

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年4月27日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780281

研究課題名（和文） 転写活性化法による体細胞初期化促進法の開発

研究課題名（英文） The Development of acceleration of nuclear reprogramming by fusion with transactivation domain

研究代表者

谷 哲弥（TANI TETSUYA）

近畿大学・農学部・講師

研究者番号：70319763

研究成果の概要（和文）：iPS 細胞による転写因子型初期化において、Oct4 の標的領域への結合力が極めて重要であり、他の転写因子 MyoD 及び VP16 の転写活性化領域を Oct4 に付加することでその結合を強め効率的にまた均一に iPS 細胞へ初期化されることを見いだした。しかしながら体細胞核移植による卵細胞質型初期化は促進しなかった。

研究成果の概要（英文）：In this research, we found that transcription factor-base reprogramming require strong Oct4 binding to the promoter region. We succeed strong binding Oct4 promoter region and radical acceleration of mouse iPS cell production by chimeric Oct4 with transactivation domain from MyoD and VP16. However, oocyte-base reprogramming by somatic cell nuclear transfer could not accelerated by chimeric Oct4 injection into ooplasm.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：応用動物科学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学・応用動物科学

キーワード：リプログラミング、iPS 細胞、体細胞クローン、転写活性化領域

1. 研究開始当初の背景

完全に分化した体細胞を未分化な状態へと初期化できることは、体細胞核移植によるクローン動物や iPS 細胞の作出により証明された。これまで世界中でこの機構解明が展開されてきたが、未だその効率が低率であるためその分子機構を解析するのが困難な状況にある。その原因が初期化過程におけるエピジェネティックエラーが頻発するためと考えられているが不明な点も多い。これまで研究からこれらの原因を克服するために、実験に用いる体細胞の細胞腫、培養方法、小分子化合物などによりその効率は向上してきた。このことは、体細胞核のクロマチンや DNA 修

飾がリプログラミング機構に重要であることを示しているが、核心的な部分の解明は未だ不明である。

2. 研究の目的

iPS 細胞研究は、分化し安定型の体細胞型転写ネットワークから未分化な ES 細胞型にダイナミックに初期化するため転写制御を研究する上で極めて優れたシステムである。さらにこの体細胞核初期化機構には全能性を誘導できる卵細胞質型及び多能性を誘導できる転写因子型があり、その速度及び頻度の違いが存在することがわかっているが詳細に検討されていない。これらの機構を生化

学的に解析する上で、サンプル量の問題から転写因子型初期化を研究することでより詳細で確実なデータを得ることが出来る。しかしながらほとんどの細胞は、初期化されず数%の細胞群のみが初期化され iPS 細胞に変換する。そこで iPS 細胞への初期化過程において、初期化に失敗する原因を詳細に調べることで初期化を阻害する機構を解明し克服する方法を開発することで包括的な機構の解明を目的とした。また、転写因子型初期化から得られた知見を体細胞核移植にフィードバックすることで両方の初期化機構における違いを明らかにする。

3. 研究の方法

iPS 細胞への初期化過程において、初期化に失敗する原因を調べるため初期化因子を導入した体細胞における Oct4 及び Sox2 のプロモーター領域への結合状態及びクロマチンリモデリングの経時変化をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) を用いて調べた。また iPS 細胞への初期化に必要な転写因子 Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc (OSKM) の内、Oct4 は他の因子に置換できない唯一の因子であり初期化確立及び未分化転写ネットワーク構築に重要な転写因子である。そこで Oct4 の転写活性を強化する目的で様々な転写因子から転写活性化領域を融合することでキメラ転写因子を作製し、マウス iPS 細胞の作出効率に及ぼす影響を調べた。さらにこれらの結果を体細胞核移植に導入しブタ体細胞クローン胚の発生率に及ぼす影響を調べた。

4. 研究成果

iPS 細胞作出過程において、初期化に失敗する原因を探るため Oct4 と Sox2 プロモーター領域における ChIP 解析を行った。レトロウイルスベクターにより OSKM を導入後 3~9 日目のマウス胎児繊維芽細胞 (Oct4 promoter-GFP) を解析すると Oct4, Sox2, H3K4me3, H3K9ac, H3K14ac の結合は 9 日目までほとんど変化しなかった。これらの結果より、ほとんどの体細胞では体細胞初期化過程において転写因子の結合及びクロマチン構造の変化が起こらず初期化に失敗していると推測できた (図 2)。

そこでこの結合を促進することで初期化を促進できると考えた。そこで転写活性に必要な共役転写調節因子などを結合する機能

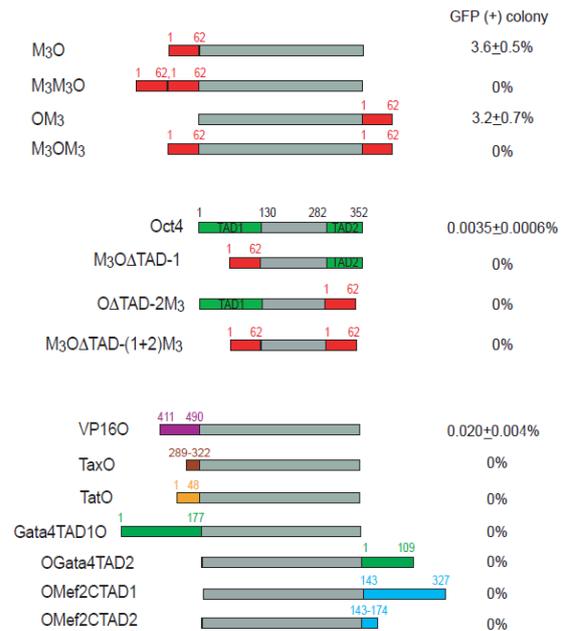


図 1. iPS 細胞の初期化効率に及ぼす転写活性化領域の影響

を持つ転写活性化領域に注目した。MyoD, VP16, Tax, Gata4, Mef2c など様々な転写因子から転写活性化領域を OCT4 に融合し、その活性を iPS 細胞の作出効率を指標にスクリーニングすると、骨格筋マスター因子 MyoD の転写活性化領域 (M3 : 1-62aa) 及びヘルペスウイルス由来 VP16 (411-490aa) の活性化領域を Oct4 に付加するだけで iPS 細胞への効率が劇的に向上するだけではなく、ほとんどのコロニーにおいて Oct4-GFP が均一に発現することや樹立の際フィーダー細胞を必要としないことを明らかにした (図 1)。

Oct4 と Sox2 のプロモーター領域に対する ChIP 解析を行うと MyoD 転写活性化領域を付与した Oct4 (M30) を導入した体細胞は、Oct4 及び Sox2 の結合が亢進していることやクロマチンのアセチル化、転写活性型メチル化 (H3K4me3) の増加、転写抑制的なメチル化 (H3K9me3, H3K27me3) の減少していることからクロマチンが開いて状態であることが明らかとなった。さらに制限酵素を用いたクロマチンアクセシビリティ解析においても確認できた (図 2)。これらの結果より、M30 はクロマチンリモデリングを促進することで閉じているクロマチンが開き、初期化されやすい状態になることで初期化が促進されたと推測できた。

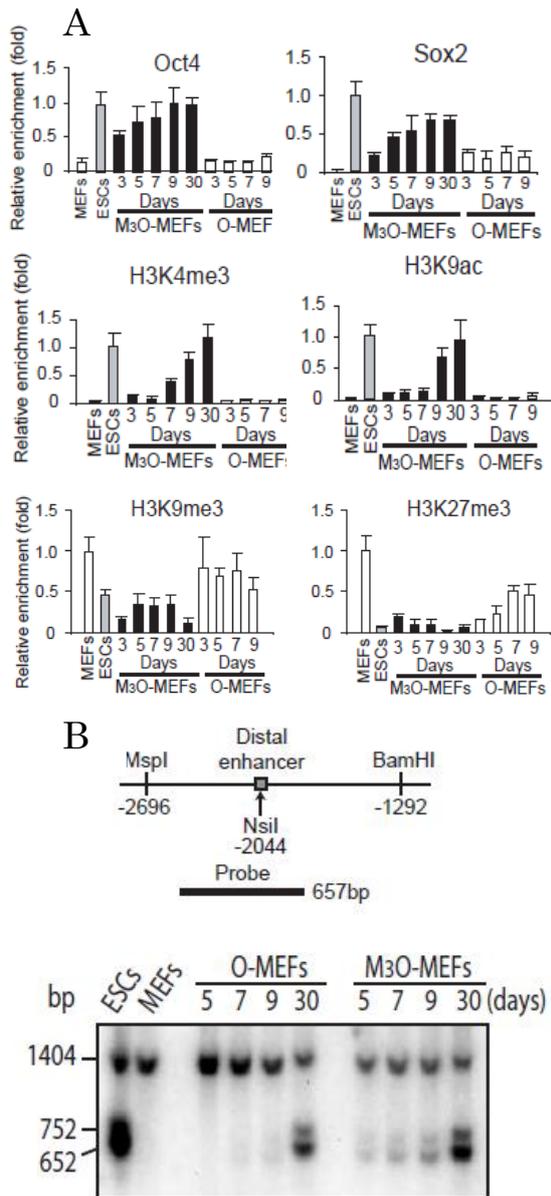


図2. (A) A 初期化過程における Oct4 プロモーター領域の ChIP 解析、(B) Oct4 プロモーター領域のクロマチンアクセシビリティ解析

そこで卵細胞質型初期化も促進できるかどうか調べるため、MyoD の転写活性化領域を付加した Oct4 の RNA を予めブタ未受精卵に強発現させた改変卵細胞質を作出し体細胞核移植に用いた。その結果、予想に反して体細胞クローン胚の発生は 4 細胞期以降完全に阻害された。

以上の結果より iPS 細胞による転写因子型初期化過程において初期化が失敗する原因が、Oct4 や Sox2 が体細胞のプロモーター領域に結合しにくいためであり、その結合を促

進させるために本研究で開発した転写活性化法は、転写因子型初期化を促進することはできるが卵細胞質型初期化を促進することができなかった。これらのことは、転写因子型及び卵細胞質初期化機構には違いがあることが示された。

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 1 件)

- ① Hiroyuki Hirai, Tetsuya Tani, Nobuko Katoku-Kikyo, Steave Kellner, Peter Karian, Meri Firpo, Nobuaki Kikyo Radical acceleration of nuclear reprogramming by chromatin remodeling with the transactivation domain of MyoD. *Stem Cells* 査読有 29(9) (2011) 1349-1361 doi: 10.1002/stem.684.

[学会発表] (計 2 件)

- ① 谷哲弥・加藤容子・角田幸雄 核リプログラミング因子強発現卵による核リプログラミング能増強の試み 第 105 回繁殖生物学会 2012 年 9 月 13 日 筑波
- ② Tetsuya Tani, Hiroyuki Hirai, Nobuko Katoku-Kikyo, Steave Kellner, Peter Karian, Meri Firpo, Nobuaki Kikyo Radical acceleration of nuclear reprogramming by chromatin remodeling with the transactivation domain of MyoD. 第 34 回分子生物学会年会 2011 年 12 月 13 日 横浜

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://nara-kindai.univ.jp/02gakka/06bi>

o/dobutsu/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷 哲弥 (TANI TETSUYA)

近畿大学・農学部・講師

研究者番号 : 70139763

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし