

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K15714

研究課題名（和文）転写抑制補因子による多能性幹細胞の未分化制御機構

研究課題名（英文）Transcriptional corepressor-mediated regulation of pluripotency in stem cells

研究代表者

樽本 雄介（Tarumoto, Yusuke）

京都大学・ウイルス・再生医科学研究所・助教

研究者番号：70551381

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）：ヒト多能性幹細胞の未分化性の維持に重要な転写抑制補因子を遺伝学的スクリーニングによって新たに同定し、クロマチンへの結合解析やノックアウトした際の網羅的な遺伝子発現解析などを通してその因子が機能する分子機構を検討したところ、ヒト多能性幹細胞の未分化性の維持に必要な転写制御因子として知られるPRDM14と複合体を形成し、協調して遺伝子発現の制御をおこなうことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト多能性幹細胞は基礎研究から臨床応用まで幅広く利用される重要な細胞であるが、その未分化性を制御する分子機構は完全に理解されておらず、そのことがヒト多能性幹細胞の質的な不均一性とも結びついている。未分化維持に重要な新たな因子とその制御機構を見出した本研究成果は、遺伝子発現の制御に関わる複雑な調節機構の理解へと一歩近づけるものであり、基礎・応用の両面でのヒト多能性幹細胞の将来的な利用をさらに促進するものとなることが期待される。

研究成果の概要（英文）：We identified a transcriptional co-repressor that is important for maintaining undifferentiated state of human pluripotent stem cells by genetic screening, and investigated the molecular mechanism of its function through chromatin binding analysis and comprehensive gene expression analysis of the knockout of the co-repressor. Our data revealed that the co-repressor forms a complex with PRDM14, a known transcriptional regulator required for the maintenance of undifferentiated state of human pluripotent stem cells, and that they cooperate in the regulation of gene expression.

研究分野：分子生物学

キーワード：多能性幹細胞 未分化性 遺伝子発現 転写抑制補因子 スクリーニング CRISPR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒト多能性幹細胞は、細胞の分化や組織の発生などの分子機構を解明するための基礎生物学的な研究に加えて、分子病態の解析のための疾患モデルや再生医療における細胞供給源などにも用いられる重要な細胞種となっている。胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞および誘導型多能性幹 (induced pluripotent stem: iPS) 細胞の樹立とともにそれらを用いた多くの研究がこれまでに行われ、多能性・未分化性を保ったまま培養する方法が確立、改良されてきた。しかし、樹立した細胞株によって培養中の未分化状態の安定性や特定の細胞系譜への分化指向性に差があることがよく知られている。このような不均一性は、基礎研究・臨床応用において再現性や安全性などの点から問題となりうることから、その原因となる分子基盤を解明することが重要な課題である。

体細胞に複数の転写因子を導入することで多能性を獲得できることから、遺伝子発現を制御する転写ネットワークが多能性幹細胞の確立および未分化性維持に非常に重要であるが、どういった過程を経て転写ネットワークが「初期化」されるのか、また、どのように維持されているのかは明らかではない部分が多い。上述した iPS 細胞株間での表現型の違いは、体細胞を初期化する際の転写ネットワークの再構築が一樣ではなく、ある範囲の中であらつきがおこることに起因すると考えられる。実際、どの細胞系譜・分化状態の体細胞を元にして iPS 細胞を作製するかを選択や、体細胞の初期化時に引き起こされる異常によって、特にエピジェネティックな情報の違いが iPS 細胞株間の未分化性維持や特定の細胞系譜への分化能に影響を与えていることが報告されている。これらの知見は、既知の主要な転写因子群以外にも未分化性維持に大きく寄与する転写調節因子の存在を示唆しており、それらの同定とその転写調節因子を含めた制御機構の解明が必要とされていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、ヒト多能性幹細胞の未分化性の維持に重要な役割を担う因子を網羅的に同定し、それら因子の機能解析を通してヒト多能性幹細胞の未分化性が維持される分子機構の全容を解明することである。未分化細胞に特異的な遺伝子発現を指標として対象を決定するこれまでの研究とは異なり、我々はカスタムガイド RNA ライブラリを用いた CRISPR スクリーニングによる表現型を指標とした遺伝学的解析をおこない、ヒト多能性幹細胞の未分化性維持に必要な複数の候補因子をすでに同定している。本研究期間では、その候補因子の中から転写抑制補因子をコードすると予想される遺伝子 (転写抑制補因子 X とする) に着目し、ヒト多能性幹細胞の未分化性の制御における転写抑制補因子 X の機能を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

転写抑制補因子 X の機能を明らかにするため、以下の点を中心に研究を進めた。

(1) 表現型の観察

ヒト多能性幹細胞で転写抑制補因子 X をノックアウトした際にスクリーニング結果が再現できる (未分化性が失われる) か、その際に特定の細胞系譜への分化がみられるか検討する。

(2) 相互作用因子の解析

転写抑制補因子 X は DNA 結合ドメインをもたないため、他の DNA 結合タンパク質を介してクロマチンに結合すると予想された。転写抑制補因子 X のクロマチン結合領域に高頻度に現れる DNA 配列から DNA 結合タンパク質の結合モチーフを調べることで、転写抑制補因子 X のクロマチン結合に重要な相互作用因子を同定する。

(3) 標的遺伝子の解析

ヒト多能性幹細胞において転写抑制補因子 X が制御する標的遺伝子を、ノックアウトした細胞での遺伝子発現変化や転写抑制補因子 X のクロマチン結合パターンから検討する。

(4) 誘導分解系の構築

CRISPR ではノックアウト後に表現型が観察できるまでタイムラグがあり、標的タンパク質を失活させた直後の影響を観察することが難しい。そこで、CRISPR ノックイン法を用いて Auxin-inducible degron (AID) タグを転写抑制補因子 X の内在遺伝子座に挿入し、小分子化合物 (5-Ph-IAA) の添加によって転写抑制補因子 X の分解を誘導できる細胞を樹立する。この細胞を用いることで、転写抑制補因子 X を細胞内から失活させた直後の遺伝子発現やクロマチン構造への影響を観察する。

4. 研究成果

(1) Cas9 発現ヒト iPS 細胞に転写抑制補因子 X を標的とするガイド RNA を導入し、未分化性マーカーである TRA1-60 の発現を継時的に観察したところ、日数の経過とともに TRA1-60 を発現する細胞が減少していく様子が確認され、スクリーニング結果が再現された。このときの遺伝子

発現の変化を RT-qPCR で調べると、未分化性遺伝子である *POU5F1*(OCT4 をコード)や *NANOG* の発現が徐々に低下し、分化誘導に関わる *EOMES* や *OTX2* 遺伝子などの発現上昇がみられたことから、転写抑制補因子 X をノックアウトしたヒト iPS 細胞では未分化性を維持できないことが示された。ヒト iPS 細胞を通常培養する培地条件においては転写抑制補因子 X のノックアウトによって特定の細胞系譜へ偏って分化誘導される様子は調べた限りでは確認できなかった。

(2) 転写抑制補因子 X のクロマチン結合をクロマチン免疫沈降と次世代シーケンシング (ChIP-seq) によって網羅的に調べたところ、染色体上にはっきりとしたピークが確認できた。そこで、転写抑制補因子 X と相互作用する DNA 結合タンパク質を探索するため、転写抑制補因子 X の ChIP-seq から得られたピーク領域を含む配列に高頻度に見られるモチーフ配列を MEME-suite (<https://meme-suite.org/meme/>) の AME を用いて解析した。複数の DNA 結合タンパク質認識モチーフが高頻度に存在しており、中でも未分化性の維持に重要であることがすでに知られていた PRDM14 の結合モチーフが最も高頻度に見られた。ヒト ES 細胞での PRDM14 の ChIP-seq データ (Chia NU et al. Nature 2010 468, 316–320) を解析し、転写抑制補因子 X と PRDM14 のクロマチン結合パターンが高い相関を示すことを見出した (図 1A)。免疫沈降実験によって両者の結合が観察されたことから、転写抑制補因子 X と PRDM14 は相互作用し、複合体としてクロマチンに結合していることが示唆された。

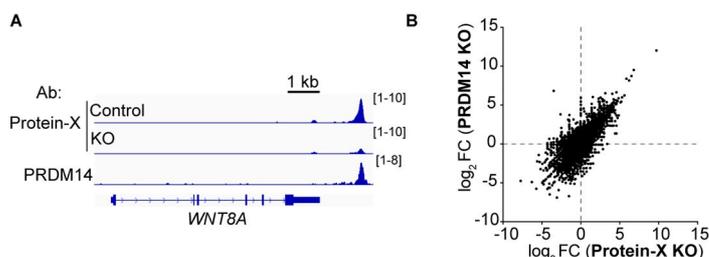


図 1. A:ヒト多能性幹細胞において転写抑制補因子 X と PRDM14 のピークが同一箇所にみられる ChIP-seq データの例。B: 転写抑制補因子 X あるいは PRDM14 ノックアウト後のヒト iPS 細胞における遺伝子発現変化の相関を示した散布図。ガイド RNA 導入後 4 日目の細胞から RNA を回収し、シーケンスした。

(3) 転写抑制補因子 X をノックアウトした際の遺伝子発現変化を RNA-seq によって網羅的に解析した。(1)での RT-qPCR の結果と一致して、未分化性維持に重要な既知遺伝子の発現低下が観察されるとともに、分化と関連のある遺伝子群の発現上昇がみられた。様々な細胞系譜への分化に関わる因子が無秩序に発現しているようなパターンを示していた。転写抑制補因子 X ノックアウトによって発現変動した遺伝子の大部分は PRDM14 ノックアウトにおいても同様の発現変動を示しており (図 1B)、転写抑制補因子 X と PRDM14 が同経路で機能していることを支持していた。これは(2)で示唆された複合体形成とも一致していた。

(4) 転写抑制補因子 X および *PRDM14* 遺伝子座の 3'末端側にインフレームで分解タグ (mAID) を挿入したヒト iPS 細胞株の樹立をおこなった。薬剤選択後にクローニングし、いくつかのクローンにおける転写抑制補因子 X および PRDM14 の発現を調べたところ、5-Ph-IAA 添加によって速やかに標的タンパク質の分解がみられるクローンをそれぞれ取得できた (図 2A)。これらの細胞を用いて分解誘導時の遺伝子発現変化を RNA-seq によって調べたところ、5-Ph-IAA 添加後 24 時間での発現変化の程度は CRISPR ノックアウト時よりも小さいものの、転写抑制補因子 X および PRDM14 の分解誘導によって共通する遺伝子群の発現変化が観察されたことから、転写抑制補因子 X と PRDM14 が同一の経路で機能することが改めて支持された。

次に、転写抑制補因子 X および PRDM14 のクロマチン結合がお互いに依存するか検討するために、まず PRDM14 を誘導分解した 6 時間後の転写抑制補因子 X のクロマチン結合を ChIP-qPCR によって調べたところ、結合が消失することがわかった (図 2B 右)。一方、転写抑制補因子 X を誘導分解した場合には 6 時間後にやや減少がみられたものの、PRDM14 のクロマチン結合が検出できた (図 2B 左)。これらの結果は、転写抑制補因子 X のクロマチン結合が PRDM14 を介しておこなわれていることを示唆している。

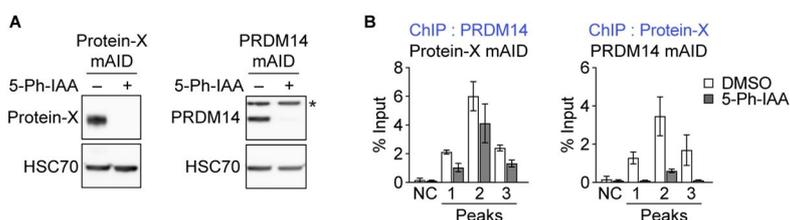


図 2. A: 転写抑制補因子 X、PRDM14 のウェスタンブロット。5-Ph-IAA 処理は 1 μ M 1 時間。HSC70 はローディングコントロール、*は非特異的シグナル。B: ChIP-qPCR。5-Ph-IAA 処理は 1 μ M 6 時間。それぞれ左側が転写抑制補因子 X mAID 細胞株、右側が PRDM14 mAID 細胞株である

以上から、転写調節補因子 X は PRDM14 と協調的に機能することで、ヒト iPS 細胞の未分化性の維持に寄与することが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yusuke Tarumoto, Katarzyna Tilgner, Bahar Mirshekar, Yoshie Masuda, Seiichi Sugino, Kosuke Yusa
2. 発表標題 Transcriptional corepressor-mediated regulation in human pluripotent stem cells
3. 学会等名 第18回幹細胞シンポジウム
4. 発表年 2021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
---------	---------