

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16149

研究課題名（和文）多能性幹細胞におけるグローバルな遺伝子発現抑制機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of global gene expression repression in pluripotent stem cells

研究代表者

田多 祐喜（Tada, Yuhki）

国立研究開発法人理化学研究所・バイオリソース研究センター・開発研究員

研究者番号：10746382

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）：申請者らはシングルセルRNA-Seq解析により、多能性幹細胞の遷移過程においてグローバルな遺伝子発現抑制現象を観測した。しかし、この現象の発生機序や生物学的意義は依然として不明である。そこで、各シングルセルの状態変化の方向を推定するRNA velocity解析や変動遺伝子解析により見出した候補分子のノックアウトマウスの解析等を実施した。その結果、グローバルな遺伝子発現抑制現象が多能性幹細胞における状態遷移の転換点となる可能性が示唆され、その際に特異的に発現上昇した分子をノックアウトすると、着床後の胚発生に影響を及ぼし胚性致死につながる可能性が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グローバルな遺伝子発現抑制機構としていくつかの現象が知られている。代表例として、メスの胚におけるX染色体不活性化、オスの精子形成過程における減数分裂期性染色体不活性化、始原生殖細胞におけるRNAポリメラーゼII依存性の転写抑制が挙げられる。これらの現象の破綻は胎生致死や不妊などの様々な異常の原因となる。したがって、グローバルな遺伝子発現の抑制は個体発生に重要な意義を持つと考えられる。申請者は新規のグローバルな遺伝子発現抑制現象を多能性幹細胞の分化遷移過程に見出し、その作用機序に関与する可能性のある候補分子を同定し、機能解析の結果、この分子が発生に重要な役割を持つことを示すことに成功した。

研究成果の概要（英文）：The applicants observed a global suppression of gene expression during pluripotent stem cell transition using single-cell RNA sequencing analysis. However, the mechanism and biological significance of this phenomenon remain unclear. Therefore, we conducted RNA velocity analysis to estimate the direction of state change of each single cell and analysis of knockout mice for the candidate molecule found by differential gene expression analysis. The results suggested that the global suppression of gene expression may be a turning point in the state transition of pluripotent stem cells, and that knockout of the molecule specifically up-regulated at that time may affect post-implantation embryonic development and lead to embryonic lethality.

研究分野：幹細胞生物学、バイオインフォマティクス、発生生物学、がん

キーワード：シングルセルRNA-seq 多能性幹細胞 分化 転写 遺伝子発現 ノックアウトマウス

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

所属研究室では、Wnt シグナルの阻害剤を用いてプライム型の EpiSC を高効率で樹立する方法を報告している(Sugimoto et al., Stem Cell Reports, 2015)。この培養技術を応用し、ナイーブ型の ES 細胞からプライム型幹細胞への転換を効率良く行う細胞変換系の確立を国内外に先駆けて成功させた。この変換過程ではエピジェネティック状態や細胞間相互作用の大規模な変動が生じると考えられるが、この重要な発生転換点における分子事象の詳細は未だ不明な点が多い。そこで、開発した系を用いて、個々の細胞における網羅的遺伝子発現解析を可能とする scRNA-Seq を実施した。さらに、変換過程で生じるランダム X 染色体不活性化 (rXCI) を観測するために、マウス亜種間交雑胚から樹立されたメス ES 細胞を樹立し、亜種間に豊富に存在する一塩基多型を利用して 2 つのアレルを識別して発現を検出する解析パイプラインを開発した。rXCI は XX であるメスと XY であるオスの間での発現量の補正を行うため、メス細胞において 2 本ある X 染色体のうちの 1 本がランダムに不活性化される現象である。rXCI は未分化細胞の分化過程で生じると考えられているので、申請者は rXCI がナイーブ-プライム転換過程解析のための良い指標になると考え、その解析を行ってきた。rXCI の開始に必須なノンコーディング RNA である *Xist* などの分子レベルの解析は進んでいるが、個々の細胞において rXCI の開始前後の細胞状態や X 連鎖遺伝子群が実際にどのように不活性化されていくかについては、シングルセルレベルの解析が必要なため、国内外を通じて詳細に解析されておらず不明な点が多く残っている。

擬似時間推定やアレル特異的発現解析による情報学的解析の結果、開発した細胞変換系において rXCI を観測し、その開始点を推定した。非常に興味深いことに、不活性化 X 染色体を持つ細胞 (ES 細胞集団中の少数の細胞や多能性状態を遷移する一部の細胞亜集団を含む) が出現する時期の細胞において、全トランスクリプトームの 3 分の 1 程度で発現量が減少する新規のグローバルな遺伝子発現抑制現象を観測した。また、t-SNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding) 法と k-means 法によるクラスター解析やクラスター間の発現変動遺伝子解析により、この細胞亜集団において rXCI の開始時に不可欠なノンコーディング RNA である *Xist* の特異的な発現上昇を確認した。これは、新規のグローバルな遺伝子発現抑制現象と rXCI の開始が関連する可能性を示している。

さらに興味深いことに、新規のグローバルな遺伝子発現抑制現象に関与する候補分子を見出した。候補分子 A は ES 細胞において転写抑制因子としての機能が知られている。RNAPol II などの分子が確率論的に転写制御領域へと結合し遺伝子発現が起こるため、遺伝子発現産物の数は時間ごとにゆらぎ、個々の細胞間での転写状態にばらつきが生じる。したがって、観測された新規の現象は一時的に転写が抑制されたために引き起こされた可能性が推測された。そのため申請者は、候補分子 A に着目した多能性幹細胞の遷移メカニズムの研究により、新たに発見したグローバルな遺伝子発現抑制現象を解明できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

亜種間交雑胚から樹立したメスの ES 細胞を用いてプライム型多能性幹細胞への分化誘導を実施し、継時的に scRNA-Seq によるアレル特異的発現解析を行い、新規のグローバルな遺伝子発現抑制現象を観測した。さらに、この現象が rXCI に関連する可能性を見出した。本研究の目的は、独自の実験系で見出した新規のグローバルな遺伝子発現抑制機構の解明である。この現象を観測した細胞亜集団の存在はシングルセル解析でのみ検出されるもので、この現象の研究の進展により、未知の発生過程におけるグローバルな発現抑制機構の解明に貢献する可能性がある。また、シングルセルレベルで細胞や組織・生体における転写状態や分化が起こる瞬間を推定する新たなツールの開発に繋がる可能性も期待され、転写状態に関連した生命現象や病態の解明に役立つと思われる。

3. 研究の方法

見出した多能性幹細胞におけるグローバルな遺伝子発現抑制現象発生時に発現上昇した候補分子 A の機能解析のため、ゲノム編集技術によってノックアウトマウスを作製した。また、観測したグローバルな遺伝子発現抑制現象が、多能性幹細胞の遷移に関与しているかを調べるために、近年開発された *velocyto*, *scVelo*, *CellRank* と呼ばれる 3 つの手法を組み合わせた RNA velocity 解析を実施した。さらに、最近報告された中間型の formative 型幹細胞 [Kinoshita et al., 2021] と我々が開発した Pre-primed 状態を示す多能性幹細胞の発現プロファイルと比較するために、パブリックデータと我々のデータを用いた統合解析を行った。

4. 研究成果

作製したノックアウトマウスの個体レベルの解析を行った。オスとメスのヘテロマウスの交配から誕生した約 50 産仔の Genotyping 解析を実施した。ホモ個体が認められなかったことから、候補分子 A のノックアウトマウスは胚性致死であると結論付けた。胚発生過程の解析により得られたホモの胚組織から RNA を得て、RT-PCR により発現レベルを調べ、ノックアウトした胚組織において当該分子が発現していないことを確認した。E14.5 における胚の Crown-rump length を測定したところ、ホモの胚がワイルドタイプやヘテロ胚に比べて有意に小さくなっていた(図 1,2)。候補分子 A がこの時期に何らかの役割を持っていると予測された。

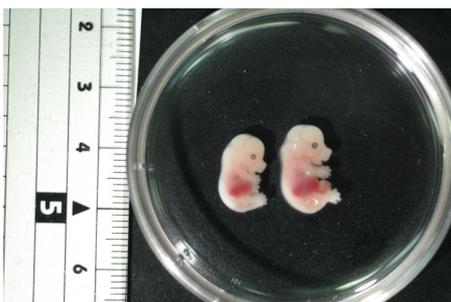


図1. E14.5胚における当該分子ノックアウトの影響
(左) ノックアウト胚 (右) 野生型

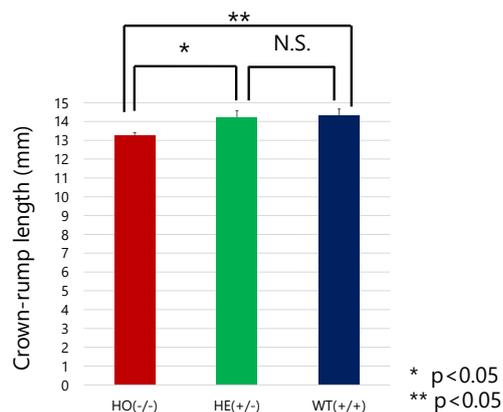


図2. 当該分子の破壊により、ホモのE14.5胚の Crown-rump lengthが野生型よりも小さくなった

RNA velocity 解析の結果、擬時間解析により推定した結果と同様の順序で、分化が進行したことが強く示された。グローバルな遺伝子発現抑制が生じた細胞集団(図 3: C3)において各シングルセルの挙動を調べると、分化が前進するものと後退するものが混在しており、この細胞集団は分化の転換点となっている可能性が示唆された(図 3,4)。

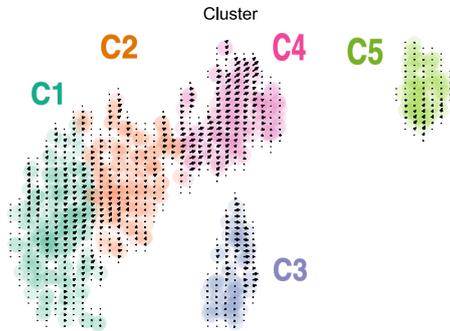


図3. 推定された各シングルセルのRNA velocity
矢印は予測された細胞軌道を示す

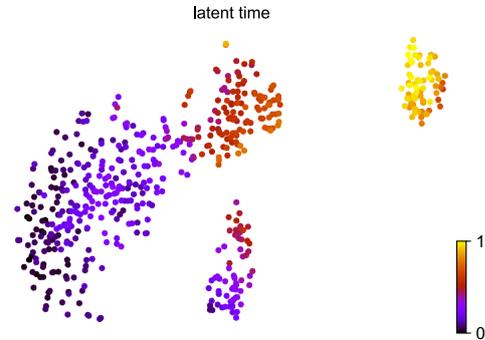


図4. Latent timeのプロットは
擬時間解析と同様の細胞状態変化を示した

ナイーブ、プライム、中間型の表現型を持つ多能性幹細胞の統合トランスクリプトーム解析の結果、既に報告されている第三の多能性幹細胞である formative 型幹細胞(図 5: 5ar1, 5ar2; 図 6B)と我々が開発した Pre-primed 状態を示す多能性細胞(図 5: MB#3P10, 1EP7; 図 6E)の遺伝子発現プロファイルが明瞭に異なっていることから、これら MB#3P10, 1EP7 細胞は、これまで知られていなかった中間型の多能性状態を有する新規の多能性幹細胞であることが明らかとなった。また、グローバルな発現抑制現象を示す細胞(図 6Dで示される細胞)には、我々の実験系で見出された Day3、Day4 細胞とこれまでプライム型に分類されていた AFX6 細胞株(Kinoshita et al., 2021)が含まれており、グローバル発現抑制現象は、我々の実験系でのみ認められる特殊な事象ではなく、より普遍的な現象である可能性が示唆された。

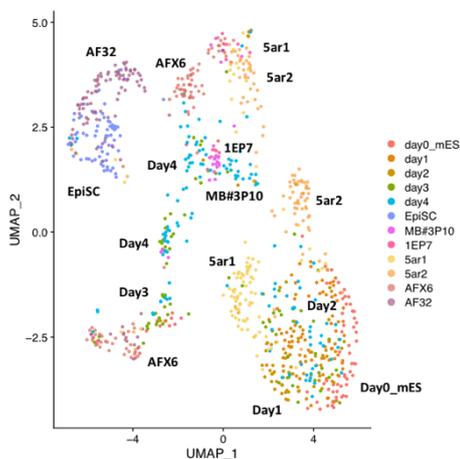


図5. 統合トランスクリプトーム解析による
各細胞の発現プロファイルのプロット

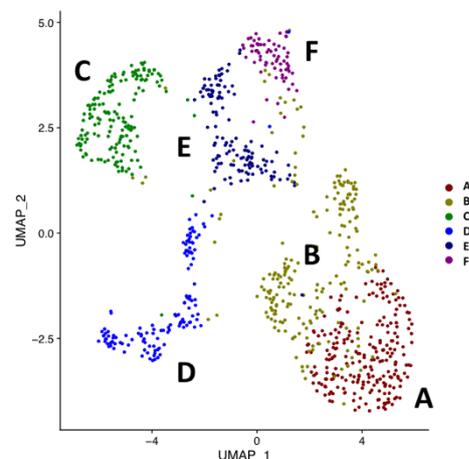


図6. 統合トランスクリプトーム解析による
各細胞の発現プロファイルのクラスタリング

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Michael Bottcher, Yuhki Tada, Jonathan Moody, Masayo Kondo, Hiroki Ura, Imad Abugessaisa, Takeya Kasukawa, Chung-Chau Hon, Koji Nagao, Piero Carninci, Kuniya Abe	4. 巻 313239
2. 論文標題 Single-cell transcriptomics, scRNA-Seq and C1 CAGE discovered distinct phases of pluripotency during naive-to-primed conversion in mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 313239-313239
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1101/2020.09.25.313239	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Michihiko Sugimoto, Yuhki Tada, Shigeyuki Shichino, Saeko Koyamatsu, Noriyuki Tsumaki, Kuniya Abe	4. 巻 29
2. 論文標題 Universal Surface Biotinylation: a simple, versatile and cost-effective sample multiplexing method for single-cell RNA-seq analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 DNA Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/dnares/dsac017	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yuhki Tada, Michihiko Sugimoto, Shigeyuki Shichino, Saeko Koyamatsu, Noriyuki Tsumaki, Kuniya Abe
2. 発表標題 Universal Surface Biotinylation (USB): A simple, versatile and cost-effective sample multiplexing method for single-cell RNA-seq analysis
3. 学会等名 シングルセルゲノミクス研究会2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yuhki Tada, Michael Bottcher, Hiroki Ura, Michihiko Sugimoto, Imad Abugessaisa, Takeya Kasukawa, Koji Nagao, Piero Carninci, Kuniya Abe
2. 発表標題 Two pre-primed pluripotent states emerged in naive-to-primed conversion process discovered by single cell analyses
3. 学会等名 36th International Mammalian Genome Conference (IMGC2023)（国際学会）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------