

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770206

研究課題名(和文)新規shRNAライブラリーによる多能性幹細胞のゆらぎの分子機構同定

研究課題名(英文) Novel shRNA library screening to identify key factors that are important in pluripotent stem cells

研究代表者

堀田 秋津(Hotta, Akitsu)

京都大学・iPS細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50578002

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではES細胞やiPS細胞の持つ多能性の分子機構の一端を解明するために、piggyBacトランスポゾンベクターを用いた全ゲノム規模のshRNAライブラリー構築を行った。作成したpiggyBac shRNAライブラリーについては次世代シーケンサーを用い、数万のshRNAが無事にクローニングされていることを確認した。このpiggyBac shRNAライブラリーはウイルスを使用しないスクリーニング手法として、多能性幹細胞を含めた多くの細胞種で有用なツールとなることが期待できる。

研究成果の概要(英文)：To reveal the molecular mechanisms behind the pluripotency of ES cells and iPS cells, we constructed a piggyBac DNA transposon vector to deliver a genome-wide shRNA library into ES/iPS cells. The generated shRNA library was validated by deep sequencing, and several ten-thousand shRNAs were successfully cloned into our piggyBac vector. Our piggyBac shRNA library is a versatile tool to dissect the molecular mechanisms in pluripotent stem cells and other cell types, without the use of viral vectors.

研究分野：幹細胞遺伝子工学

キーワード：shRNAライブラリー トランスポゾンベクター 発現抑制制御

1. 研究開始当初の背景

ES 細胞や iPS 細胞といった多能性幹細胞において、レトロウイルスやレンチウイルスベクターで導入した外来遺伝子は、徐々にエピジェネティックな発現抑制を受けてしまうというサイレンシングの問題が古くから知られている。

一方で、ある生命現象に關与する遺伝子群を同定するために、全遺伝子規模の shRNA ライブラリーは強力な実験ツールとして広く用いられている。しかしながら、現状入手可能な shRNA ライブラリーは、基本的にレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターをベースとしており、ES 細胞や iPS 細胞で用いるには適していない。

Library Collection	Type	Distributor	shRNA No.	Target genes	shRNA design	Vector
Hannon-Elledge Whole Genome shRNA Library	Pooled	Open Biosystems	80,000 (Hs) 67,000 (Mm)	30,000 (Hs) 28,800 (Mm)	22 nt stem, 19 nt loop, mir30 context	pSM2 (Retro)
Decode RNAi lentiviral library	Pooled (3 tubes)	Thermo Scientific	30,000 (10,000 x3)	Annotated genes (Hs)	22 nt stem, 19 nt loop, mir30 context	pGIPZ (Lenti)
Mission LentiPlex Pooled shRNA library	Pooled (10 tubes)	Sigma-Aldrich, The RNAi Consortium	80,000 (8,000 x 10)	15,000 (Mm) 15,000 (Hs)	21 nt stem, 6 nt loop	μLKO1 (Lenti)
Netherlands Cancer Institute shRNA Library	Arrayed	DNAForm, Geneservice	24,000	8,000 (Hs)	19 nt stem, 9 nt loop	pRS (Retro)
DECIPHER shRNA Library	Pooled	Collecta, Inc.	82,500 (Hs) 55,000 (Mm)	15,377 (Hs) 9,145 (Mm)	21 nt stem, 15 nt loop	pRS19 (Lenti)
GeneNet Lentiviral shRNA Library	Pooled	System Biosciences	178,000 (Mm) 200,000 (Hs)	34,000 (Mm) 38,500 (Hs)	27 nt stem, 12 nt loop	pSIH/F (Lenti, FIV)

そこで我々は、レトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターと比べて発現抑制がかかりにくいとされる piggyBac DNA トランスポゾンベクターをベースとした shRNA ライブラリーの構築を行う事とした。

2. 研究の目的

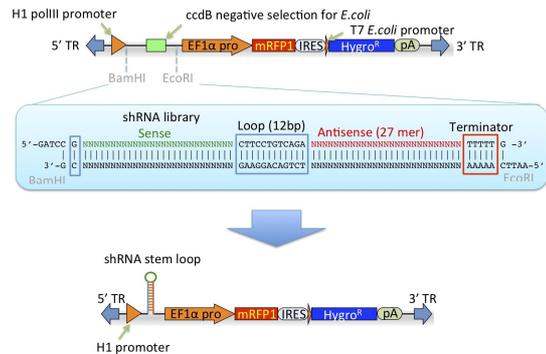
本研究の最終目標としては、トランスポゾンベクターを利用した全ゲノム規模 shRNA ライブラリーを構築し、多能性幹細胞の状態維持に大切な分子機構を明らかにすることである。多能性の維持に關与する Nanog の発現ゆらぎをターゲットとして実験を行った。

3. 研究の方法

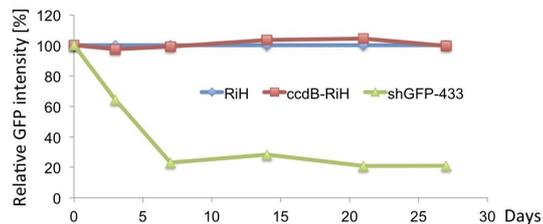
特定の生物現象に対して、多数の遺伝子の機能阻害実験を行うため、全ゲノム規模の shRNA ライブラリーの構築を行った。shRNA ライブラリーについては、市販の物が多数販売されているが、どれもレンチウイルスベクターまたはレトロウイルスベクターに搭載されている。しかし、多能性幹細胞ではウイルスベクターの感染効率および発現効率が極めて悪く、効率的な機能阻害実験は困難であった。そこで我々は、多能性幹細胞へ効率的に外来遺伝子導入ができる蛾由来の piggyBac DNA トランスポゾンベクターに着目し、GFP や mRFP1 等の蛍光タンパク質を搭載し、多能性幹細胞でも強力に働くヒト EF1a プロモーター制御化で発現させること

により、多能性幹細胞やその分化細胞においても、長期に渡って蛍光標識が可能であることを見出した。

このベクターをもとに、カニクイザル iPS 細胞やヒト iPS 細胞を GFP でラベルし、神経前駆細胞へ分化させて移植実験に使用した所、GFP 蛍光が消失することなく移植細胞



を長期に渡ってトラッキングすることが可能となった [Morizane et al., Stem Cell Reports, 2013 | Kondo et al., Stem Cell Reports, 2014]. また、piggyBac ベクターに GFP をノックダウンする shRNA を搭載し、GFP を恒常的に発現するマウス ES 細胞へ導入した所、30 日以上長期に渡って安定的に GFP のノックダウン効果が持続することを確認した。



まず、市販のレンチウイルスをベースとしたゲノム規模 shRNA ライブラリーから shRNA の部分を切り出し、我々の構築した piggyBac トランスポゾンベクターへクローニングを行った。クローニングによるバイアスを最小限とするために、PCR 増幅は行わず、ライゲーション後の大腸菌培養も、軟寒天培養を

Exp.	E.coli Clone No	shRNA No
#1	1.0 x 10 ⁴	25,637
#2	1.2 x 10 ⁵	
#3	6.9 x 10 ⁵	22,950
#4	5.0 x 10 ⁵	25,938

用いたコロニー浮遊培養を行った。また、なるべく多くの shRNA をクローニングするため、このクローニングを 4 回繰り返して行った。作製した shRNA ライブラリーを確認するために、高速シーケンサー MiSeq を用いた解析を行った。MiSeq で DNA 断片を解析するためには、ブリッジ PCR 反応を行うためのアダプターを付加する必要があるが、市販の PCR 産物へアダプター付加可能なキット (TruSeq) は、平滑末端に T 塩基を付加してアダプターをライゲーションする方式であるため、操作が煩雑であ

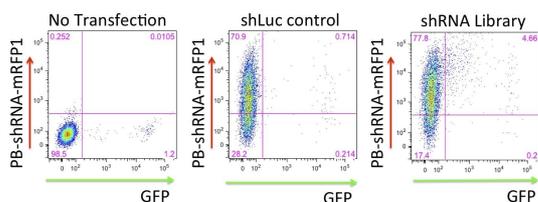
る。そこで我々は、2回のPCR反応でアダプター配列を付加する方法を確立し、shRNAの配列解析を行った。その結果、一つのshRNAライブラリー中に少なくとも2万種類以上のshRNAが含まれる事を確認した。

4. 研究成果

我々は、多能性幹細胞の維持に重要な役割を果たす Nanog 遺伝子の発現ゆらぎの分子機構を解析するために、Nanog 発現に対応して GFP を発現するマウス ES 細胞(1A2)に、作成した piggyBac shRNA ライブラリーの導入を行ったが、コントロール shRNA ベクターと比較して、顕著な差は観察されなかった。

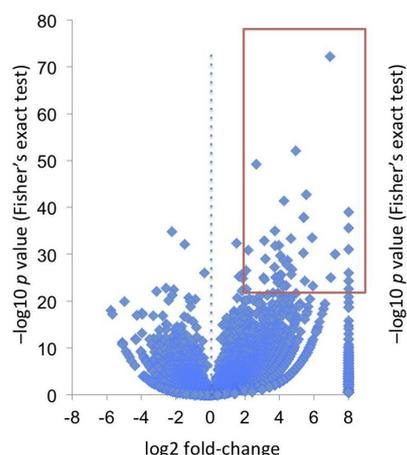
一方、多能性幹細胞の特性として外来遺伝子のサイレンシング機構がある。我々は piggyBac ベクターを用いて ES/iPS 細胞へ導入実験を行った所、長期培養条件下において、徐々に piggyBac 外来遺伝子の発現が抑制される現象を見出した。内在性トランスポゾンの発現抑制には DNA メチル化の寄与が有名であるが、*de novo* DNA メチル基転移酵素 Dnmt3a と Dnmt3b を両方欠損する ES 細胞においても発現消失が起こる事から、それ以外の抑制機構の関与が強く示唆される。

この機構を網羅的に解析する為に、GFP を発現する piggyBac が発現抑制を受けたマウス ES 細胞に上記の shRNA ライブラリーを導入してみた所、コントロール shRNA と比較して、有意な GFP の再活性化が観察された。これは、shRNA ライブラリーによって、発現抑制機構が解除されたことを示唆している。



我々は次世代シーケンサー MiSeq を用いて shRNA の配列を解析した所、一般的な抑制転写因子を含む、多数の候補因子を同定することに成功した。

Sorted shRNAs v.s. Original Library



今後、個別の候補因子について、ノックダウンと強制発現系を用いた機

能解析を行い、piggyBac ベクターをベースとした shRNA ライブラリーの有効性を確認していく予定である。

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 2件)

Morizane A, Doi D, Kikuchi T, Okita K, Hotta A, Kawasaki T, Hayashi T, Onoe H, Shiina T, Yamanaka S, Takahashi J Direct comparison of autologous and allogeneic transplantation of iPSC-derived neural cells in the brain of a nonhuman primate. Stem Cell Reports, 2013; Vol.1 (4): p283-292.

Kondo T, Funayama M, Tsukita K, Hotta A Yasuda A, Nori S, Kaneko S, Nakamura M, Takahashi R, Okano H, Yamanaka S, and Inoue H Focal transplantation of human iPSC-derived glial-rich neural progenitors improves lifespan of ALS mice. Stem Cell Reports, 2014; Vol.3 (2): p242-249.

[学会発表](計 1件)

堀田秋津、仲埜峻雄、白井紗矢、笹川典子、藤本直子、Sylvie Rival-Gervier、山本卓也、山中伸弥
トランスポゾン発現抑制を司る因子群の shRNA ライブラリーによる全ゲノム規模探索
第 35 回日本分子生物学会年会

[図書](計 1件)

堀田秋津 細胞種変換を支える遺伝子導入技術 細胞, 2014; Vol.46 (5): p220-224.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀田 秋津 (HOTTA Akitsu)

京都大学 iPS 細胞研究所・特定拠点助教

研究者番号：50578002

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：