

【目的】 Zinc Finger 型転写因子 GLIS1 は、iPS 細胞の作製に用いられる山中 4 因子のうち KLF4 および c-MYC と互換性があり、特に c-MYC と置き換えた場合には初期化の不完全な細胞の増殖を抑えることで腫瘍化のリスクを大幅に下げることができる (Maekawa et al., 2011 *Nature*)。このことは、GLIS1 を初期化因子として用いることでより安全な iPS 細胞を効率よく作製し、再生医療への応用を促進できることを意味している。しかしながら、GLIS1 がどのような分子メカニズムで細胞の初期化に寄与しているのかについては、不明な点が多い。私はこれまでの研究で、GLIS1 の初期化因子としての進化的起源について、以下のことを明らかにしてきた。1. *GLIS1* は脊椎動物の共通祖先で起こった全ゲノム重複によって、*GLIS3* とともに祖先遺伝子 *GLIS1/3* から派生した。2. *GLIS1* は *GLIS3* よりも進化速度が速く、祖先遺伝子 *GLIS1/3* と *GLIS3* の間で高度に保存されたタンパク質相互作用モチーフの多くを失っている。3. *GLIS1* はマウス、ウシ、ニワトリ、カエルの初期胚で母性因子として発現するが、メダカやゼブラフィッシュの *GLIS1* および *GLIS3*、無脊椎動物の *GLIS1/3* ではそのような発現がほとんど見られない。これらの結果は、脊椎動物の進化の過程で *GLIS3* が祖先的な役割を保持する一方で、*GLIS1* が新たに母性因子としての発現および初期化因子としての機能を獲得したことを示唆している (Yasuoka et al., 2020 *Mol. Biol. Evol.*)。そこで、本研究では各動物種の *GLIS1* と *GLIS3* のリプログラミング活性を比較し、進化のどの段階 (脊椎動物、四足動物、羊膜類、あるいは哺乳類) で *GLIS1* が高いリプログラミング活性を獲得したのかを明らかにする。*GLIS1* および *GLIS3* のリプログラミング活性は、既存の研究ではヒトおよびマウスの遺伝子でしか解析されてこなかったが、他動物種の遺伝子を解析に用いることでより厳密に活性の獲得に関わる *GLIS1* タンパク質機能ドメインを特定することを目指す。

【方法】 *GLIS1* および *GLIS3* のリプログラミング活性を比較するため、ヒト線維芽細胞にエピソーマルベクターを用いて遺伝子導入し、iPS 細胞の作製効率を評価した。ヒトとマウスの遺伝子に加え、スッポン、ツメガエル、ゼブラフィッシュ、ナメクジウオの遺伝子を新たにクローニングし、比較解析に用いた。もう一つのアッセイ系として、HEK293 細胞を用いた細胞 X へのダイレクトリプログラミング実験を行い、マーカー遺伝子 A の発現量によって、各種 *GLIS1* および *GLIS3* の活性を評価した (未発表のリプログラミング実験系のため、詳細は記載できない)。

【結果】 ヒト線維芽細胞からの iPS 細胞作製実験では、残念ながら *GLIS1* または *GLIS3* による作製効率の向上を見出すことができなかったため、リプログラミング活性の比較をすることができなかった。一方、細胞 X へのダイレクトリプログラミング実験では、ヒト・マウス・カメの *GLIS1* が活性を示したのに対し、カエルの *GLIS1* は活性を示さなかった。また、ヒト *GLIS1* とカエル *GLIS1* の Zinc Finger 領域を入れ替えても活性は変わらず、C 末端側領域に活性が依存していることが示された。さらに、ヒト *GLIS1* の C 末端側領域のうち、羊膜類で保存された二つの領域を欠損させると活性が失われることも明らかにした。しかしながら、ゼブラフィッシュ *GLIS1a* と *GLIS1b* の活性を調べたところ、カエル *GLIS1* よりもヒト *GLIS1* との相溶性が低い *GLIS1a* がリプログラミング活性を示したのに対し、相溶性が高い *GLIS1b* は活性を示さなかった。一方、ヒト *GLIS3* も弱いながらもリプログラミング活性を示し、ヒト *GLIS1* とヒト *GLIS3* のキメラでは、Zinc Finger 領域と C 末端側領域のどちらを入れ替えても大きく活性が減少したものの、弱い活性が残った。脊椎動物と近縁な無脊椎動物である頭索動物ナメクジウオの *GLIS1/3* についても調べたところ、リプログラミング活性は示さなかった。これらの結果は、*GLIS1* のヒト細胞におけるリプログラミング活性は少なくとも顎口類で獲得されたこと、その活性は C 末端側領域に依存しているがアミノ酸配列の保存性との関連性は低いこと、リプログラミング活性に関わる共役因子は *GLIS3* と結合できるように共進化していることが示唆された。

本研究で明らかとなった、*GLIS1/3* 遺伝子の機能進化

|            | ヒト           |              | マウス          |              | カメ           |              | カエル          |              | ゼブラフィッシュ      |               | ナメクジウオ       |                |
|------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|---------------|---------------|--------------|----------------|
| 遺伝子名       | <i>GLIS1</i> | <i>GLIS3</i> | <i>Glis1</i> | <i>Glis3</i> | <i>Glis1</i> | <i>Glis3</i> | <i>glis1</i> | <i>glis3</i> | <i>glis1a</i> | <i>glis1b</i> | <i>glis3</i> | <i>glis1/3</i> |
| リプログラミング活性 | ✓✓✓          | ✓            | ✓            | ✓            | ✓            | n.d.         | ×            | ×            | ✓             | ×             | ×            | ×              |