

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670097

研究課題名(和文) 精巣幹細胞特異的転写因子Plzfを軸とした核内3次元ゲノムネットワークの解析

研究課題名(英文) Analysis of 3D genome network based on study of male germ stem cell specific transcription factor, Plzf.

研究代表者

大保 和之(OHBO, Kazuyuki)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：70250751

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：成体の組織において、個体の一生涯組織を維持する幹細胞の特性を調べる目的で、鍵となる転写因子の、ゲノム上の結合配列の同定と、その分子がコードされている染色体の核内配置情報を相互に関連付ける研究手法の立ち上げを試みた。純化した精巣幹細胞、前駆細胞を材料に、幹細胞分化に密接に関わる遺伝子がコードされている染色体2本を可視化することに成功し、その相互の位置関係を幹細胞分化とともに観察し、また、これら遺伝子のゲノム結合配列を次世代シーケンサーで同定するシステムの構築を行う系を立ち上げることができた。

研究成果の概要(英文)：The adult stem cells maintain homeostasis by self-renewal activity. We intended to understand the stem cell specific 3D-nucleosome through the analysis of the stem cell specific key transcription factor occupancy on the genomic and chromosome localization. We purified stem cells and progenitor cells from testes, and visualized 3D-localization of two chromosomes encoding the crucial transcription factor genes that were indispensable for maintaining the stem cells. We also established the methods to unveil binding regions of the key transcription factors on the genome of the stem cells by a next generation sequencing approach in this study.

研究分野：生殖発生、幹細胞、エピジェネティクス、

キーワード：組織幹細胞 染色体 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

細胞間期の染色体の核内での配置は細胞種によって異なり、細胞種毎に特徴ある配置をとることが知られている。しかし、同じ細胞系譜で、幹細胞と、自己複製能は喪失しているが細胞増幅能や多分化能は維持している前駆細胞で、どのように染色体の位置や核内構造が異なるか、形態学的に詳細に調べられた仕事はほとんどない。我々もこれまでは、精巢の幹細胞や前駆細胞をモデルとして、幹細胞特異的に発現する分子(幹細胞マーカー)の同定と、その分子が幹細胞らしさを醸し出しているとの期待に基づいて、その分子の機能の解析に力を注いできた。しかし、これら幹細胞や前駆細胞に特異的な分子群は、それぞれ異なる染色体に位置し、異なる遺伝子発現調節領域と転写因子結合配列を持つにも関わらず、幹細胞や前駆細胞において、時間、空間的に同時に発現するように全体として調節が行われている。しかし現在のところ、このような調節はどのようなメカニズムによるものか十分に分っているとは言えない。

このような視点での解析は、実験材料となる細胞が大量に得られやすい、胎児性幹細胞株である ES 細胞や iPS 細胞、あるいは終末分化かつ不死化した細胞株を材料として行われてきたものの報告がほとんどである。これら材料を用いた次世代シーケンサーによる解析結果から、遺伝子発現の On/Off は、転写因子の発現の有無に加え、アセチル化やメチル化といったゲノム修飾とリモデリング因子の作用により、特定の染色体領域を解放(ユークロマチン化)して転写因子が下流遺伝子の発現調節領域に結合できるようにするのか、あるいは、逆に結合できないようにゲノムを閉鎖(ヘテロロマチン

化)するのか、という制御も重要な遺伝子発現調節機構の一つであることが明らかとなっている。また、発現が同時に上昇或は抑制する遺伝子群が、転写ファクトリーといわれる 3 次元的に同一の核内領域に集合して配置されていることも明らかにされている。

幹細胞は、終末分化した細胞や不死化した細胞株とは異なり、多能性を持ちながら自己複製するという特徴を持つ細胞であり、分化した細胞と大きく異なる。さらに本研究の対象である成体型組織幹細胞は、ES 細胞や iPS 細胞に代表される胎児性幹細胞株と異なり、個体の一生涯、組織補充のために限られた回数しか分裂せず、また、体内から得られる細胞数が少ないうえに、体外で増幅可能な細胞株が存在しないため、上述したような次世代シーケンサーを用いたゲノム修飾、各ゲノム領域の相互作用の解析、さらに染色体の位置関係の報告は少ないという背景は現在も変わらない。

## 2. 研究の目的

本研究では、精巢の幹細胞、前駆細胞は、他の組織幹細胞に比べ、より多くの細胞数が得られやすいことを利用して、幹細胞の維持に鍵となる転写因子の結合領域、相互作用領域の同定や、核内での細胞分化に伴う染色体の位置取りの変化を追跡する系を作ること为目标に研究を行った。

具体的には、“幹細胞に必須な遺伝子群を、時間、空間的に調和して発現させるメカニズム”の一端を明らかにすることを目的に、精巢幹細胞と、幹細胞活性を喪失した前駆細胞の 2 つの細胞集団において、幹細胞特異的転写因子 Plzf, Sall4 に着目し、ゲノムのどこに結合しているかを明らかにすることを計画した。我々

は、これまで精巣幹細胞をモデルに、精巣幹細胞と前駆細胞では DAPI foci の違い等ダイナミックな核内構造の変化が起こることを見出している。この結果から我々は、幹細胞、前駆細胞は、特徴ある細胞間期の染色体配置を持つ可能性や、また幹細胞にとって鍵となる遺伝子同士が核内で立体的に近傍に集まり、これが幹細胞、前駆細胞としての特徴ある遺伝子発現パターン、ひいては、細胞形質を作り出しているという作業仮説を立て、本研究により ”新しい核の解剖学的手法” を用いて、幹細胞の持つ自己複製の本質に迫ることを目標に本研究を遂行した。

### 3 . 研究の方法

精巣幹細胞特異的転写因子である Plzf, Sall4 が、形態学的に、精巣幹細胞の核内で、極めて近傍にあることを我々は見出していたので、これら2つの分子が結合するゲノム領域の同定を網羅的に行うことを計画した。Plzf, Sall4 の結合ゲノム領域の網羅的解析を行うためには、それぞれの分子に対するクロマチン免疫沈降が可能な特異抗体の存在が必須であるが、残念ながら、mouse Plzf や mouse Sall4 に対する定評のあるクロマチン免疫沈降用の抗体が当時（現在も）存在しなかった。そこでクロマチン免疫沈降抗体が存在するタグ付き cDNA を細胞に発現させるとともに、内在性に発現しているこれら分子をノックダウンするためのベクターの作成を計画した。タグは、クロマチン免疫沈降ばかりでなく、他の用途でも用いることができるように3種類のタグをつけ、レンチウイルスベクターを用いて cDNA を発現させるようにした。内在性に発現する Plzf と Sall4 の発現を抑制するため、siRNA を bidirectional に発現するようなベクター設計にした。293T 細胞を用いて、正しく Plzf, Sall4 が発現するか、これら分子に対する抗

体および抗タグ抗体を用いた western blotting 法により検証した。Plzf は予想される分子量と、それより低分子量の場所に2本のバンドが出現し、一部タンパク分解されていることが考えられた。いつかのタンパク分解酵素阻害剤を試したがあまり効果はなかった。しかし、全長に近い Plzf 分子の割合が十分に多いので今後の実験としては余り問題がないと思われた、

クロマチン免疫沈降したゲノム領域を、次世代シーケンサーにより網羅的に解析する場合の問題点として、ゲノム上に結合配列が少ない転写因子の場合、少ない細胞からのクロマチン免疫沈降実験の正確さが問題となる。最初は、十分な細胞数( $1 \times 10^6$  個)からのクロマチン免疫沈降実験、および、それに引き続く次世代シーケンサーを用いた解析を、ヒストン修飾 H3K4me3 をモデルに行った。DNA 破碎は、最初は Bioruptor で行っていたが、再現性ある結果が得にくかったので、Covaris に変えたところ良好な結果が得られるようになった。次に、少ない細胞( $1 \times 10^5$  個以下)からスタートできる新しい試薬を用い、同様にヒストン修飾 H3K4me3 をモデルとして、より少ない細胞からクロマチン免疫沈降の予備実験を行い、実際に次世代シーケンサーを用いて検証したところ、 $1 \times 10^6$  個以上の細胞数からスタートした場合とほぼ同じ結果が得られ、少ない細胞からも再現性が高い結果が得られるようになった。

次に、Plzf など、幹細胞、前駆細胞特異的な代表的遺伝子がコードされている染色体の核内の位置取りを観察し、幹細胞分化との相関を調べる研究を行った。核内染色体配置は、マウスの Whole の染色体用プローブを用い、Plzf がコードされている染色体 9 番 (chr9) と、c-Kit がコードされている染色体 5 番 (chr5) をモデルとして、細胞は、GFR $\alpha$ -1 陽性 c-Kit 陰性精巣幹細胞と、Ngn3 陽性 c-Kit 陽性精原前駆細胞の2つの細胞集団を、

マウス精巣からセルソーティング法により毎回集め行った。細胞の固定条件の検討、細胞を貼付けるスライドガラスのコート剤の検討、プローブのハイブリダイゼーションの条件検討を行い、MAS コートで2晩反応させる事により比較的強いシグナルを得ることができることが分った。Whole 染色体のプローブは、国内では2社から購入可能であった。最初に購入した会社のプローブは、同時に3染色体を3色で標識可能であり、幹細胞、前駆細胞それぞれに特異的な染色体の位置取りを2つの染色体について同時に比較しながら、3色目にコントロールとして共通した染色体プローブを置くことにより染色体同士の相対的位置の検証が可能であるため選択した。しかし、様々な条件を検討したもののシグナルの検出ができなかった。そこで別の会社のプローブを用いたところ、条件は大きく変えていないにもかかわらず、上記の条件でのシグナルの検出が可能であった。問題点として、セルソーターで得られたサンプルは、細胞のダメージが時に多く起こることがわかり、ダメージの少ない細胞の選択が必要であった。また、ゲノム上の数十 kbp の領域の核内配置を調べる目的で、同様に FISH 法の確立も行った。

#### 4. 研究成果

この2年間で、これまで行った経験がなかったクロマチン免疫沈降とそれに続く次世代シーケンサーを用いた網羅的解析の実験系、染色体ペインティング、DNA FISH といった新しい解析手段のプラットフォームができあがった。

これまで、Plzf, Sal14 は共焦点顕微鏡レベルの解像度で2つのシグナルが核内で重なるという程度の観察であったのが、本研究の初期段階で超解像顕微鏡により再解析し、2つの分子が核内の数カ所に集積した形の分布をとり、そのシグナルがドット状に重な

ることを確認した。この形態学的に重要な発見だけでは、具体的に Plzf と Sal14 のゲノム結合領域が同一なのか、同定される制御領域が、生物学的に幹細胞としての特性を説明できるものなのか、などといった情報が得られない。本研究で、正しいクロマチン免疫沈降実験が可能でタグ付き cDNA 発現ベクターが完成し、少量の細胞からのクロマチン免疫沈降および次世代シーケンサー解析の実験系が動き出したので、現在、GS 細胞を用いて Plzf, Sal14 の精巣幹細胞でのゲノム結合領域を明らかにする実験を遂行中である。

Chr9 (Plzf) と chr5 (c-Kit) の分布は、GFR $\alpha$ -1 陽性 c-Kit 陰性精巣幹細胞、Ngn3 陽性 c-Kit 陽性精原前駆細胞どちらも様々な分布を取っていたが、GFR $\alpha$ -1 陽性 c-Kit 陰性精巣幹細胞の方が、2つの染色体がお互いに近接している場合が多く、Ngn3 陽性 c-Kit 陽性精原前駆細胞に分化すると少し離れている場合が多くなることが明らかとなった。同じ細胞分画においても染色体の位置は変わるが、chr9 は chr5 に比べてコンパクトであり、多くの細胞において核膜周辺部に存在している傾向が強かった。また、問題点として、セルソーターを用いるため細胞のダメージがあり、シグナルが微弱な細胞も存在する。現在シグナル増強法を試しながら、得られた結果の統計的な解析を行っている。

DNA FISH 法も 30kbp 前後の fosmid をプローブとした手法での検出系が完成しつつある。これもシグナル強度を今後さらに上昇させることを試みている。

提案では、Chromosome conformation capture (3C) 法を用いて、幹細胞活性維持に重要な転写抑制性因子 Plzf を軸に、Plzf と直接、或は、これと会合する複合体タンパク質群 X を介して、幹細胞特異的に転写が抑制されている標的遺伝子群 Y (Plzf と同じ染色体、或は、異なる染色体にのっている遺伝子全て) を明らかにすることを計画したが、

この方法論は、細胞数が十分にとれないことにより、信頼できる（再現性が高い）結果が得られない可能性が高いため行えなかった。3C 解析については、より少数の細胞から再現性が高い方法論の発展を待ちたい。

今後、教室で蓄積してきた、精巣幹細胞、前駆細胞の全ゲノム DNA メチル化パターンや、遺伝子発現活性型、抑制型のヒストン修飾などの情報と重ね合わせ、幹細胞特異的に Plzf、Sall4 を軸に、これら分子の結合領域の 3 次元的核内の位置取りが、幹細胞分化でどのように変化するか解析を行う予定である。

## 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3件)

Zhou, Z., Shirakawa, T., Ohbo, K., Sada, A., Wu, Q., Hasegawa, K., Saba, R. and Saga, Y.

The RNA binding protein Nanos2 organizes a post-transcriptional buffering system to retain primitive state of mouse spermatogonial stem cells.

Dev Cell. *in press* (査読あり)

Ohbo, K. and Tomizawa, S.

Epigenetic regulation in stem cell development, cell fate conversion, and reprogramming.

Biomolecular Concepts (2014) 6:1-9. (査読あり)

DOI: 10.1515/bmc-2014-0036

Tomizawa, S., Shirakawa, T. and Ohbo, K.

Stem cell epigenetics: Insights from studies on embryonic, induced pluripotent, and germline stem cells.

Curr Pathobiol Rep (2014) 2:1-9. (査読なし)

DOI 10.1007/s40139-013-0038-3

[学会発表](計4件)

Shin-ichi Tomizawa, Takayuki Shirakawa, Andreas Dahl, Dimitra Alexopoulou, Konstantinos Anastassiadis, A. Francis Stewart, Kazuyuki Ohbo.

Role of histone methyltransferase Mll2 for male germ cell development.

Keystone Symposia, Transcriptional and Epigenetic Influences on Stem Cell State. 2015年3月26日

Steamboat Springs, Colorado, (USA)

吉田敬一郎、中島佑、尾野道男、大保和之 ゲノム修飾制御による、雄精巣幹細胞の *in vitro* 分化系の樹立の試み

第120回日本解剖学会総会・全国学術総会

2015年3月22日、神戸国際会議場(兵庫県神戸市)

富澤 信一、白川 峰征、大保 和之

核内微細形態変化とエピジェネティックな変化の精巣幹細胞分化における役割

第119回日本解剖学会総会・全国学術総会、2014年3月28日、自治医科大学キャンパス(栃木県下野市)

Takayuki Shirakawa, Michio Ono, Shinichi Tomizawa, Kazuyuki Ohbo.

Epigenetic and nuclear architecture alterations during spermatogonial stem cell differentiation in mice.

Keystone Symposia, Chromatin mechanisms and cell physiology

2014年3月25日

Oberstdorf Haus, Oberstdorf, (Germany)

[その他]

ホームページ等

<http://www-user.yokohama-cu.ac.jp/~finmorp/>

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

大保 和之 (OHBO, Kazuyuki)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：70250751

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

松本 直通 (MATSUMOTO, Naomichi)

横浜市立大学・医学研究科・教授

研究者番号：80325638