



幹細胞を制御するクロマチン因子の機能

1. はじめに

ES細胞(胚性幹細胞)は、無限の増殖能と生殖系列をも含む体の全てを構成する細胞への分化能を併せ持つ特殊な細胞であり、その能力ゆえに再生医療や創薬、安全性試験への応用などが期待されている。これまでこのような幹細胞を制御する重要なキープクターとして多くの因子が同定されてきた。特にES細胞特異的に発現する転写因子が数多く同定され、そのいくつかを組み合わせることにより人為的にES細胞に非常によく似た人工多能性幹細胞であるiPS細胞を作成可能であることが京都大学の山中教授らによって示された¹⁾。この発見はES細胞の抱える倫理的問題や免疫拒絶の問題を解決しうる画期的な発見として、幹細胞応用へのさらなる期待を引き出した。最近ではこれら重要な転写因子の役割が徐々に明らかにされ、幹細胞特異的な転写因子ネットワークが解明され始めている²⁾。

しかしながら、これで幹細胞についての多くの疑問が解決されたかといえば答えはそうではない。一般に細胞の核内では長大なゲノムDNAがヒストン複合体に規則正しく折りたたまれ、クロマチンというDNAとタンパク質の複合体として保存されており、DNAのメチル化やヒストンの修飾状態によりクロマチン構造が変化し、遺伝子の転写活性が制御されていることが知られている。興味深いことに未分化なES細胞では多くの分化細胞では見られない特徴的な核内構造が観察されている。光刺激後の蛍光回復情報を基に分子の動きを解析するFRAP(光褪色後蛍光回復法)という解析から、ES細胞ではクロマチンが弛緩し高い流動性を保持した特殊な状態となっていることが明らかにされている³⁾。幹細胞転写因子ネットワークは、このようなES細胞特異的なクロマチン構造によってダイナミッ

クにコントロールされているのだが、このクロマチン状態を制御する分子基盤はほとんど解明されていない。

これまでに、転写因子を繊維芽細胞などの分化した細胞に人為的に導入することでiPS細胞を作成する方法に加えて、ES細胞との細胞融合によって分化細胞を幹細胞へリプログラミングする方法も報告されている⁴⁾。また、それよりもずっと以前から核を除いた未受精卵に分化した細胞の核を移植することによりリプログラミングする体細胞核移植が可能であることがアフリカツメガエル⁵⁾などの数多くの動物種で実証されている。しかしながらこれらのリプログラミングのメカニズムは依然として解明が進んでいない。興味深いことに、アフリカツメガエルを用いた研究からImitation SWI (ISWI) やFrog Y-box protein 2 (FRGY2)などのクロマチン関連因子⁶⁾や特異的なリンカーヒストン⁷⁾などがこの過程に関与していることが示唆されていた。

2. クロマチン関連因子のES細胞特異的発現

我々は最近、マウスES細胞の核抽出液から、未分化状態特異的に発現するタンパク質をプロテオミクスで同定し、その中で特にクロマチン関連因子が高発現していることを報告した⁸⁾。それらの因子の中で、分化条件下で培養しても未分化な幹細胞状態を維持可能にする因子をスクリーニングしたところ、有意な活性を示す因子としてTranscriptional Intermediary Factor 1 β (TIF1 β)を見出した⁹⁾。TIF1 β は、KRAB-associated protein 1 (KAP1) やKRAB-A interacting protein 1 (KRIP-1)の別名を持ち、Tripartite domain motif 28 (Trim28)を遺伝子名として登録されている。TIF1 β はZnフィンガータンパク質やヘテロクロマチンタンパク質HP1などと結合し、ユニバーサルなコリプレッサーとして機能することが知られている。

TIF1 β を安定発現させたES細胞では、分化条件下で培養しても長期にわたって未分化マーカーであるアルカリホスファターゼ活性を示し、Octamer-binding transcription factor 4 (Oct4) やStage Specific Embryonic Antigen-1 (SSEA1)といったES細胞特異的のマーカーを発現し続けることが確認された。一方、マウスES細胞でTIF1 β をノックダウンすると細胞増殖が抑制され、団子状のコロニーを形成していた細胞の形態が一変して扁平な分化細胞へと変化する。TIF1 β のリン酸化についてはこれまでにUV等でDNA二本鎖が損傷を受けると活性化するAtaxia telangiectasia mutated protein (ATM)によりTIF1 β のC末付近の824番目のセリンが特異的にリン酸化され、このリン酸化がクロマチン構造の弛緩を引き起こすことが報告されているが¹⁰⁾、

驚いたことに ES 細胞ではこのセリンが特異的にリン酸化されており、他の分化細胞ではほとんどリン酸化されていないことに我々は気づいた。TIF1 β のリン酸化は ES 細胞が樹立されるマウス初期胚の内部細胞塊の細胞でも確認された。ES 細胞で ATM をロックダウンすると ES 細胞でも TIF1 β のリン酸化が顕著に減少し、また ES 細胞特異的な未分化マーカーの発現も低下することから、ATM は TIF1 β のリン酸化を引き起こし、ES 細胞の未分化状態を正に制御している因子のひとつと考えられる。

我々は、TIF1 β の特異的リン酸化によるクロマチン構造の弛緩が、ES 細胞特異的なクロマチンの特徴的な状況を作り出しているひとつの鍵であるとする仮説を立て、その可能性を追求するためセリンのリン酸化をアスパラギン酸で模倣した TIF1 β (S824D) 変異体とリン酸化されない変異体 TIF1 β (S824A) をそれぞれ安定発現させた ES 細胞を樹立し解析を行った。その結果、S824 のリン酸化依存的に ES 細胞の未分化状態維持作用が確認され、また、神経細胞への特異的分化条件下でもこのリン酸化型変異体 TIF1 β (S824D) を発現させた細胞は分化抵抗性を示し、未分化状態を維持する作用が観察された。通常、分化した細胞では TIF1 β はヘテロクロマチンに局在し比較的大きめの斑点状の局在が観察されるが、ES 細胞ではこのような局在は観察されず核内で均一に分布して観察される。一方、リン酸化 TIF1 β は分化した細胞では全く観察されないが、未分化な ES 細胞ではリン酸化特異的抗体を用いた免疫蛍光染色で細かいスポットとして核内で散在している様子が観察される (図 1)。このことから、ES 細胞と分化した細胞では異なる複合体を形成し別の機能を果たしていると推測された。ES 細胞では、リン酸化 TIF1 β が活性化クロマチン特異的ヒストン修飾であるヒストン H3 の N 末 4 番目のリジンのトリメチル化 (H3K4me3) やヒストン H3 の N 末 9 番目のリジンのアセチル化 (H3K9Ac) などと免疫染色実験で部分的に共局在することから、リン酸化 TIF1 β が ES 細胞で何らかの転写活性化に関与している可能性が推測された。実際に ES 細胞特異的に発現することが知られている数多くのマーカーを指標に調べてみると、TIF1 β リン酸化体を安定発現させた細胞では *Nanog* や *Sox2* といった ES 細胞特異的マーカーの発現が亢進するが、がん関連遺伝子である *c-Myc* や *E-Ras* などの遺伝子発現はリン酸化による変動がほとんど見られず、TIF1 β による遺伝子発現制御の特異性が示唆された (図 2)。マウス胎児繊維芽細胞に Oct4, Sox2, Klf4, *c-Myc* の四つの転写因子を遺伝子等で導入すると iPS 細胞を樹立することが

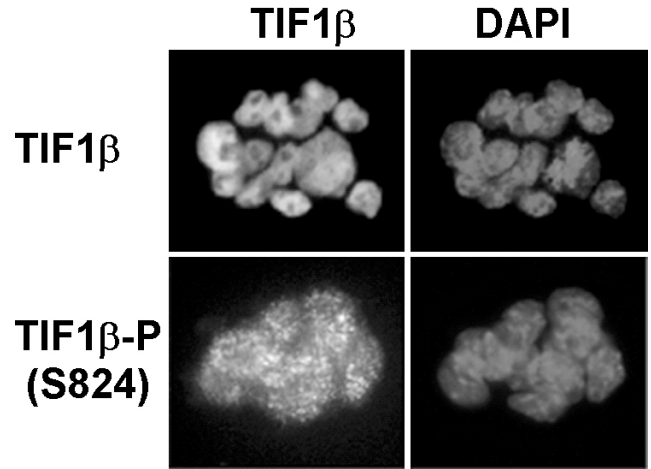


図 1 マウス ES 細胞核における TIF1 β の局在

マウス ES 細胞において、824 番目のセリンがリン酸化された TIF1 β (TIF1 β -P) の局在を、リン酸化特異的抗体を用いた免疫蛍光染色で解析した。非リン酸化体 (TIF1 β) が核内で均一に存在するのに対して、リン酸化された TIF1 β (TIF1 β -P) は特徴的な核内スポットとして観察される。

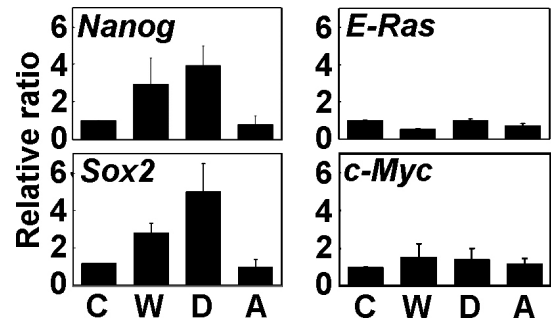


図 2 TIF1 β 変異体を発現させたマウス ES 細胞における遺伝子発現

それぞれの TIF1 β 変異体を発現させた ES 細胞における、未分化特異的遺伝子の発現。空ベクター (C) を発現させたマウス ES 細胞の遺伝子発現を 1 として相対値を示した。C: 空ベクター, W: TIF1 β (wild type), D: TIF1 β (S824D), A: TIF1 β (S824A)

可能である¹⁾。これら四つの転写因子に加えてリン酸化型 TIF1 β (S824D) を遺伝子導入すると iPS 化効率が上昇し、樹立された iPS 細胞クローンの遺伝子発現の詳細を調べると四つの転写因子で樹立された iPS 細胞よりも未分化マーカーの発現が非常に均一でより安定した iPS 細胞を樹立しうることが観察された。一方、非リン酸化型 TIF1 β (S824A) を導入すると、著しく iPS 細胞の樹立効率が減少することが確認され、さらに樹立された iPS 細胞でほとんど未分化マーカーが発現せず iPS 細胞株として長期間維持不可能であることが確認された。すなわち、TIF1 β の C 末リン酸化

状態は幹細胞へのリプログラミング効率や樹立される iPS 細胞の品質を制御する重要な作用点である可能性が示唆された。

3. TIF1 β のリン酸化依存的な ES 細胞特異的作用

我々は、TIF1 β の作用機序を探る目的で TIF1 β 結合因子を探索した結果、リン酸化依存的に TIF1 β に結合する因子として Oct4 を見出した。Oct4 はリン酸化型 TIF1 β S824D と選択的に結合するが、Sox2 は TIF1 β とは全く結合しないこと、TIF1 β のリン酸化依存的に Oct4 と協調して *Nanog* レポーターの転写を促進すること、内在性の *Nanog* 遺伝子のプロモーター領域に結合して TIF1 β のリン酸化依存的に Oct4 をリクルートする作用があることもクロマチン免疫沈降実験から確認された。さらにマイクロアレイ解析によると、Oct4 のターゲット遺伝子の 1/3 が TIF1 β のリン酸化依存的に制御されている遺伝子であることから、ES 細胞で TIF1 β がそのリン酸化状態に応じて Oct4 と協調的に作用する機構が考えられた。

最近、Ho らは、ES 細胞特異的に存在する Brg/Brahma-associated factors (esBAF) と呼ばれる SWI/SNF (Switch/Sucrose NonFermentable) タイプの ATP 依存的クロマチンリモデリング複合体が存在することを報告した¹¹⁾。彼らが見出した esBAF 複合体は Brahma-related gene (Brg1), BAF155, BAF60a 等の構成因子が含まれる 2 MDa にも及ぶ巨大な複合体である。我々の免疫沈降実験ではこれらクロマチンリモデリング複合体構成因子が TIF1 β に結合することが確認されており、ES 細胞では TIF1 β が図 3 に示したような複合体として Oct4 と協調して機能していると考えられる。

また、Singhal らは ES 細胞と細胞融合することにより繊維芽細胞の核を iPS 細胞へとリプログラミングするヘテロカリオンアッセイ法を用いて、ES 細胞と同等の iPS 化転換活性を持つ F9 細胞と活性のない NIH3T3 細胞でプロテ

オミクス解析した結果、F9 細胞で特に発現する因子としてクロマチンリモデリング因子群をピックアップした。その中でも最近重要性が示唆されていた Brg1 と BAF155 の二つの因子に着目して、上記 4 つのコア転写因子に加えて Brg1 と BAF155 を同時に繊維芽細胞に導入すると、iPS 細胞の樹立効率が上昇することを確認した。また、*Nanog* や *Oct4* などの ES 細胞特異的遺伝子群のプロモーター領域の脱メチル化が速やかに起こり、Oct4 がそのターゲットプロモーター領域により高頻度でリクルートされていることなどが観察された¹²⁾。これらの現象は我々が見出したリン酸化型 TIF1 β の引き起こす現象と類似した傾向を示していることから、これらの因子が協調して幹細胞を制御しているモデルを支持していると思われる。

4. おわりに

最近松井ら¹³⁾や Rowe ら¹⁴⁾は ES 細胞においてレトロウイルスの発現抑制に TIF1 β が関与していることを報告している。彼らの報告によると TIF1 β はヒストン H3K9 のメチル化酵素である ERG-associated protein with SET domain (ESET) をリクルートすることでヒストンテールをメチル化し、トランスポゾンに由来するいわゆる利己的な遺伝子の発現抑制を DNA メチル化非依存的に引き起こすユニークなメカニズムを報告している¹³⁾。我々の解析では上述のようにリン酸化された TIF1 β は核内でドット状に局在するが、非リン酸化 TIF1 β は核内全体に均一に観察されることから、全ての TIF1 β がリン酸化されているわけではなく一部がリン酸化されて通常の転写抑制とは異なる未分化幹細胞特異的な転写活性化作用を引き起こしていると考えられる。最近では、ポリコム群がリプログラミングに重要な役割を果たしていることが明らかにされ始めている。ポリコム群が一連の分化制御遺伝子群の発現を抑制することによってリプログラミング過程での多分化能を保障していることがわかってきた¹⁴⁾。非リン酸化型 TIF1 β に

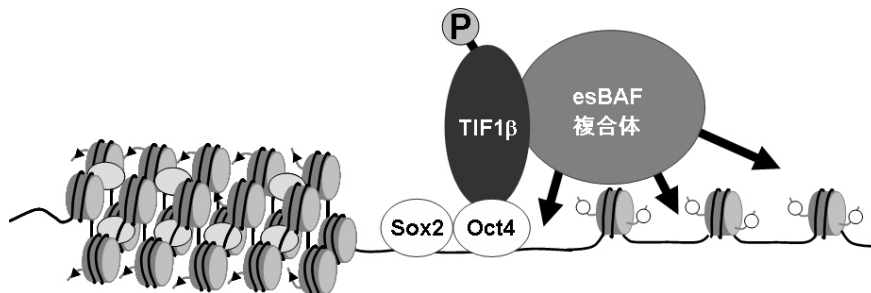


図 3 ES 細胞におけるリン酸化された TIF1 β の作用モデル

よる転写抑制作用が分化制御遺伝子群の発現の抑制という作用を及ぼしている可能性も考えられる。さらにリプログラミング過程で観察されるES細胞特異的遺伝子群のプロモーター領域の脱メチル化を引き起こす因子としてAID(活性化誘導シチジンデアミナーゼ)が必須の役割を果たしていることが最近報告された¹⁵⁾。現在はまだES細胞やiPS細胞を制御するクロマチン制御因子群の限られたパーツが見つかりはじめた状態に過ぎない。この分野の今後の研究の動向に注目したい。

謝辞

本稿で紹介した研究は産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター、東京大学総合文化研究科(浅島誠教授)、東京大学農学研究科(塩田邦郎教授)との共同研究である。関係者に感謝したい。

- 1) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, 126, 663–676.
- 2) Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., & Adachi, K. (2009) *Nature*, 460, 118–122.
- 3) Meshorer, E. & Misteli, T. (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 7, 540–546.
- 4) Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., & Eggan, K. (2005) *Science*, 309, 1369–1373.
- 5) Gurdon, J. (2009) *Nat. Med.*, 15, 1141–1144.
- 6) Kikyo, N., Wade, P.A., Guschin, D., Ge, H., & Wolffe, A.P. (2000) *Science*, 289, 2360–2362.
- 7) Jullien, J., Astrand, C., Halley-Stott, R.P., Garrett, N., & Gurdon, J.B. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 5483–5488.
- 8) Kurisaki, A., Hamazaki, T. S., Okabayashi, K., Iida, T., Nishine, T., Chonan, R., Kido, H., Tsunasawa, S., Nishimura, O., Asashima, M., & Sugino, H. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 335, 667–675.
- 9) Seki, Y., Kurisaki, A., Watanabe-Susaki, K., Nakajima, Y., Nakanishi, M., Arai, Y., Shiota, K., Sugino, H., & Asashima, M. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 107, 10926–10931.
- 10) Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D.C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., & Shiloh, Y. (2006) *Nat. Cell Biol.*, 8, 870–876.
- 11) Ho, L., Ronan, J.L., Wu, J., Staahl, B.T., Chen, L., Kuo, A., Lessard, J., Nesvizhskii, A.I., Ranish, J., & Crabtree, G.R. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 5181–5186.
- 12) Singhal, N., Graumann, J., Wu, G., Arauzo-Bravo, M.J., Han, D.W., Greber, B., Gentile, L., Mann, M., & Scholer, H.R. (2010) *Cell*, 141, 943–955.
- 13) Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I.A., Miyachi, H., Kimura, H., Tachibana, M., Lorincz, M.C., & Shinkai, Y. (2010) *Nature*, 464, 927–931.
- 14) Rowe, H.M., Jakobsson, J., Mesnard, D., Rougemont, J., Reynard, S., Aktas, T., Maillard, P.V., Layard-Liesching, H., Verp, S., Marquis, J., Spitz, F., Constam, D.B., & Trono, D. (2010) *Nature*, 463, 237–240.

- 15) Bhutani, N., Brady, J.J., Damian, M., Sacco, A., Corbel, S.Y., & Blau, H.M. (2010) *Nature*, 463, 1042–1047.

栗崎 晃

(独)産業技術総合研究所 幹細胞工学研究センター
幹細胞制御研究チーム)

A novel chromatin-related factor that regulates the pluripotency of embryonic stem cells

Akira Kurisaki (Stem Cell Differentiation Research Team, Research Center for Stem Cell Engineering, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Higashi 1-1-1, Tsukuba, Ibaraki 305-8562, Japan)

DNA修復酵素APエンドヌクレアーゼ研究から見えてきた基質認識メカニズム

1. はじめに

2010年11月段階で1,490種のゲノムがすでに明らかになっていて、現在も真正細菌で約9,000種、古細菌で約200種、真核生物で約1,600種のゲノムプロジェクトが進行している。それら生物の設計図であるゲノムDNA、すなわち全遺伝情報を含むDNAは遺伝子重複や組換え、様々な突然変異などの変化を絶えず受けてきている。DNAは熱、紫外線、放射線、化学物質、活性酸素などの様々な内的および外的要因のストレスに曝されていて、DNAには常に損傷や複製エラーが生じている。これらDNAの傷が修復されずにDNAに蓄積されると、それらは細胞死やがん化、老化などの原因となる。ヒトの場合、1日に細胞あたり約7万個の傷がDNAに生じ、そのうち核酸塩基が失われてできるAP (apurinic/aprimidinic) 部位は1万個あるといわれている。体全体では1日に約500京個のダメージである。しかし、これら損傷のほとんどはいろいろなDNA修復酵素によって、確実に修復されている。DNA以外の生体高分子は化学的ダメージを受けたり、機能を失ったりした場合には分解されて破棄されるか、あるいは再び生体材料になれば良いが、遺伝情報を担っているDNAはそういうわけにはいかない。生体高分子の中でDNAだけは傷ついても修復される特異な生体物質である。DNA修復酵素は損傷部位があると、間違いなく結合して、働かなくてはならない。従って、DNA修復酵素の基質認識機構は巧妙で、厳密であると思われる。本稿では特に塩基脱落部位に働くAPエンドヌクレアーゼについて、筆者