存在下ではリン酸化依存的に Nanog、Oct3/4、Sox2 などの未分化特異的転写因子群が発現上昇し未分化維持活性が観察された。

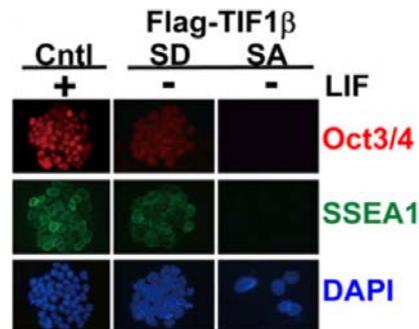


図 4. TIF1  $\beta$  はリン酸化依存的(SD)に ES 細胞の未分化状態の維持促進作用を示す。

一方、リン酸化依存的に神経などへの分化を抑制する効果が観察された。興味深いことに Oct3/4、Sox2、Klf4、cMyc の 4 因子と組み合わせると TIF1  $\beta$  (S824A) を発現させるとほとんど iPS 細胞が樹立されないが、TIF1  $\beta$  (S824D) を組み合わせただけの場合には樹立された iPS における各種未分化細胞マーカーがより安定し

で発現するようになった。すなわち、TIF1β のリン酸化は iPS 化の過程で重要であることが示唆された。

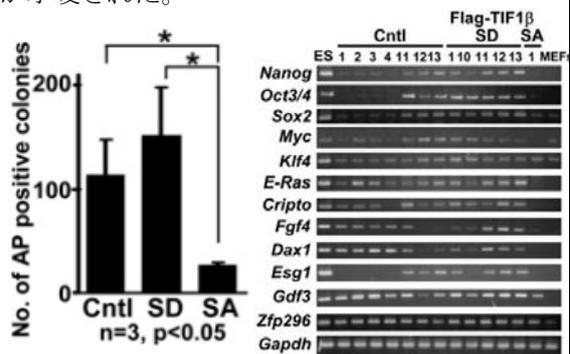


図5. リン酸化型(SD)及び非リン酸化型(SA) TIF1β の iPS 細胞樹立への効果(左) 樹立された各種 iPS 細胞株の遺伝子発現(右)

我々は TIF1β が未分化 ES 細胞特異的な遺伝子群の転写活性化に関わっている可能性を考え、TIF1β リン酸化変異体を安定発現させた ES 細胞を用いて免疫沈降実験により TIF1β と相互作用する因子を検討した。その結果、Oct3/4 が TIF1β のリン酸化依存的に TIF1β の N 末断片に結合し、TIF1β がリン酸化依存的に Oct3/4 と協調して Nanog 近位プロモーターを転写活性化すること、さらには Nanog

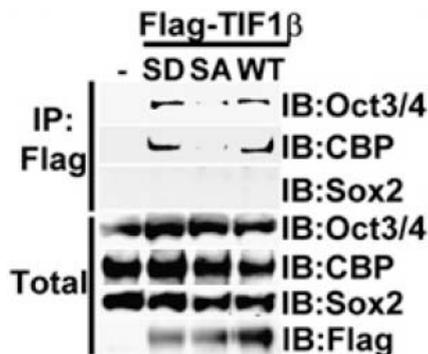


図6. TIF1β はリン酸化依存的に Oct3/4 に結合する。

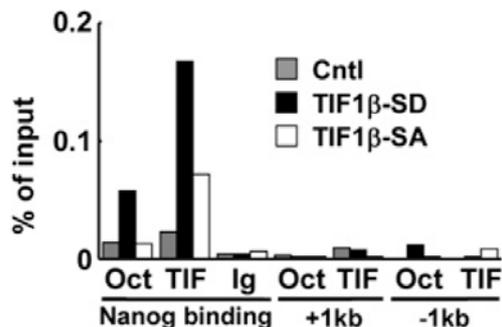


図7. TIF1β はリン酸化依存に Nanog 近位プロモーターに結合する。

近位プロモーターにリン酸化依存的に結合

することを ChIP アッセイにより見出した。また、マイクロアレイ解析の結果、TIF1β のリン酸化依存的に変動する遺伝子の約半数が Oct3/4 のターゲット遺伝子であり、他にも Suz12、CHD9、Pcaf 等のクロマチンリモデリングに関与する因子が転写活性化されることが明らかにした。

以上の結果から、TIF1β は未分化 ES 細胞でリン酸化依存的に Oct3/4 と協調して転写活性化に寄与するクロマチン制御因子であることが示唆された。

#### 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3件)

①栗崎 晃、関 泰宏:クロマチン制御因子を介した幹細胞未分化制御 実験医学(2011) 29(1): 15-20 査読無

②Kurisaki A., Ito Y., Onuma Y., Intoh A., and Asashima M. : In vitro organogenesis using multipotent cells. Human Cell, 2010, 23(1):1-14 査読有

③Seki Y., Kurisaki A., Watanabe-Susaki K., Nakajima Y., Nakanishi M., Arai Y., Shiota K., Sugino H., and Asashima M., TIF1-beta cooperates with Oct3/4 and regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2010) 107(24):10926-10931 査読有

[学会発表] (計2件)

①CREST/さきがけ「iPS 細胞」領域 合同シンポジウム 2011 年 1 月 14 日 日本未来館 ポスター発表

栗崎 晃 ES 細胞の未分化性を制御する新規クロマチン関連因子

②第9回日本再生医療学会総会 シンポジウム招待講演 2010 年 3 月 18-19 日 広島国際会議場

Kurisaki A. A novel chromatin-related factor that regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner.

[図書] (計1件)

①Kurisaki A., Seki Y, Intoh A: Proteomic analysis of mouse ES cells, 143-159, Embryonic Stem Cells: The Hormonal Regulation of Pluripotency and Embryogenesis. (Edited by: Craig Atwood) 2011, Intech.

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/scrc/ci/teams/stemcell/index.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

栗崎 晃 (KURISAKI AKIRA)

独立行政法人 産業技術総合研究所・幹細胞工学研究センター・研究チーム長

研究者番号：60346616