

学内グラント 報告書

平成27年度 学内グラント終了時報告書

iPS細胞における Bivalent クロマチン構造構築の分子メカニズムの解明

研究代表者 上田 篤 (ゲノム医学研究センター)

緒 言

転写に関わるエピジェネティックな変化として、ヒストンH3のアミノ末端から4番目のリジン残基と27番目のリジン残基のメチル化は、それぞれ、転写促進と抑制に密接に関わっていることが知られており、通常、これら2種類のアミノ酸修飾は一つのタンパク質分子の中に共存することはない。但し、例外として、ES細胞及び人工多能性幹細胞(iPS細胞)では、Pax6であるとか、Pdx1遺伝子など発生・分化に関わっている遺伝子の多くがこれら2種類のヒストン修飾の両方を同時に持つことが知られている²⁾。従って、ES細胞やiPS細胞では、発生・分化に関わる遺伝子の発現に関しては、車で例えるとアクセルとブレーキが同時に施されるといった状況になる。もちろん、これらの細胞は、未分化性を保つ為、発生・分化に関わる遺伝子の発現を極力抑えることが必要であるが、にもかかわらず、発生・分化に関わる遺伝子に対して、転写抑制に関わるヒストン修飾のみならず転写促進に関わるヒストン修飾も同時に導入していることの生理的な意義は、これらの細胞がレチノイン酸などの細胞分化シグナルを受けた際にそれに対して速やかに応答することを可能にする為であると考えられている。この特殊なクロマチン構造はBivalentクロマチン構造と命名されており、ES・iPS細胞のみならず造血幹細胞・神経幹細胞等の組織幹細胞でも同定されている。但し、ES・iPS細胞においてこのBivalentクロマチン構造を構築している遺伝子の数は、組織幹細胞のそれと比べて遥かに凌駕しており、それ故、このBivalentクロマチン構造はES・iPS細胞が有する特殊な特徴の一つとして認知されている。但し、このBivalentクロマチン構造がどのような分子メカニズムで持って構築されるかに関しては全くわかっていないので、本研究ではそれを解明することを目的に研究を行った。

材 料

本研究で用いたES細胞、及びpartial iPS細胞は、私が所属している研究室で以前樹立したものをを用いた³⁾。Bivalentクロマチン構造の検出は、Hattoriらの報告¹⁾に記載されている方法に従って行った。

結 果

iPS細胞は、体を構成するあらゆる種類の細胞へと変換できる分化多能性等、ES細胞が持つ特筆すべき性質を維持する上で重要な働きをする4つの因子(Oct3/4, Sox2, Klf4, c-Myc)を皮膚細胞などの分化細胞に対して強制発現することで、ES細胞と同等の性質を有する細胞へと人工的に変換した細胞であるが、その分化細胞からiPS細胞への変換には通常2週間以上の日数を要し、また、partial iPS細胞と云って、リプログラミングが不十分な状態で安定的に留まり、それ以降のリプログラミングができない、いわゆる、不完全なiPS細胞も多く登場してしまう⁴⁾。但し、マウス細胞由来のpartial iPS細胞に関してはMAPKとGSK3 β に対する阻害剤を用いる培養条件(2i培養条件)に曝すと速やかに真のiPS細胞へと変換することが知られている⁵⁾。本研究では、まず、このpartial iPS細胞では真のiPS細胞と比べ既に十分にBivalentクロマチン構造が構築されているかを検討することにした。その為、細胞内の特定の場所で2種類の異なる抗原が近接している場合、それを検出することができるDuolink in situ PLA法⁶⁾を用いて検討することにした。但し、真のiPS細胞は、*Nanog*-GFPトランスジーンを持つ為、緑色蛍光は発し、それ故、Duolink in situ PLA法からのシグナルと区別できない為、iPS細胞の代わりにES細胞を用いた。その結果を図1Aに示すが、ES細胞では、ヒストンH3 lysine 4とlysine 27のトリメチル化の修飾が近接している為に見られると思われるシグナルを数多く検出することができた(図1A)。但し、同じ操作を当研究で樹立したpartial iPS細胞³⁾に施したところ、ES細胞の場合と同様なシグナルはいくつか検出することはできたがその数はES細胞と比べて遥かに少ないことがわかった(図1B)。partial iPS細胞は、ES細胞やiPS細胞が有する分化多能性の維持に必須なOct3/4遺伝子などの内在性の発現が見られないであるとか、レトロウイルスに対する感染防御機構が完成されていないであるとかES細胞やiPS細胞と比べていくつか重要な違いがあることが指摘されていたが、今回の研究から、partial iPS細胞はBivalentクロマチン構造の構築の度合いに関しても、ES細胞と比べて大きく劣っていることが明らかになった。

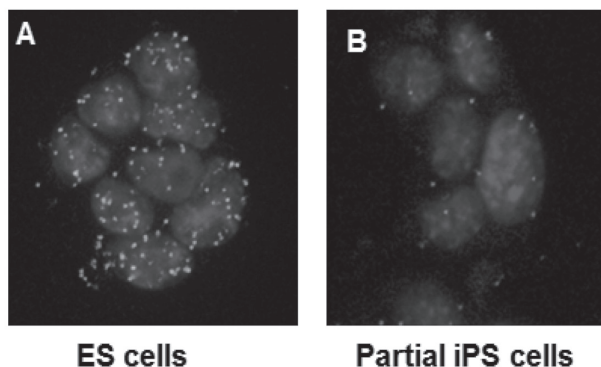


図 1. Duolink *in situ* PLA法によるES細胞 (A) 及びpartial iPS細胞 (B) におけるHistone H3K4とH3K27が近接している部分の可視化。

考 察

遺伝子の発現に対して促進と抑制という相反する現象に関わるヒストン修飾が同一箇所を導入されているBivalentクロマチン構造は、ES細胞・iPS細胞の体を構成するあらゆる種類の細胞へと分化できるという特質を根底から支える重要な構造であると考えられるが、その構造の構築の分子メカニズムに関しては全くわかっていない。私たちは本研究において、リプログラミングが不十分なpartial iPS細胞は、Bivalentクロマチン構造の構築に関してほとんど構築されていないことを示した。なお、partial iPS細胞は、2i培養条件というマウスES細胞を培養する為に新しく開発された培養条件に曝すことにより速やかに真のiPS細胞に変換することが知られているので、私たちの発見は、Bivalentクロマチン構造の構築を解析する為のプラットフォームを提供したことになると考えている。すなわち、Bivalentクロマチン構造構築に関わる可能性がある候補遺伝子をpartial iPS細胞においてノックアウトもしくはノックダウンし、その後、それらの操作を施したpartial iPS細胞を2i培養条件に曝し、それに伴ってBivalentクロマチン構造が構築されなければ、その遺伝子は、このクロマチン構造の構築に関わっていると結論できるといったスクリーニングが行えると考えられる。実際、私たちは、*Mbd3*遺伝子がBivalentクロマチン構造の構築に関わる可能性があると考え、同遺伝子をノックアウトし、2i培養条件下に曝した。しかしながら、その結果、*Mbd3*遺伝子が無くてもこのクロマチン構造の構築は影響されないことがわかった(data not shown)。このように最初のtrialからはネガティブな結果しか得られな

かったが、今後、その他の候補遺伝子についても同様な解析を行い、最終的にBivalentクロマチン構造の構築に関わる遺伝子を同定し、ひいてはこのクロマチン構造構築の分子基盤の全容を解明したいと考えている。

謝 辞

本研究を行うにあたり、同部門の平崎正孝助教・鈴木歩助教・奥田晶彦教授からの多大なご協力に深く感謝致します。

参考文献

- 1) Hattori N, Niwa T, Kimura K, Helin K, Ushijima T. Visualization of multivalent histone modification in a single cell reveals highly concerted epigenetic changes on differentiation of embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 2013; 41: 7231-9.
- 2) Bernstein BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, Jaenisch R, Wagshal A, Feil R, Schreiber SL, Lander ES. A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells. *Cell* 2006; 125: 315-26.
- 3) Kamon M, Katano M, Hiraki-Kamon K, Hishida T, Nakachi Y, Mizuno Y, Okazaki Y, Suzuki A, Hirasaki M, Ueda A, Nishimoto M, Kato H, Okuda A. Identification of Ccr4-not complex components as regulators of transition from partial to genuine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells Dev* 2014; 23: 2170-9.
- 4) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-76.
- 5) Silva J, Barrandon O, Nichols J, Kawaguchi J, Theunissen TW, Smith A. Promotion of reprogramming to ground state pluripotency by signal inhibition. *PLoS Biol* 2008; 6: e253.
- 6) Sundqvist A, Zieba A, Vasilali E, Herrera Hidalgo C, Soderberberg O, Koinuma D, Miyazono K, Heldin CH, Landegren U, Ten Dijke P, van Dam H. Specific interactions between Smad proteins and AP-1 components determine TGFbeta-induced breast cancer cell invasion. *Oncogene* 2013; 32: 3606-15.

研究成果リスト

本研究における研究成果の学会・出版物への発表はまだなされていない。