

# 研究報告書

## 「リプログラミングを制御するクロマチン因子の作用機序の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 栗崎 晃

### 1. 研究のねらい

体細胞から iPS 細胞を作り出すには長い培養時間を必要とし、その効率も低いことが問題となっている。研究者は最近、ES 細胞核の詳細なプロテオミクス解析から、特定のクロマチン因子群が多能性幹細胞で特異的に発現することを見出した。本研究では、それらのクロマチン因子群の中で、DNA の高次構造を緩めると考えられるクロマチンリモデリング様因子を利用し、リプログラミングに関わる転写因子を効果的に細胞内で働かせるための地ならしができると考えた。さらにこの作用を詳しく調べることによって、これまで未解明の iPS 細胞が作られるしくみの解明への応用も考えられる。また、このようなりモデリング様因子が成体においても機能する可能性が考えられることから、それらの発現についても検討した。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

本研究では、ES 細胞核のプロテオミクス解析で同定したクロマチン因子の中で、特に Transcriptional Intermediary Factor 1  $\beta$  (TIF1  $\beta$ ) に着目して研究を進めた。TIF1  $\beta$  は、ヘテロクロマチン形成に関与する転写抑制因子であるが、TIF1  $\beta$  の C 末がリン酸化されるとクロマチンリモデリング様活性を示すことが報告されている。TIF1  $\beta$  は ES 細胞で特異的にリン酸化されており、リン酸化に伴い未分化特異的転写因子群の発現を上昇させ、神経分化を抑制した。また、TIF1  $\beta$  をノックダウンすると ES 細胞は原始外胚葉方向へと分化した。その後の解析から、本因子が Oct3/4 と結合し、Oct3/4 依存的な転写を促進させる因子であることを明らかにした。また TIF1  $\beta$  は、iPS 細胞の樹立効率を向上させ、より安定した iPS 細胞の樹立を促進する因子であることが示唆された。今後、iPS 細胞の品質向上などの方面で応用が期待される。

#### (2) 詳細

##### 2-1. マウス ES 細胞の未分化状態維持増強活性を示すクロマチン因子 TIF1 $\beta$ の同定

マウス ES 細胞のプロテオミクス解析を行い、未分化 ES 細胞核で特異的に発現するタンパク質として同定したクロマチン因子群の中から、LIF 非存在下で未分化状態維持活性が見られる因子をスクリーニングしたところ、TIF1  $\beta$  を見出した。マウス ES 細胞で TIF1  $\beta$  を高発現すると LIF 非存在下で Nanog や SSEA1 の発現をしばらく維持できるが、TIF1  $\beta$  をノックダウンすると顕著な増殖抑制を示し、主に原始外胚葉方向へと分化した。TIF1  $\beta$  は、ヘテロクロマチン構成タンパク質 HP1 と結合してヘテロクロマチン形成を促進する転写抑制因子として知られており、また、SUMO E3 リガーゼ活性を示し、NuRD 複合体を呼び寄せてゲノムのヘテロクロマチン化を促進するコリプレッサーとして機能する。一方、TIF1  $\beta$  は C 末付近のセリン残基 (Ser824) がリン酸化されるとクロマチンリモデリング様活性を示すことが知られている。

TIF1 $\beta$  のリン酸化状態を確認したところ、未分化 ES 細胞で特異的にリン酸化されていることが確認された。

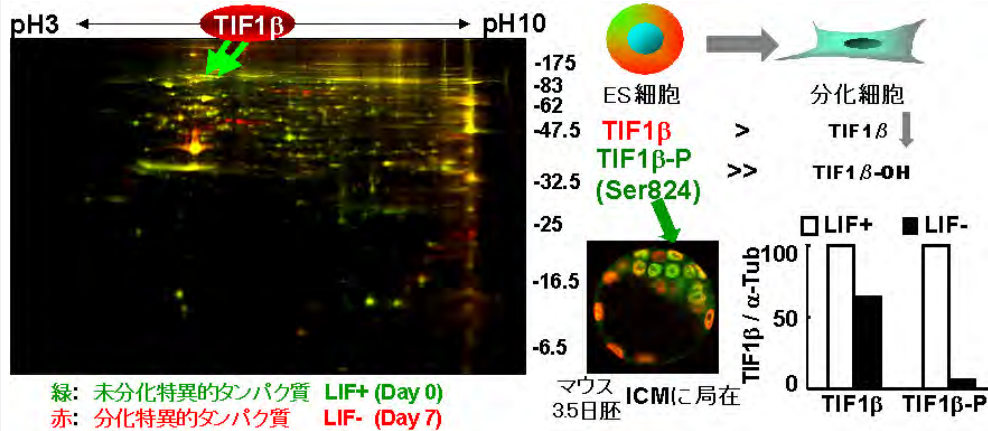


図1. 多能性幹細胞で TIF1 $\beta$  は特異的にリン酸化されている。

## 2-2. リン酸化型 TIF1 $\beta$ は iPS 細胞の樹立を促進する

リン酸化型 TIF1 $\beta$  変異体やリン酸化されない変異体を作製し、マウス ES 細胞で安定発現させるとリン酸化依存的に Nanog、Oct3/4、Sox2 などの未分化特異的転写因子群が顕著に発現上昇する一方で、リン酸化依存的に神経分化を抑制する効果が観察され、ES 細胞で TIF1 $\beta$  がリン酸化依存的に未分化状態を正に制御する結果を得た。また、Oct3/4、Sox2、Klf4、cMyc の4因子と組み合わせてリン酸化型 TIF1 $\beta$  変異体を導入すると樹立される iPS 細胞数が増加し、各種未分化細胞マーカーの発現が安定して発現するが、リン酸化されない TIF1 $\beta$  変異体を発現させるとほとんど iPS 細胞が樹立されなかった。すなわち、TIF1 $\beta$  のリン酸化は iPS 細胞の樹立過程でも重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

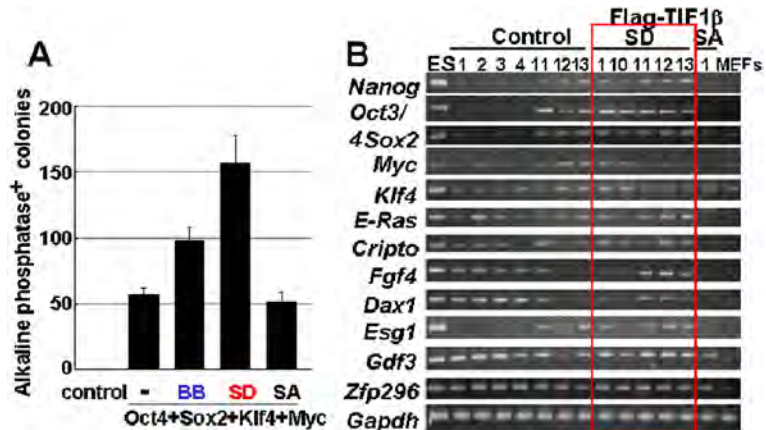


図2. リン酸化型 TIF1 $\beta$  は iPS 化を促進し、良質の iPS 細胞を樹立しやすくする。

## 2-3. リン酸化型 TIF1 $\beta$ の作用機序の解析

C末がリン酸化された TIF1 $\beta$  に対する特異的抗体で免疫蛍光染色したところ、リン酸化 TIF1 $\beta$  は核内でドット状に局在し、主に活性化クロマチンマーカーである H3K4me<sup>3</sup> や H3K9Ac 抗体で染色されるクロマチン領域と部分的に共局在していた。また、TIF1 $\beta$  をマウス ES 細胞でノックダウンするとヘテロクロマチンマーカー H3K9me<sup>3</sup> のスポット数が上昇した。TIF1 $\beta$  リン酸化変異体を安定発現させた ES 細胞から TIF1 $\beta$  と相互作用する因子を免疫沈降により検討したところ、TIF1 $\beta$  のリン酸化依存的に Oct3/4 が TIF1 $\beta$  N 末部分に結合し Nanog 近位プロモ

ーター上にOct3/4 をリクルートして転写活性化することを見出した。マイクロアレイ解析により、TIF1 $\beta$  のリン酸化依存的に変動するターゲット遺伝子を探索したところ、その約半数がOct3/4 のターゲット遺伝子であり、またSuz12、CHD9、Pcaf等のクロマチンリモデリングに関与する因子が転写活性化されることが明らかとなった。さらに、免疫沈降実験からTIF1 $\beta$  が核内でBAF複合体というクロマチンリモデリング因子群と複合体を作っていることも確認され、ES細胞ではこれらの因子との複合体として機能している可能性が考えられる。

#### 2-4. 成体におけるリン酸化型 TIF1 $\beta$ の局在

TIF1 $\beta$  は多くの組織で発現しているが、リン酸化型 TIF1 $\beta$  は精巣や卵巣など限られた組織においてのみ発現が確認された。特に精巣の免疫組織化学染色の結果、リン酸化型 TIF1 $\beta$  は精巣の精原細胞や精母細胞などでの比較的未分化な細胞で特異的な局在が観察された。

### 3. 今後の展開

iPS 細胞の樹立という体細胞のリプログラミング過程で、クロマチンリモデリング複合体を介した作用メカニズムを明らかにするとともに、成体内の未分化な組織細胞におけるリモデリング因子の意義の解明を目指す。

### 4. 自己評価

クロマチンリモデリング因子群をうまく活用することでクロマチン構造変化を強制的に引き起こし、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc などの転写因子のゲノムへのアクセスを改善し iPS 細胞の樹立過程を著しくスピードアップしうるものと当初予想していたが、これまで得られた結果は、むしろ転写因子と共同して働き、樹立された iPS 細胞がより安定化するのを早めるような効果に思える。クロマチン複合体との関係の解明はまだ道半ばであり、今後残された宿題を解決する必要がある。一方、成体におけるリン酸化型 TIF1 $\beta$  は精巣組織などの未分化な細胞で特徴的な発現を示すなど、iPS 細胞のみならず成体組織の幹細胞における意義が示唆される結果を得た。今後、成体組織で起こっているリモデリング因子の機能の解明を糸口に、成体の組織幹細胞の制御を実現する方法にも挑戦したい。また、今回多くのさきがけ研究者の仕事やアドバイザーの先生方の率直な議論から、色々と参考になる考え方を知り、自分の中でいくつもの歯車が変わった点は大きな収穫である。これからも限られた能力や資金を、さきがけをはじめとする研究者のネットワークで補いつつ、自分の研究を発展させていきたい。

### 5. 研究総括の見解

網羅的解析から分子(TIF1b)を同定し、その分子の解析を通じて現象に迫ると言う極めてオーソドックスな手法で研究をしている。TIF1b がリン酸化される事でリプログラミングに関わる事を示し、論文にまでまとめた事は、iPS 研究領域に十分な貢献を果たしたと評価する。メカニズムについては、完全に明らかになった訳ではないが、オーソドックスな解析を地道に続ける事で進展すると予想する。希望としては、新しい展開のためには、これまでとは違ったスタイルの開拓も必要ではないかと思う。オーソドックス、地道に加えて、豊かな感性とか、豊富なアイデアなどの言葉が加わった研究者になってほしい。

## 6. 主な研究成果リスト

### (1) 論文(原著論文)発表

1. Induction of differentiation of undifferentiated cells into pancreatic beta cells in vertebrates. Hosoya M, Kunisada Y, **Kurisaki A**, Asashima M. *Int J Dev Biol.*, 56(5), 313-323, 2012.
2. Nishimura Y, **Kurisaki A**, Nakanishi M, Ohnuma K, Ninomiya N, Komazaki S, Ishiura S, Asashima M. Inhibitory Smad proteins promote the differentiation of mouse embryonic stem cells into ependymal-like ciliated cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, 401(1), 1-6, 2010.
3. **Kurisaki A**, Ito Y, Onuma Y, Intoh A, Asashima M. In vitro organogenesis using multipotent cells. *Hum Cell*, 23(1), 1-14, 2010.
4. Seki Y\*, **Kurisaki A\***, Watanabe-Susaki K, Nakajima Y, Nakanishi M, Arai Y, Shiota K, Sugino H, Asashima M. TIF1beta regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 107(24), 10926-10931, 2010.

### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件

### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

1. 栗崎 晃 A novel chromatin-related factor that regulates the pluripotency of embryonic stem cells in a phosphorylation-dependent manner 第9回 日本再生医療学会総会、広島、2010年3月12日
2. 栗崎 晃 幹細胞の未分化状態や iPS 化を制御する新しいクロマチン因子 BioJapan 横浜 2010年10月1日
3. 栗崎 晃 ES 細胞の未分化性を制御する新規クロマチン関連因子 CREST/さきがけ iPS 細胞 研究領域合同シンポジウム、東京、2011年1月14日