

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 4 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830138

研究課題名(和文) 異種生物ゲノムを利用した新規iPS細胞化機構解析系の確立

研究課題名(英文) Development of a novel system that analyzes the mechanism of cell reprogramming using a xenospecific genomes

研究代表者

池田 隆 (Ikeda, Takashi)

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員

研究者番号：60570752

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：低分子化合物の中には細胞内の蛋白質との相互作用を介して初期化や分化に影響を与えるものが存在する。これらは初期化や分化の分子機構の解明やそれらを促進するのに有用だが、有効化合物を同定するためには、通常非常に多くの化合物を試す必要がある。本研究では、化合物の代わりに非哺乳類生物蛋白質を用いたスクリーニングが可能であるという概念の証明実験を行った。例として細菌ボルバキアに特異的な遺伝子を30個選び出し、それらを初期化因子と一緒に哺乳類細胞に導入した。すると8/30という高確率で初期化効率に影響を与える因子が同定された。今回の結果は異種生物遺伝子が様々な細胞状態の制御に利用できる可能性を示唆する。

研究成果の概要(英文)：Small molecule compounds have been identified to artificially achieve or influence cell reprogramming and differentiation through interacting with cellular proteins. Although such compounds are useful to reveal mechanisms underlying reprogramming and differentiation as well as enhancing these processes, the screening usually requires huge kinds (e.g. 50,000) of compounds. This study shows a proof-of-concept report that there are gene products that can affect efficiency of mammalian cell reprogramming in a xenospecies. I tested thirty genes specific for a bacterium Wolbachia, as a pilot trial. When they were forcedly expressed along with reprogramming factors in mammalian cells, I found that 8 Wolbachia genes affected the reprogramming efficiency. This is a surprisingly high probability compared with small molecule compounds reported. These results raise a possibility that xenospecific gene products could be useful for controls of various cellular states possibly with high hit rates.

研究分野：細胞生物学

キーワード：xenospecific protein xenospecific gene reprogramming

### 1. 研究開始当初の背景

細胞がある状態(疾患、分化など)になるための分子メカニズム研究の際、事前情報がない経路の発見には、発現/ノックダウンライブラリー、低分子化合物を使ったスクリーニングが有効である。しかし強制発現/ノックダウンでは、同時に複数の因子に影響が出てはじめて効果が見られるような場合や、分子中の部分的な機能変化が必要なケースについては発見できない。化合物によるスクリーニングはライブラリー構築の手間やコスト、「当たり」確率の低さが問題となる。

### 2. 研究の目的

異種生物遺伝子を用いた新規なスクリーニング方法により、iPS細胞化メカニズムを解析する手法を確立するために、例として細菌 *Wolbachia* の遺伝子を用い、概念の証明を行うこと。

### 3. 研究の方法

- (1) *Wolbachia* に特異的な遺伝子を *in silico* で抽出し哺乳類細胞での発現用に codon optimize した後に、それらを発現するレトロウイルスを作製する。これを N31P細胞(マウス神経前駆細胞 N31 の derivative (引地ら, 2013)) に導入する。その上でこの細胞を iPS 細胞誘導し、誘導効率を変化させるものをスクリーニングする。
- (2) 同定された *Wolbachia* 遺伝子の発現により、マウス細胞の遺伝子発現全体にどのような影響を与えたかをマイクロアレイによって調べる。
- (3) 免疫沈降・質量分析によって、*Wolbachia* 由来の有効果遺伝子産物がマウスのどの因子群と相互作用したかを調べる。

### 4. 研究成果

- (1) ゲノム比較アルゴリズム RECOG を用いて様々な細菌のゲノム全体を比較したところ、昆虫に感染するタイプの *Wolbachia* (*Wolbachia* の中にはヒトに感染できる線虫に感染するものもある) に特異的な遺伝子 30 個が同定された。これらがマウス N31P細胞の iPS 細胞誘導に影響を与えるかをスクリーニングしたところ、30 個中 8 個という高い確率で iPS 細胞化誘導効率に統計学的有意に影響を与えた。
- (2) 有効果 *Wolbachia* 遺伝子のうち、最も iPS 細胞化促進効果の高かった W20 と名付けた遺伝子(図 1)について、哺乳類細胞の遺伝子発現に対しどのような効果を持つかを調べるため、これを N31 細胞に強制発現させ、コントロール細胞とともにマイクロアレイ解析を行ったところ、W20 の発現により細胞種特異的遺伝子群の発現が選択的に抑制されていることがわかった。W20 は細胞種特異的遺伝子発現を抑制することによって iPS 細胞化を促進することが示唆される。

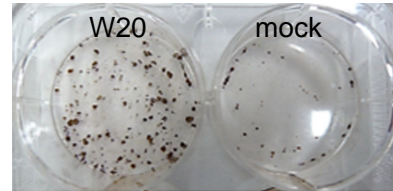


図 1. *Wolbachia* 遺伝子によるマウス細胞のリプログラミング促進

(3) さらに W20 が哺乳類細胞中でどのような分子と相互作用するのかを調べるため、3×Flag-tag 付の W20 を N31 に発現させ、Flag-tag 抗体で免疫沈降を行った後に質量分析により共沈した蛋白質を調べたところ、様々な細胞骨格関連蛋白質が多く含まれることがわかった。-アクチンをコードする遺伝子である *Actb* の発現を抑制すると、iPS 細胞化が促進される。また、-アクチンの下流にある *Srf* という転写因子は細胞種特異的遺伝子群の発現を選択的に抑制することがわかった。W20 は細胞骨格蛋白質との相互作用を通して細胞種特異性を弱めている可能性がある。

本研究の成果は、異種生物遺伝子産物の中に哺乳類細胞の細胞種 identity に影響を与えるものがあるという一例を示し、その蛋白質の簡単な機能解析を行った「概念の証明」である。この成果は、異種生物遺伝子産物を用いたスクリーニング系が、哺乳類細胞の初期化や分化のみならず、様々な細胞の状態(疾患など)のメカニズム解明や人為的制御、創薬等につながる可能性を示唆するものである。

### <引用文献>

引地貴亮、的場亮、池田隆ら. 2013. Transcription factors interfering with dedifferentiation induce cell type-specific transcriptional profiles. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110:6412-7.

### 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 0 件(未受理 2 件))

(In revision)

Takashi Ikeda, Takafusa Hikichi Hisashi Miura, Hirofumi Shibata, Kanae Mitsunaga, Knut Woltjen, Kei Miyamoto, Akira Watanabe, Takuya Yamamoto, Ichiro Hiratani Yasuhiro Yamada, Keisuke Okita, Akitsu Hotta and Shinji Masui  
“Srf destabilizes cellular identity by suppressing cell-type-specific gene expression programs”

(Submitted)  
Takashi Ikeda, Ikuo Uchiyama, Mio Iwasaki,  
Tetsuhiko Sasaki, Masato Nakagawa,  
Keisuke Okita and Shinji Masui  
“Artificial acceleration of mammalian  
cell reprogramming to pluripotency by  
bacterial proteins”

[学会発表](計 17 件)

池田隆、引地貴亮、三浦尚、平谷伊智  
朗、渡辺亮、山本拓也、山田泰広、堀  
田秋津、升井伸治

“アクチン-Srf 経路による細胞種特異  
性制御”

(第 39 回日本分子生物学会年会 横浜  
2016 年 11 月 30 日-12 月 2 日(ポスタ  
ー発表))

池田隆、菅野新一郎、内山郁夫、佐々  
木哲彦、安井明、中川誠人、升井伸治

“非モデル生物遺伝子を用いた新規分化  
状態維持メカニズム解析系の開発”

(第 68 回日本細胞生物学会大会 京都  
2016 年 6 月 15-17 日(口頭発表))

Shinji Masui, Takashi Ikeda, Akitsu  
Hotta

“-actin regulates reprogramming”

(第 14 回幹細胞シンポジウム 淡路  
2016 年 5 月 20-21 日(ポスター発表))

池田隆、内山郁夫、佐々木哲彦、升井  
伸治

“異種生物を利用した新規遺伝子機能解  
析系”

(日本動物学会第 86 回大会 新潟  
2015 年 9 月 17-19 日(口頭発表))

池田隆、引地貴亮、渡辺亮、堀田秋津、  
升井伸治

“アクチンは細胞のリプログラミングを  
制御する”

(第 67 回日本細胞生物学会大会 東京  
2015 年 6 月 30 日-7 月 2 日(口頭およ  
びポスター発表))

Takashi Ikeda, Takafusa Hikichi,

Akira Watanabe, Akitsu Hotta,  
Shinji Masui

“Actin regulates cell  
reprogramming”

(ISSCR 2015 Annual Meeting Stockholm,  
Sweden 2015 年 6 月 24-27 日(ポスタ  
ー発表))

Takashi Ikeda, Takafusa Hikichi,  
Akira Watanabe, Akitsu Hotta, Shinji  
Masui

“Actin regulates cellular  
reprogramming”

(第 13 回幹細胞シンポジウム 東京  
2015 年 5 月 29-30 日(口頭発表))

Koji Kitazawa, Takafusa Hikichi,  
Takashi Ikeda, Shinji Masui,

Takahiro Nakamura, Morio Ueno,  
Satoshi Kawasaki, Shigeru Kinoshita

“The identification of master  
transcription factors in human  
corneal epithelial cells”

(ARVO 2015 Colorado, USA 2015 年 5  
月 3-7 日)

北澤耕司、引地貴亮、池田隆、中村隆  
宏、上野盛夫、川崎諭、升井伸治、木  
下茂

“ヒト角膜上皮細胞分化を規定している  
コア転写因子”

(第 119 回日本眼科学会総会 札幌  
2015 年 4 月 16-19 日)

池田隆、内山郁夫、重信秀治、佐々木  
哲彦、升井伸治

“異種生物を利用した新規遺伝子機能解  
析系の開発”

(第 59 回日本応用動物昆虫学会大会  
山形 2015 年 3 月 26-28 日(口頭発  
表))

Takashi Ikeda, Takafusa Hikichi,  
Akira Watanabe, Akitsu Hotta,  
Shinji Masui

“ Actin regulates cell reprogramming ”

( Keystone Symposia, Scientific Conferences on Biomedical and Life Science Keystone, USA 2015年3月23-28日(ポスター発表))

Koji Kitazawa, Takafusa Hikichi, Takashi Ikeda, Takahiro Nakamura, Morio Ueno, Satoshi Kawasaki, Shinji Masui, Shigeru Kinoshita

“ Direct conversion of fibroblasts to human corneal epithelial-like cells by defined factors ”

( Asia-ARVO 2015 横浜 2015年2月16-19日 )

Takashi Ikeda, Takafusa Hikichi, Koji Kitazawa, Akira Watanabe, Akitsu Hotta, Shinji Masui

“ Actin plays an important role in cell reprogramming ”

( The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, CiRA International Symposium 吹田 2015年1月15-17日(ポスター発表))

Koji Kitazawa, Takafusa Hikichi, Takashi Ikeda, Takahiro Nakamura, Morio Ueno, Satoshi Kawasaki, Shinji Masui, Shigeru Kinoshita

“ PAX6, KLF4 and OVOL2 regulate the transcriptional profile of human corneal epithelial cells ”

( The 18th Takeda Science Foundation Symposium on Bioscience, CiRA International Symposium 吹田 2015年1月15-17日 )

池田隆、引地貴亮、北澤耕司、渡辺亮、堀田秋津、升井伸治

“ アクチンは細胞のリプログラミングを制御する ”

( 第 37 回日本分子生物学会年会 横浜

2014年11月25-27日(ポスター発表))

Takashi Ikeda, Takafusa Hikichi, Koji Kitazawa, Akira Watanabe, Akitsu Hotta, Shinji Masui

“ Actin regulates cell reprogramming ”

( 熊本医学・生物科学国際シンポジウム 熊本 2014年9月4-5日(ポスター発表))

Koji Kitazawa, Takafusa Hikichi, Takashi Ikeda, Shinji Masui, Takahiro Nakamura, Morio Ueno, Satoshi Kawasaki, Shigeru Kinoshita

“ The identification of master transcription factors in human corneal epithelial cells ”

( 熊本医学・生物科学国際シンポジウム 熊本 2014年9月4-5日 )

( プレゼンター )

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 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 :  
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  
池田 隆 ( IKEDA, Takashi )

京都大学・iPS細胞研究所・特定研究員  
研究者番号：60570752

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )