

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670137

研究課題名(和文)体細胞初期化過程における内在性レトロトランスポゾンの役割

研究課題名(英文)The roles of endogenous retrotransposition in somatic cell reprogramming

研究代表者

山本 拓也 (Yamamoto, Takuya)

京都大学・iPS細胞研究所・助教

研究者番号：60546993

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：近年の研究により、胚発生の初期過程や神経前駆細胞において、内在性レトロトランスポゾンによるゲノムの改変が高頻度で起こっていることが示唆されている。本研究では、内在性レトロトランスポゾンによるゲノム改変が体細胞初期化過程で果たす役割を明らかにするため、Retrotransposon Capture Sequencing (RC-Seq) 法を用いて、ヒトiPS細胞におけるレトロトランスポゾンの挿入箇所をゲノムワイドに同定した。さらに、体細胞初期化過程でレトロトランスポゾンの配列を新たに獲得したゲノム上の位置を明らかにし、それらの挿入箇所と体細胞初期化の関連性を調べた。

研究成果の概要(英文)：Recent studies have demonstrated that genomic changes driven by retrotransposition could occur frequently in early embryonic development and neural progenitor cells. In this study, to elucidate contributions of retrotransposition to somatic cell reprogramming, we have identified insertion sites of retrotransposons at the genome-wide scale in human iPS cells by using Retrotransposon Capture Sequencing (RC-Seq). In addition, we found the genomic insertion sites of retrotransposons that were newly acquired during reprogramming, and examined the relationship between the insertion sites and somatic cell reprogramming.

研究分野：分子生物学

キーワード：ゲノム 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物の発生過程では、ひとつの細胞（受精卵）が増殖分化を繰り返しながら、多種多様な細胞を生み出し、一個体としての生命が誕生する。一方、終末分化した体細胞であっても少数の転写因子を導入するだけで、別の細胞へ転換できることが明らかとなった。つまり、細胞は、発生過程における一方向性の運命決定機構の中でその性質を変換させていくだけでなく、ある条件下では発生の時間軸を逆行して自身の性質を変換させるというより柔軟な可塑性を備えている。このような細胞の運命変換過程においては、転写ネットワークが再構築され、遺伝子発現プロファイルは個々の細胞特異的なものへと変換される。これらの変化は、ヒストン修飾や DNA のメチル化といったエピジェネティック修飾の変化によるものであり、もとの DNA 配列は変化しない、と考えられている。

しかしながら、近年の研究により、胚発生の初期過程や神経前駆細胞において内在性レトロトランスポゾンによるゲノムの改変が高頻度で起こっていることが示唆されている。実際、ヒトのゲノムの約半分はトランスポゾン由来の繰り返し配列であり、現在でも自律的に移動可能な内在性レトロトランスポゾンが存在することが明らかとなっている。これら内在性レトロトランスポゾンは、ゲノムの改変を行なう力を保持していることが示されており、長期的な観点からは、生命の進化に重要であると考えられている。しかしながら、細胞の運命変換過程での内在性レトロトランスポゾン役割は不明のままである。

樹立後の iPS 細胞は様々な側面から解析

が行なわれている。例えば、ゲノム DNA の変異解析により、iPS 細胞では元の由来細胞で見られない変異が少数ながら観察されており、体細胞初期化過程でゲノムへの変異が導入されることが示唆されている。しかしながら、体細胞初期化過程での内在性レトロトランスポゾンによるゲノム改変に関しては明らかにされていない。

以上より、体細胞初期化過程での内在性レトロトランスポゾンによる遺伝子変動を包括的に解析し、人工的な細胞の運命変換過程でおこるゲノムの改変およびその影響についての理解を深めようと思い、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では、体細胞初期化過程での内在性レトロトランスポゾンによるゲノム改変の包括的理解を目指し、(1) 体細胞初期化過程で内在性レトロトランスポゾンによるゲノム改変の起こる頻度と場所の特定、(2) 体細胞初期化過程で内在性レトロトランスポゾンによるゲノム改変が生じやすい時期の特定、(3) 内在性レトロトランスポゾンによるゲノムの改変が体細胞初期化に与える影響、を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

ヒトにおいて変動遺伝子として明らかになっているレトロトランスポゾン L1、Alu、SVA の完全長配列をもとに、DNA プローブを作製し、ハイブリダイゼーションによって全ゲノムからそれら配列を持つ DNA 断片を濃縮したゲノム DNA ライブラリーを精製する。それらライブラリーを次世代シーケンサーで両端から読むこと (RC-seq 法と

呼ばれる)により、レトロトランスポゾン挿入箇所をゲノムワイドに同定する。その結果をもとに、樹立した iPS 細胞クローン毎に単一細胞解析を行ない、レトロトランスポゾン挿入箇所の一致率を決定することで、体細胞初期化のどの段階でゲノムの改変が行なわれたのかを推定する。

また、レトロトランスポゾンレポーターシステムを使用することにより、初期化過程のどの段階でレトロトランスポゾンがゲノムに挿入されやすいかを解析する。レトロトランスポゾンレポーターシステムは、すでに神経細胞や HeLa 細胞等で複数の実績のあるシステムを用いる。このレポーターシステムは、ヒトで稼働遺伝子と知られている LINE1 の 3'UTR に GFP カセットが LINE1 の転写方向と逆向きに埋め込まれている。また、逆向きの GFP カセットには LINE1 の転写方向と同じ向きのイントロン配列が含まれている。LINE1 が転写された後、スプライシング、逆転写、ゲノムへの組み込みが起こり、GFP が発現するようになる。LINE1 は、内部のプロモーターによって発現が制御されるため、このレポーターコンストラクトは内在性の LINE1 と同等の働きをすると考えられている。本レポーターをヒト体細胞に導入し、体細胞初期化過程での LINE1 のゲノムへの組み込みをリアルタイムで追い、体細胞初期化過程の時期特異的マーカーと合せて観察することにより、内在性レトロトランスポゾンの活性の変化を解析する。

さらに、バイオインフォマティクス的手法を用いて、iPS 細胞でのレトロトランスポゾ

ン挿入箇所に共通性があるか、挿入により機能が変わると考えられる遺伝子に関連性があるかを調べることにより、ゲノムの改変による体細胞初期化過程における意義を明らかにし、検証する。

4 . 研究成果

ヒトにおいて変動遺伝因子として明らかになっているレトロトランスポゾン L1、Alu、SVA の完全長配列およびポジティブコントロールとして初期化因子導入のために使用しているウィルスベクターの配列をもとに DNA プローブを設計し、それら配列を持つ DNA 断片をハイブリダイゼーションによって全ゲノムから濃縮し、ゲノムライブラリーを作製した。作製したライブラリーを次世代シーケンサーで両端から読むこと(ペアエンドリード)により配列を決定し、独自に構築した解析パイプラインを用いて、iPS 細胞 2 株(201B6 株、201B7 株)とそのもとになった体細胞(HDF1388)のレトロトランスポゾン挿入箇所をゲノムワイドに同定した。まず、初期化因子導入のために使用したレトロウィルスベクターの挿入箇所に関して解析したところ、201B6 株、201B7 株においてそれぞれ 24 箇所および 25 箇所のウィルスベクター挿入箇所を同定した(図 1)。本実験において同定したウィルスベクターの挿入箇所は、別手法で同定されていた挿入箇所をすべて含んでいた。このことは、本研究の解析手法で、特定の配列のゲノムへの新規挿入箇所の同定を精度良く行なうことが可能であることを意味する。

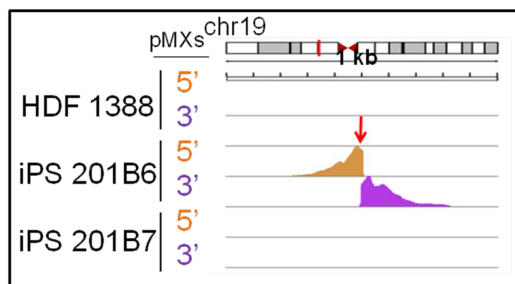


図1. 201B6株におけるウィルスベクターの挿入箇所の一例。

レトロトランスポゾンに関して、iPS 細胞株のみに存在し、もとの細胞株には存在しない挿入箇所は、201B6 株、201B7 株でそれぞれ 94 箇所 (LINE1 42 箇所、Alu 28 箇所、SVA 24 箇所) および 87 箇所 (LINE1 37 箇所、Alu 29 箇所、SVA 21 箇所) であった。これら 2 株の新規挿入箇所は一致しなかった。従って、これらの位置に挿入されたレトロトランスポゾン配列は、体細胞初期化過程で内在性のレトロトランスポゾンによるゲノムの挿入であることを示唆する。

次に、それら同定箇所の検証のため、PCR による確認を行なった。ウィルスベクターの挿入箇所やリファレンスゲノムには存在しないが、もとの細胞と 2 つの iPS 細胞株に存在する LINE 配列や SINE 配列 (RC-seq により同定) の挿入箇所は PCR で確認できたが、iPS 細胞誘導時に新たに獲得した LINE 配列および SINE 配列の挿入箇所に関しては通常の PCR では確認できなかった。このことは、iPS 細胞のごく一部の細胞のみにレトロトランスポゾンの挿入が起こっていることを示唆し、ごく一部の細胞への挿入の解析にはより精度の高い検証方法が必要であることを意味する。

さらに、新規に同定した挿入箇所についてどのような特徴があるのかを、近傍の遺伝子の機能、転写因子の結合配列、エピジェネテ

ック修飾といった観点から解析するパイプラインを構築し、関連性を調べたが、統計的有意な関連性は見いだせなかった。

また、レトロトランスポゾンレポーターシステムを用いた体細胞初期化過程におけるレトロトランスポゾンによるゲノムの改変時期を調べるシステムを構築したが、改変が生じやすい時期の特定には至らなかった。

今後は、本研究で行なった手法を用いて、レトロトランスポゾン挿入箇所の違いが、iPS 細胞株間による性質の差 (分化能力の違い等) を生み出しているのかを解析する予定である。

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)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.cira.kyoto-u.ac.jp/yamamoto/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 拓也 (YAMAMOTO TAKUYA)

京都大学 iPS 細胞研究所・助教

研究者番号：60546993

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし