

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06676

研究課題名(和文) 多能性幹細胞における異なる分化状態の動的維持機構

研究課題名(英文) Dynamic maintenance mechanisms of differentiation states in pluripotent stem cells

研究代表者

山口 新平 (Yamaguchi, Shinpei)

東邦大学・理学部・講師

研究者番号：80740795

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：未分化細胞であるES細胞には、ごく少数転写因子Zscan4を発現する高い未分化性を有する2細胞期胚様細胞が存在するが、その移行メカニズムはほとんど分かっていなかった。本研究では、核小体タンパク質Pum3がこの移行に関与していることを見出した。Pum3の欠損はリボソームストレスを引き起こし、p53を活性化させていた。これらの結果から、2細胞期胚様細胞への移行にはp53の活性化が重要であることがわかった。また、クロモセーターは2細胞期胚様細胞で消失する核構造である。DNA脱メチル化関連因子Tet1とポリコムがクロモセーター構造の制御に機能していることも発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この研究はES細胞の2細胞期胚様細胞の移行メカニズムやクロモセーターの制御に関する新たな知見を提供した。この発見は再生医療や幹細胞の臨床応用に寄与するだけでなく、がんや遺伝子疾患の研究においても重要な情報となりうる。特に、ES細胞の未分化状態やゲノムの安定性に関わる分子メカニズムの解明は、がんの発生や進行における異常な細胞分化やゲノム不安定性の理解に寄与する。また、クロモセーターの制御に関する知見は、遺伝子の正確な制御やゲノムの安定性に関連し、遺伝子疾患のメカニズムや治療法の開発に向けた手がかりとなる。これらの成果は学術誌に公開済みであり、生命科学の深化に寄与すると期待している。

研究成果の概要(英文)：Embryonic stem cells (ES cells), undifferentiated cells with the capacity to differentiate into all cell types, harbor a small population of highly undifferentiated cells known as 2-cell-like cells, which express the transcription factor Zscan4. However, the mechanisms underlying their transition were largely unknown. In this study, we discovered that the nucleolar protein Pum3 is involved in this transition. Pum3 deficiency induced ribosome stress and activated p53. These findings highlight the importance of p53 activation in the transition to 2-cell-like cells. Furthermore, we identified that the chromocenter, a nuclear structure, is lost in 2-cell-like cells. We also uncovered the involvement of DNA demethylation factor Tet1 and polycomb in the regulation of chromocenter structure.

研究分野：幹細胞生物学

キーワード：2細胞期胚様細胞 ES細胞 初期胚 Zscan4 p53 Pum3 Tet1 クロモセーター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚性幹細胞 (ES 細胞) は、胚の内細胞塊から由来し、正常な核型を維持しながら三胚葉に分化する能力を長期培養下でも維持する。近年、ES 細胞は均一な細胞ではなく異なる転写パターンと分化能力を示す異なる細胞集団からなる事がわかってきた。マウス ES 細胞のごく少数 (約 1.0%) の細胞は *Zscan4* や *MuERV-L* などの 2 細胞期胚特異的遺伝子 (2C 遺伝子) を発現し、2 細胞期胚様 (2CL) 細胞と呼ばれる。2CL 細胞は高い分化能力を有しており、胚組織だけでなく胚外組織にも貢献する。2CL 状態は安定的に維持されず、2CL 細胞と非 2CL 細胞の状態を遷移している。そのため、この遷移は初期発生における胚性ゲノム活性化の分子メカニズムを研究する理想的なモデルとなりうるとして注目されていた。2CL 状態遷移の重要な誘導因子として転写因子 *Dux* が同定されていた。しかし、いずれのシグナル経路が *Dux* の活性化、そして 2CL 状態の遷移に重要なのかは未解明であった。これまでの研究から *Kdm1a/LSD1*、*G9a*、*Trim28*、*CAF1*、*Hnrnpk*、*HP1*、*Chd5*、*Rybp*、*TET* タンパク質などの欠損 ES 細胞で 2CL 細胞集団が増加することがわかっていた。しかし、これらの遺伝子のターゲットは共通ではなく多様であることから、これらの遺伝子の欠損によるストレス自体がトリガーとなっている可能性があった。

2. 研究の目的

本研究では、ES 細胞の 2CL 細胞状態への移行を制御している重要遺伝子を同定し、その遺伝子産物の分子機構を明らかにする。特に 2CL 細胞状態へのトリガーとなっている現象の同定を目指す。また、遷移に伴うエピジェネティックな現象を明らかにする。

3. 研究の方法

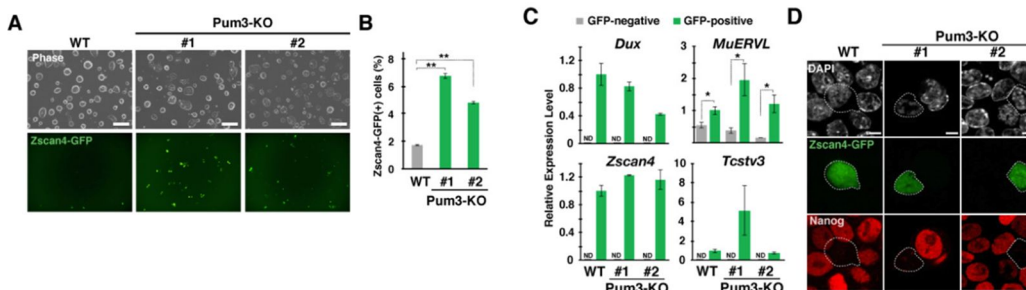
本研究では、まず 2CL 状態を可視化するために 2CL レポーター ES 細胞を樹立し、2CL 状態の誘導に關与する因子のスクリーニングを実施した。次に、同定した候補遺伝子である *Pum3* というリボソーム RNA プロセッシング因子が 2CL 状態への移行を制御する分子メカニズムの解明に焦点を当てた。本研究では、ESC を用い、遺伝子発現解析や特定の遺伝子 (*Pum3* および *p53*) の欠失などの手法を用いて、2CL 状態の誘導における役割を検討した。また、紫外線 (UV) 照射やゼオシン処理により DNA 損傷を誘導し、2CL 状態への移行に及ぼす影響を検討した。さらに、2CL 状態で消失するクロモソームの核内構造に注目した。全能性状態に近い低 DNA メチル化のモデルとして、*Dnmt1-KO* ESC (DNA メチル化酵素 1 遺伝子を欠損させた胚性幹細胞) を使用した。免疫蛍光染色、エピゲノム編集ツール、遺伝子操作などの技術を駆使して、クロモソームのクラスター化を研究した。また、顕微鏡を利用して、異なる細胞種における核構造およびクロモソーム組織の可視化および解析を行った。

4. 研究成果

研究成果は以下のとおりである。

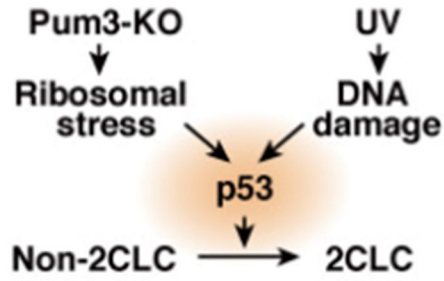
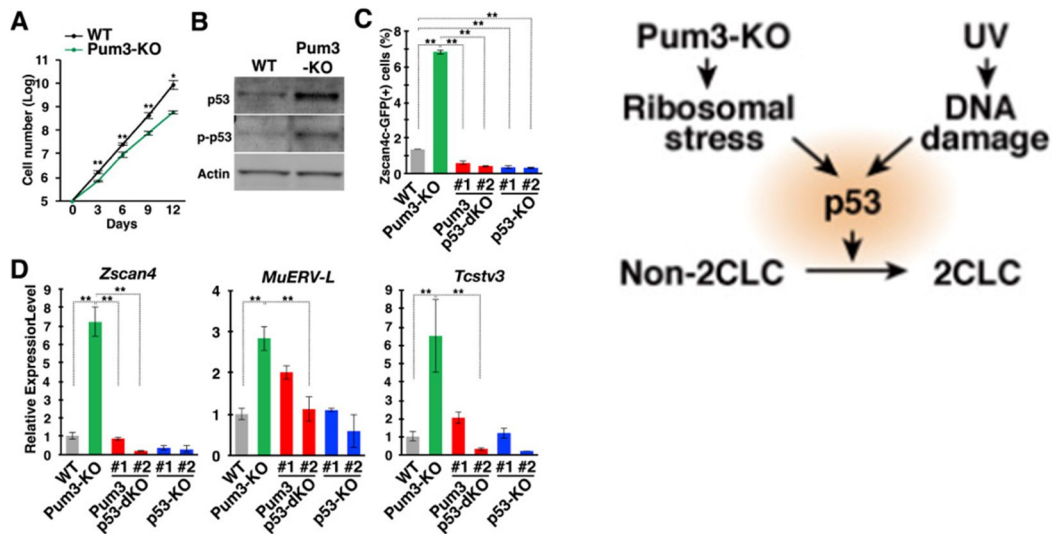
(1) 2CL 状態の誘導に關与する遺伝子として *Pum3* 遺伝子の同定。

Pum3 を欠損させた ESC (*Pum3-KO* ESC) では、2CL 状態を示す細胞集団が 4-5 倍程度増加した。これらの細胞では *Dux* や *Zscan4* などの 2CL 状態に特異的な遺伝子の発現が上昇していた。*Pum3-KO* ES 細胞で増加した 2CL 細胞は野生型の 2CL 細胞と同様に 2 細胞期胚の遺伝子を発現し、核内のヘテロクロマチンの凝集であるクロモソームが消失していた。



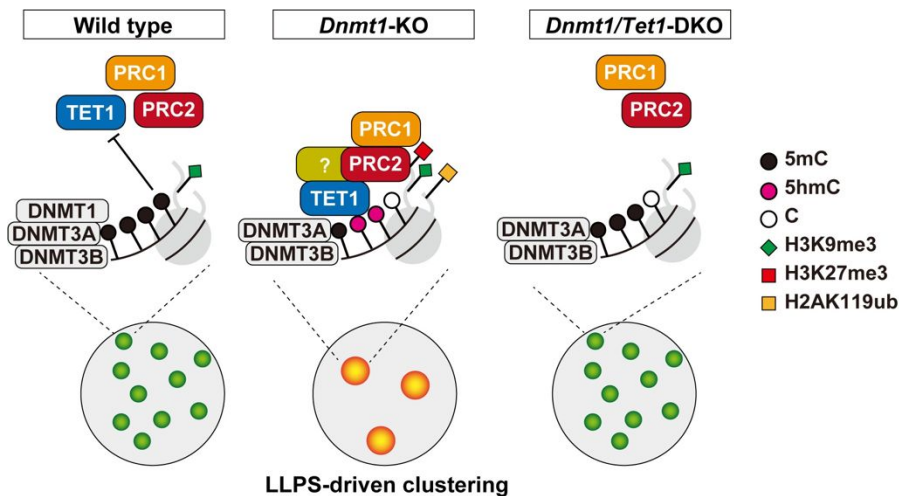
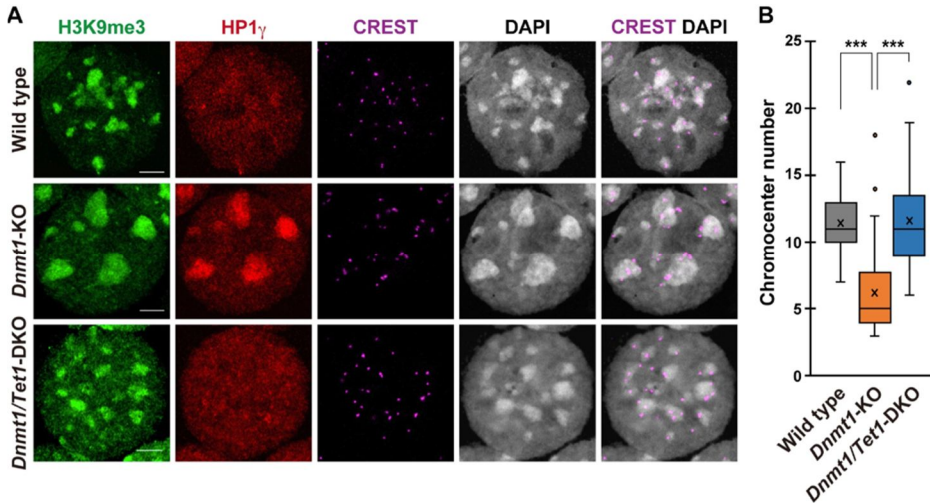
(2) *p53* 依存的な 2CL 細胞状態への移行メカニズムの解明

Pum3-KO ESCs では、プレリボソーム RNA の蓄積や *p53* タンパク質の活性化が観察された。そこで、*Pum3-KO* ESCs において *p53* 遺伝子を欠損させると、2CL 細胞は野生型と同等の水準まで現象した。このことから、*Pum3-KO* ES 細胞で生じる 2CL 状態の誘導が *p53* に依存していることが示された。更にこの結果を検証するために、紫外線処理や薬剤処理によって DNA 損傷を誘導したところ、予想通り 2CL 細胞の増加が認められた。



(3) Tet1 依存的な低メチル化 ES 細胞核のクロモセーター集合

Dnmt1 を欠損した低メチル化 ES 細胞ではクロモセーターが核内で集合 (クラスタリング) するが、この集合が Tet1 を欠損すると認められなくなり、野生型と同様の状態になることを見出した。エピゲノム編集技術を用いて Tet1 タンパク質をメジャーサテライト反復配列領域に誘導すると、予想通りクロモセーターの集合が認められた。また、ポリコム複合体の PRC1 の構成遺伝子を破壊すると、クロモセーターの集合が生じなくなることでもわかった。これらの結果から、低メチル化状態で生じるクロモセーターの集合はポリコム複合体 PRC1 を通じて生じていることがわかった。クロモセーターの集合は減数分裂に重要であることが報告されており、低メチル化状態となる始原生殖細胞で Tet1 依存的にクロモセーターが集合することが正常な生殖細胞の発生に重要であることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Maeda Takahiro, Kimura Yasuyoshi, Nakano Toru, Yamaguchi Shinpei	4. 巻 579
2. 論文標題 Ribosomal stress induces 2-cell embryo-like state transition of the mouse ESCs through p53 activation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 175 ~ 180
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2021.09.068	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Hagihara Yota, Asada Satoshi, Maeda Takahiro, Nakano Toru, Yamaguchi Shinpei	4. 巻 17
2. 論文標題 Tet1 regulates epigenetic remodeling of the pericentromeric heterochromatin and chromocenter organization in DNA hypomethylated cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009646
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009646	査読の有無 有
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 -

1. 著者名 Sheng Kit-Yeng, Nakano Toru, Yamaguchi Shinpei	4. 巻 10
2. 論文標題 A region-dependent allele-biased expression of Dopa decarboxylase in mouse brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 1078927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2022.1078927	査読の有無 有
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 萩原 遥太、仲野 徹、山口 新平
2. 発表標題 Tet1 によるペリセントロメア領域のリモデリングとクラスタリング
3. 学会等名 日本遺伝学会第93回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山口 新平
2. 発表標題 Tet1によるペリセントロメア・ヘテロクロマチンと減数分裂の制御
3. 学会等名 生殖細胞・減数分裂研究の過去・現在・未来 / 生殖細胞・減数分裂研究の最前線 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山口 新平、萩原遥太、仲野 徹
2. 発表標題 Tet1によるペリセントロメア領域のリモデリングと集合
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口 新平
2. 発表標題 Tet1によるペリセントロメア領域のエピジェネティックリモデリング
3. 学会等名 『配偶子インテグリティの構築』『全能性プログラム』合同公開シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口新平
2. 発表標題 Transition to 2 cell embryo-like state by stress-induced p53 activation in mouse ESC
3. 学会等名 第13回若手研究フォーラム (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口新平
2. 発表標題 Stress-dependent activation of p53 induces the transition to 2-cell embryo-like state of mouse ESC
3. 学会等名 新学術領域・全能性キックオフシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 新平、前田 隆寛、木村 康義、仲野 徹
2. 発表標題 p53ファミリーによるES細胞の未分化状態制御
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山口 新平、前田 隆寛、木村 康義、仲野 徹
2. 発表標題 Stress-dependent activation of p53 induces the transition to 2-cell embryo-like state of mouse ESC
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019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
---------	---------