

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 21 日現在

機関番号：13301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790274

研究課題名(和文) Baf53aとOct3/4を介したES細胞の自己複製制御機構の解析

研究課題名(英文) Investigation of Baf53a and Oct3/4 in the self-renewal of ES cells

研究代表者

赤木 紀之 (AKAGI, TADAYUKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70532183

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：ES細胞の自己複製は、転写因子による制御が深く関わっている。本研究では、転写因子Oct3/4とクロマチン・リモデリング因子Baf53aの相関を解析した。Baf53aは未分化なES細胞に強く発現し、Oct3/4の発現停止数日後に発現が減少した。また、Baf53aはOct3/4のPOUドメインに相互作用していた。RNAiによるBaf53aの機能阻害実験から、Baf53aはES細胞の増殖能と、ヒストンH4のアセチル化に関与していることを見出した。以上からBaf53aはOct3/4と連携してES細胞の増殖能やエピゲノム状態維持に関わっていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Several transcription factors are involved in the self-renewal of ES cells. In the present study, I examined relationships between Oct3/4 (transcription factor) and Baf53a (chromatin remodeling factor). Baf53a mRNA expressed in the undifferentiated ES cells, and decreased after Oct3/4 repression. Also, Baf53a associated with the POU domain of Oct3/4. Loss of function experiment of Baf53a by RNAi revealed that Baf53a was involved in proliferation and acetylation of histon H4. Taken together, these results suggest that Baf53a, together with Oct3/4, is involved in proliferation and epigenomic maintenance of ES cells.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：Baf53a Oct3/4 クロマチン・リモデリング

## 1. 研究開始当初の背景

マウス ES 細胞はサイトカイン LIF 刺激により自己複製が可能である。様々な研究から、ES 細胞の自己複製には、LIF の下流で機能する転写因子群が重要な役割を果たしていることが明らかにされた。例えば STAT3 や Nanog を人為的に活性化させておくと、LIF 非存在下でも自己複製が可能であり、一方 Oct3/4 や Sox2 を遺伝子破壊すると、LIF 存在下でも自己複製ができず細胞は分化してしまう。さらに、これら転写因子群は単独で機能するばかりではなく、他の因子と相互作用することで自己複製に関与することが知られている。私の属する研究室では、Oct3/4 が Dax1 や  $\beta$ catenin と結合し、自己複製を促進することを報告している。加えて別グループによる研究では、Oct3/4 と相互作用するタンパク質群が網羅的に同定され、Oct3/4 を中心としたネットワークを形成していることが示唆された。このことから、タンパク質間の相互作用の生物学的意義を 1 つ 1 つ解析することが、自己複製の分子基盤の解明につながると考えている。このような背景のもと、私が Oct3/4 と相互作用する因子を酵母 two-hybrid 法で探したところ、Baf53a という因子を独自に同定した。Baf53a とは、クロマチン・リモデリング複合体のサブユニットの 1 つである。この複合体はコンパクトに凝集されたクロマチン構造を緩める機能を持ち、それにより転写因子などは標的遺伝子への到達が可能となることが知られている。この複合体の機能から推定すると、Oct3/4 単独ではクロマチン構造を緩めることができないが、Baf53a を介してクロマチン・リモデリング複合体と相互作用することで、Oct3/4 の標的遺伝子の発現を誘導し、自己複製維持に関与しているのではないかというのが、研究開始当初の背景である。

## 2. 研究の目的

ヒト ES 細胞や人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) が樹立され、幹細胞の多能性や再生能力を利用した細胞移植や臓器再生の可能性が国内外で熱く議論されている。ところが、このような高い注目度とは裏腹に、「なぜ多能性を保持したまま増殖 (= 自己複製) するのか?」という疑問には未だに不明な点が多く残されており、「再生医療の基盤の確立」という観点からも、自己複製機構の全容解明が急務であると考えられる。

上述の背景およびこれまでの先行研究や知見をもとに、本研究では Baf53a の未だ解明されていない基礎的研究を完成し、Baf53a と Oct3/4 を介した ES 細胞の自己複製制御機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 細胞培養と WST1 解析

ES A3 細胞および ZHBTc4 ES 細胞は、0.1%ゼラチン溶液でコートした培養皿で ES 細胞用培地 (DMEM、15%FBS、2 mM グルタミン、1 x 非必須アミノ酸、1 x ヌクレオシド、150 $\mu$ M 1-thioglycerol、マウス LIF) で培養した。分化誘導には、培地から LIF を除去、あるいは Tet 添加により Oct3/4 の発現を人為的に停止 (ZHBTc4 ES 細胞) し、数日間培養した。HEK293 細胞は DMEM-10% FBS 培地で培養した。

細胞の増殖能の測定には WST1 解析法を用いた。96-well プレートの 1-well あたりに 1000 から 6000 個の細胞を播き、3 日後に WST1 試薬を加え、1 時間後に 450nm の波長で吸光度を測定をした。

### (2) RT-PCR 解析とウエスタン解析

細胞の total RNA を Sepasol-RNA I Super G を用いて精製し、Oligo(dT) primer と逆転写酵素 ReverTraAce を用いて cDNA を合成した。作成した cDNA を鋳型とし、目的の遺伝子に対するプライマーを用いて PCR 法によって増幅した。

タンパク質レベルでの遺伝子発現検討には、ウエスタン解析を行った。細胞抽出液をサンプルバッファーに懸濁し、SDS-PAGE 後フィルターに転写した。フィルターは目的の抗体を用いて反応し、ECL システムを用いてシグナルを検出した。

### (3) 遺伝子導入と MBP pulldown アッセイ

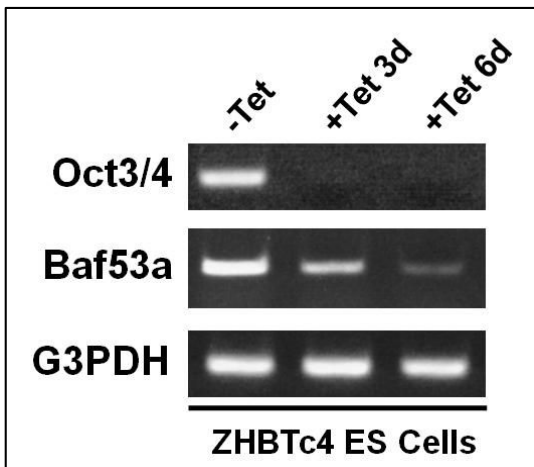
プラスミド発現ベクターと RNAi は、lipofectamin 2000 を用いて、HEK293 細胞もしくは ES A3 細胞に導入した。

Oct3/4 と Baf53a の相互作用は MBP pulldown アッセイを用いた。HEK293 細胞に MBP 融合型 Oct3/4 と Myc-Baf53a を遺伝子導入し、細胞抽出液を作成した。それぞれの因子の相互作用領域を決定するために、様々な欠損変異体も作成し、同様に遺伝子導入した。アミロースリジンによる pull down 反応後、ウエスタン解析により両者の相互作用を確認した。

## 4. 研究成果

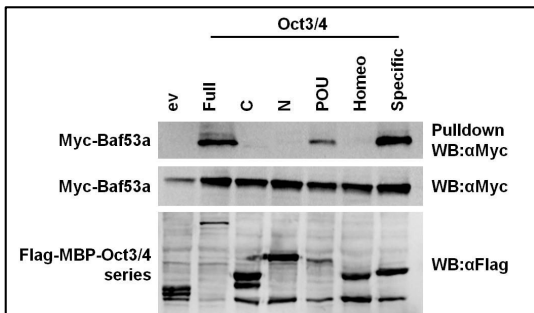
### (1) ES 細胞における Baf53a の発現

野生型 ES 細胞を -LIF (分化誘導条件) で培養すると、LIF 除去後 6 日目で Baf53a の発現が減少した (データ未表示)。また、テトラサイクリン誘導型 Oct3/4 欠損 ES 細胞 (ZHBTc4 ES 細胞) を利用して、人為的に Oct3/4 の発現を停止させると、Baf53a の発現も減少する傾向が認められた (下図)。このことから、Baf53a は未分化な ES 細胞に強く発現し、Oct3/4 の発現が停止して 6 日程度経過すると、発現量が減少することが明らかとなった。



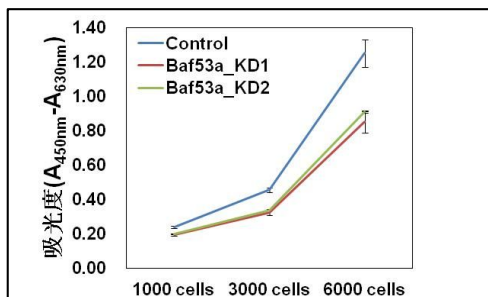
(2) Oct3/4 と Baf53a の相互作用する領域の決定

MBP 融合型の Oct3/4 全長、C 末端領域、N 末端領域、POU 領域、POU-homeo 領域及び POU-specific 領域を作成し、Myc-Baf53a との相互作用を MBP pull-down アッセイにより解析した。その結果、Baf53a は Oct3/4 の全長のほか、POU 領域に結合し、特に POU-specific 領域に強く結合することを見出した(下図)。このことから、Baf53a は Oct3/4 の DNA 結合領域である POU 領域と相互作用することが明らかとなった。



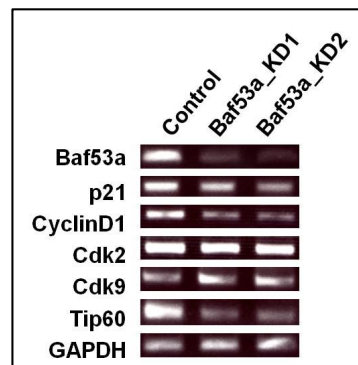
(3) Baf53a の ES 細胞の増殖能への関与

Baf53a が ES 細胞の増殖能に関与していないか調べる目的で、RNAi による Baf53a の機能阻害実験を行った。野生型 ES 細胞にコントロールもしくは、2 種類の Baf53a に対する RNAi を導入した。WST1 アッセイから、Baf53a RNAi を導入した ES 細胞は、コントロールの細胞に比べ増殖能が低下していることが判明した(下図)。このことから Baf53a は ES 細胞の増殖を促進している機能が示唆された。



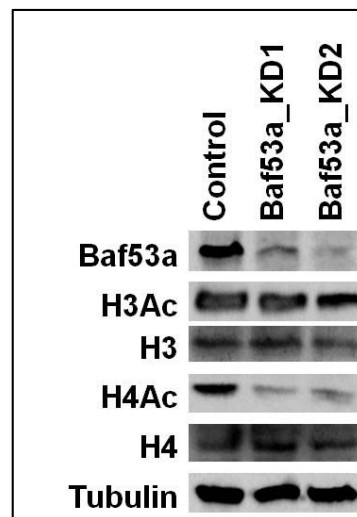
(4) Baf53a ノックダウン ES 細胞の遺伝子発現

Baf53a のノックダウンにより増殖能の低下が認められたことから、次に増殖に關与する遺伝子発現を検証した。野生型 ES 細胞にコントロールもしくは、2 種類の Baf53a に対する RNAi を導入し RNA を回収した。RT-PCR 解析から、Baf53a の発現減少に伴い、細胞周期関連遺伝子である p21 やサイクリン D1、また HAT 活性を持つ Tip60 の発現量の低下が認められた。このことから、Baf53a は p21 やサイクリン D1 の発現を制御することで細胞の増殖能を促進している可能性が示唆された。



(5) Baf53a ノックダウンによるヒストンアセチル化状態の変化

Baf53a はクロマチン・リモデリング複合体の構成因子である一方で、Tip60-HAT 複合体の構成因子でもあることが知られている。そこで、Baf53a をノックダウンした際のヒストン修飾状態をウエスタン解析により検討した。その結果、アセチル化ヒストン H4 の量が、Baf53a のノックダウンにより大きく減少することが明らかとなった。一方、ヒストン H3 のアセチル化状態に変化は認められなかった。このことから、Baf53a は ES 細胞のヒストン H4 のアセチル化に關与していることが明らかとなった。



## 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4件)

1. Hakim F, Kaitsuka T, Raed JM, Wei FY, Shiraki N, Akagi T, Yokota T, Kume S, and Tomizawa K. High Oxygen Condition Facilitates the Differentiation of Mouse and Human Pluripotent Stem Cells into Pancreatic Progenitors and Insulin-Producing Cells. *J Biol. Chem.* 2014;289:9623-38. 査読有
2. Tada Y, Yamaguchi Y, Kinjo T, Song X, Akagi T, Takamura H, Ohta T, Yokota T, Koide H. The stem cell transcription factor ZFP57 induces IGF2 expression to promote anchorage-independent growth in cancer cells. *Oncogene.* 2014. in press. 査読有
3. Fujii Y, Kakegawa M, Koide H, Akagi T, Yokota T. Zfp296 is a novel Klf4-interacting protein and functions as a negative regulator. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;441:411-417. 査読有
4. Uranishi K, Akagi T, Sun C, Koide H, Yokota T. Dax1 Associates with Esrrb and Regulates Its Function in Embryonic Stem Cells. *Mol Cell Biol.* 2013; 33: 2056-66. 査読有

〔学会発表〕(計8件)

1. 赤木紀之, Kuure Satu, 小出寛, Costantini Frank, 横田崇. ES細胞における多分化能と増殖能における転写因子 ETV4/5 の関与. 2013年12月3日 - 6日. 第36回 日本分子生物学会 (神戸・神戸ポートアイランド)
2. 浦西洸介, 赤木紀之, 小出寛, 横田崇. Dax1はEsrrbを抑制することによってES細胞の内胚葉系への分化を抑制する. 2013年12月3日 - 6日. 第36回 日本分子生物学会 (神戸・神戸ポートアイランド)
3. 藤井優佳, 懸川まどか, 小出寛, 赤木紀之, 横田崇. Zfp296を介したKlf4の機能制御機構の解析. 2013年12月3日 - 6日. 第36回 日本分子生物学会 (神戸・神戸ポートアイランド)
4. 金井大, 武石健, 上田篤, 赤木紀之, 小出寛, 横田崇. マウス ES細胞におけるLRH-1の増殖制御機構の解析. 2012年12月14日 - 16日. 第85回 日本生化学会大会 (福岡県・福岡国際会議場)
5. 藤井優佳, 懸川まどか, 赤木紀之, 小出寛, 横田崇. Zfp296のマウス ES細胞における役割. 2012年12月11日 - 14日. 第35回 日本分子生物学会 (福岡・福

岡国際会議場)

6. Tadayuki Akagi, Satu Kuure, Hiroshi Koide, Frank Costantini, Takashi Yokota. INVOLVEMENT OF ETS-RELATED TRANSCRIPTION FACTORS ETV4 AND ETV5 IN PLURIPOTENCY AND PROLIFERATION OF MOUSE EMBRYONIC STEM CELLS. June 13-16, 2012. ISSCR 10th Annual Meeting. Yokohama, Japan.
7. Kousuke Uranishi, Tadayuki Akagi, Chuanhai Sun, Hiroshi Koide, and Takashi Yokota. DAX1 ASSOCIATES WITH ESRRB AND FUNCTIONS AS A REPRESSOR IN EMBRYONIC STEM CELLS. June 13-16, 2012. ISSCR 10th Annual Meeting. Yokohama, Japan.
8. Tada Yuhki, Tadayuki Akagi, Takashi Yokota, and Hiroshi Koide. NANOG/ZFP57 PATHWAY PROMOTES ANCHORAGE INDEPENDENT GROWTH OF HT1080 CELLS BY INDUCING IMPRINTED GENES EXPRESSION. June 13-16, 2012. ISSCR 10th Annual Meeting. Yokohama, Japan.

〔その他〕

ホームページ等

<http://medstem.w3.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

赤木 紀之 (AKAGI TADAYUKI)

金沢大学・医学系・助教

研究者番号：70532183

### (2)研究分担者

該当なし

### (3)連携研究者

該当なし