

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06489

研究課題名(和文) SOX2によるリボソームRNA転写調節を介した分化多能性維持機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of pluripotency maintenance mechanism through regulation of ribosomal RNA transcription by SOX2.

研究代表者

中川 武弥 (NAKAGAWA, TAKEYA)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・助教

研究者番号：50363502

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)：胚性幹細胞でのリボソームRNA転写調節は細胞分化制御において重要である。我々が発見したSOX2を含む新奇タンパク質複合体はリボソームRNA転写調節領域に結合することから、リボソームRNA転写制御への関与が示唆される。我々は細胞内において複合体の構成因子であるSOX2とTBPの人工的な発現低下により、リボソームRNAの転写が減少することを明らかにした。また、SOX2とTBPが転写調節領域へ結合するには、互いに協調する必要があることを明らかにした。これらの結果から複合体が転写調節領域のゲノムDNA高次構造変換を引き起こし、リボソームRNA転写を促進するというモデルを構築した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞分化をコントロールすることによって人工的に組織や臓器を製造し、再生医療に利用することが期待されている。胚性幹細胞はあらゆる細胞に分化することが可能である多能性を有しており、この多能性維持メカニズムの理解は細胞分化の人工的制御にとって重要である。SOX2は胚性幹細胞の多能性維持に重要な転写因子である。本研究課題ではこのSOX2が担う多能性維持機構の理解を進展させることが出来た。

研究成果の概要(英文)：In embryonic stem cells, regulation of ribosomal RNA transcriptional is important in the regulation of cell differentiation. Our novel protein complex containing SOX2 binds to the regulatory region of ribosomal RNA transcription, suggesting its involvement in ribosomal RNA transcriptional regulation. We have shown that artificially decreased expression of SOX2 and TBP, components of our novel complex, results in decreased transcription of ribosomal RNA in vivo. We also found that SOX2 and TBP must cooperate with each other in order to bind to the transcriptional regulatory region. These results provide a model in which the complex causes a genomic DNA higher-order conformational change in the transcriptional regulatory region and promotes ribosomal RNA transcription.

研究分野：生化学

キーワード：細胞分化制御 リボソームRNA 遺伝子転写制御 SOX2

## 1. 研究開始当初の背景

リボソームはタンパク質合成装置であり、その多寡は細胞の活動レベルに大きな影響を与える。RNAポリメラーゼによるリボソームRNA ( rRNA ) 転写はリボソーム量、ひいてはタンパク質合成能を決定する重要なプロセスである。未分化な胚性幹細胞 ( ES細胞 ) では rRNA の転写が活発であるが、細胞分化が開始される際には rRNA の転写抑制が起こる。この転写抑制は必須であり阻害されると細胞の分化は開始されない。また、増殖の盛んな癌細胞はより多くのタンパク質合成を必要とするため、rRNA の転写が亢進されている。この癌細胞のリボソーム要求性の高さを利用したリボソーム合成阻害によるがん治療の可能性が探られている。rRNA 転写異常は癌以外の疾患でも報告されている。このようにリボソーム量の変化は分化の開始や癌化という細胞の運命を大きく転換する際に起こっている。従って rRNA 転写及びリボソーム形成制御機構の解析は、個体発生や癌の悪性化の仕組みをより深く理解するために重要である。SOX2 を含む多能性維持に関する転写因子が rDNA プロモーター近傍に結合することが報告されており、これらの転写因子が rRNA の転写を促進している可能性が考えられる。

我々は独自に ES細胞を用いて SOX2 を含む新奇タンパク質複合体を同定していた。この複合体には TBP が含まれる。TBP は基本転写因子の TFIID や SL1 のサブユニットであり、全ての RNAポリメラーゼの転写反応において非常に重要とされている。我々は、TBP が ES細胞の rDNA プロモーター近傍で SOX2 と共同在するというデータを得ていた。これは SOX2 と TBP が協調して rRNA の転写調節に関与している可能性を示唆する。すでに我々は SOX2-TBP 複合体が試験管内で rRNA 転写を促進することも確認していた ( SOX2、TBP それぞれ単体ではこの活性は見られない )。

## 2. 研究の目的

我々が独自に同定した新奇 SOX2 複合体の ES細胞における rRNA 転写制御に関する役割の解明を目指す。

特に次の3点の解明を主な目的とした。

- ( 1 ) ES細胞において、SOX2 が rRNA 転写を促進しているのか
- ( 2 ) ES細胞において、SOX2 はいかにして rRNA の転写を促進しているのか
- ( 3 ) ES細胞において、SOX2 による rRNA の転写促進は多能性維持に必要であるのか

## 3. 研究の方法

( 1 ) マウス ES細胞を用いて、SOX2 と TBP のノックダウンによる rRNA 転写への影響の解析

siRNA による SOX2 と TBP のノックダウン実験を行い、2つの発現量の低下に伴い rRNA 転写量にどのような影響が出るのか、RT-qPCR 法で定量化し解析した。

( 2 ) SOX2 と TBP ノックダウン細胞を用いての ChIP アッセイによる、複合体が標的 DNA 領域へ結合するメカニズムの解析

SOX2 または TBP をノックダウンしたマウス ES細胞を用いてそれぞれの抗体で ChIP-seq を行い、一方の発現量低下がもたらすもう一方の因子の rDNA プロモーター近傍への結合に対する影響を解析した。

( 3 ) SOX2 とヒストンタンパク質間相互作用の確認による rRNA 転写調節メカニズムの解析  
新奇 SOX2 複合体とヒストンタンパク質間の相互作用を以前に確認している。この相互作用はゲノム DNA 高次構造に対して影響を与え遺伝子転写調節に関連する可能性がある。組換えタンパク質を用いて複合体とヒストン間の直接結合を確認した。

( 4 ) rRNA 転写促進における SOX2 と TBP が直接結合した複合体形成の必要性の解析  
SOX2 と TBP 間の結合のみを阻害するが各々の本来の活性は阻害しない変異体の作製を試みた。その変異体を用いての試験管内遺伝子転写実験で rRNA 転写への影響の解析を予定していた。

( 5 ) ES細胞においての SOX2-TBP 複合体形成阻害による rRNA 転写への影響を解析  
ES細胞で CRISPR/Cas9 システムを用いて SOX2-TBP 複合体形成阻害変異体を作成し、RT-qPCR 方で rRNA 転写への影響の解析を予定していた。また、RNA-seq を行い rRNA 以外の遺伝子発現量変化の解析も予定していた。

## 4. 研究成果

( 1 ) マウス ES細胞を用いて、SOX2 新奇複合体の構成因子である SOX2 と TBP のタンパク質量を siRNA 処理により低下させた際の影響を、RT-PCR 法とクロマチン免疫沈降法 ( ChIP assay ) で解析した。

RT-PCR 法の結果から、SOX2 及び TBP のタンパク質量の減少により rRNA 転写量が減少することが明らかとなった。この結果は SOX2 複合体が細胞内において rRNA 転写を促進することを示しており、既に得られていた試験管内での遺伝子転写解析の結果と一致する。

ChIP assay で rRNA 転写調節領域への SOX2 と TBP の結合を解析した。その結果、SOX2 タンパク質量の減少により、調節領域への SOX2 の結合の低下だけでなく TBP の結合の低下がみられ

た。また、TBPタンパク質量の減少は調節領域へのSOX2の結合の低下を引き起こした。これらの結果から、SOX2とTBPは互いに協調することによってrRNA転写調節領域に結合し、rRNA転写を活性化することが示唆される。

(3) SOX2の組換えタンパク質が4種類すべてのコアヒストンと直接結合することを確認した。我々は既にSOX2複合体がゲノムDNA高次構造を変換することを試験管内の実験で明らかにしている。今回明らかにしたSOX2のヒストンとの結合が高次構造変換を引き起こし、遺伝子転写を促進するというrRNA転写調節メカニズムが示唆される。

(4) SOX2とTBPの直接結合を阻害する変異体の作製を試みたが、それぞれ単独の活性には影響を与えない結合にのみ必須の領域を同定するには至らなかった。

これまでの成果により、目的の(1)と(2)に関しては大きな進展が得られた。試験管内での実験結果と同様に、ES細胞内においてもSOX2複合体はrRNA転写を促進する事が確認できた。そしてそのメカニズムとして、SOX2が転写調節領域のヒストンと結合することによりゲノムDNA高次構造変換を引き起こし、転写を促進するというモデルを得るに至った。しかしES細胞の多能性維持に対するこの複合体の役割を確認するには至っていない。複合体形成の阻害実験が必要であり今後の課題である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yoneda Mitsuhiro, Yasui Kiyoshi, Nakagawa Takeya, Hattori Naoko, Ito Takashi	4. 巻 170
2. 論文標題 Nucleosome assembly protein 1 is a regulator of histone H1 acetylation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 763 ~ 773
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab098	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 -

1. 著者名 Higashi Miki, Ikehara Tsuyoshi, Nakagawa Takeya, Yoneda Mitsuhiro, Hattori Naoko, Ikeda Masaaki, Ito Takashi	4. 巻 171
2. 論文標題 Long noncoding RNAs transcribed downstream of the human $\gamma$ -globin locus regulate $\gamma$ -globin gene expression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 287 ~ 294
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvab130	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0件

〔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
---------	---------