165　初期化因子GLIS1の構造基盤の解明	安岡　有理

【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との相同性が低いGLIS1aがリプログラミング活性を示したのに対し、相同性が高い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とも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	*GLIS1*	*GLIS3*	*Glis1*	*Glis3*	*Glis1*	*Glis3*	*glis1*	*glis3*	*glis1a*	*glis1b*	*glis3*	*gjlis1/3*
リプログラミング活性	✔✔✔	✔	✔	✔	✔	n.d.	✗	✗	✔	✗	✗	✗

165. 初期化因子 GLIS1 の構造基盤の解明

安岡　有理

理化学研究所 生命医科学研究センター 応用ゲノム解析技術研究チーム

Key words：iPS 細胞，転写因子，リプログラミング活性，ゲノム重複，遺伝子機能進化

緒　言

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［1］。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。実際に、GLIS1 を用いた改良型 iPS 細胞作製法や、GLIS1 を用いて作製した iPS 細胞に由来する細胞シートの移植実験などがその後も報告されている。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。例えば、DNA 結合ドメイン（Zinc Finger）以外の機能ドメインはほとんど分かっておらず、細胞のリプログラミングに関わる転写共役因子も不明である。

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迫るべく、大規模系統樹解析、比較ゲノム解析、比較トランスクリプトーム解析を行った。その結果、以下のことが判明した。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。4. *GLIS1/3* 遺伝子群は腎臓や膵臓など繊毛を有する細胞・組織で広く保存された発現を持つ。GLIS1 の脊椎動物パラログである GLIS3 は、山中 4 因子によるリプログラミングを亢進する働きをもつものの、KLF4 との互換性はなく初期化因子としての活性は GLIS1 よりも弱い。したがって、これらの解析結果は、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。同時に、繊毛組織での働きは祖先遺伝子から受け継いだものであると考えられる［2］。

GLIS1 は保存的なタンパク質相互作用モチーフを失っている分、リプログラミング活性に関わる新たな共役因子を獲得した可能性が高い。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ことを目的とする。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。本研究によって GLIS1 のリプログラミング機構の一端が明らかにされれば、リプログラミングの基本原理の理解が進み、今後 iPS 細胞を臨床応用する上でも大変有意義なものになると期待される。

方　法

1. 遺伝子クローニングおよびプラスミド構築

ヒト *GLIS1* および *GLIS3* は理研 FANTOM クローン、および Addgene（Plasmid #3762）より入手した。マウス

Glis1、*Glis3* は順天堂大学松本征仁客員准教授より譲り受けた。スッポン（*Pelodiscus sinensis*）の *Glis1*、*Glis3*、ツメガエル（*Xenopus tropicalis*）の *glis1*、*glis3*、ゼブラフィッシュ（*Danio rerio*）の *glis1a*、*glis1b*、*glis3*、ヒガシナメクジウオ（*Branchiostoma japonicum*）の *glis1/3* はそれぞれ胚の cDNA プールから PCR によってクローニングした。T2A 配列を介した OCT3/4、KLF4、SOX2 (OKS) の同時発現用配列は、Takara 社 Human iPS Cell Generation® All-in-One Vecto からクローニングした。また、*L-Myc* は Takara 社 Human iPS Cell Generation™ Episomal Vector Mix からクローニングした。各遺伝子はエピソーマルベクター (System Biosciences 社 Enhanced Episomal Vector)、または細胞 X ダイレクトリプログラミング用ベクター（順天堂大学松本征仁客員准教授より提供）に組み込み、活性評価に使用した。

2. iPS 細胞作製実験

ヒト皮膚線維芽細胞 1×10^5個に、各遺伝子を含むエピソーマルベクターをエレクトロポレーション法によって導入した（Thermo Fisher 社 Neon Transfection System を使用)。iPS 細胞作製効率を上げるため、mp53DD（p53 機能阻害因子）および EBNA1（エピソーマルベクター複製因子）を発現させるエピソーマルベクターも同時に導入した。培養には Vitronectin もしくは iMatrix511 でコーティングした 6-well plate を用い、フィーダーフリーで培養した。遺伝子導入翌日から 2 週間 N2B27 培地（Takara 社 Ndiff227）で培養したのち、1 週間 Essential 8 培地（Thermo Fisher 社）で培養し、4%パラホルムアルデヒド含有 PBS で 10 分間固定した。固定した細胞はアルカリフォスファターゼ染色し、iPS 細胞のコロニー数をカウントした。ポジティブコントロールとして、Epi5™ Episomal iPSC Reprogramming Kit（Thermo Fisher 社）を用いた。このキットには、iPS 細胞作製に有効であることが報告済み [3] のエピソーマルベクター5 種（pCE-hOCT3/4、pCE-hSK、pCE-hUL、pCE-mP53DD、pCXB-EBNA1）が含まれている。

3. 細胞 X へのダイレクトリプログラミング実験

ヒト胎児腎細胞 293（HEK293）細胞を 24-well plate に播種し、細胞 X ダイレクトリプログラミング用ベクターを Transfection した（Thermo Fisher 社 Lipofectamin 3000 を使用)。細胞 X ダイレクトリプログラミング用ベクターは、Doxycycline（Dox）によって遺伝子発現を誘導でき、さらに Tamoxifen（Tam）によって *GLIS1/3* 遺伝子の核移行を制御できるので、遺伝子導入 4～6 時間後から薬剤処理を行い、細胞 X へのダイレクトリプログラミングを行った。遺伝子導入 2 日後に細胞を回収し、細胞 X のマーカー遺伝子 A の発現を定量的 RT-PCR 法によって定量した。

結果および考察

1. エピソーマルベクターで導入した GLIS1 は、フィーダーフリー培養におけるヒト皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞作製効率を向上させられなかった

GLIS1 が既報［1］通り山中 3 因子（OCT3/4、KLF4、SOX2、以下 OKS）と相乗的に働き、*Myc* 遺伝子なしでも iPS 細胞を作製できるのかを調べるため、ヒト皮膚線維芽細胞からの iPS 細胞作製実験を行った。まず、OKS と L-Myc を、mp53DD および EBNA1 とともに発現させたところ、positive control（Epi5 vectors）と同等の作製効率が得られた（図 1A)。この結果は、本実験で用いた Enhanced Episomal Vector が有効であり、*OKSM* 遺伝子のベクター上での配置・組み合わせは実験に大きな影響を与えないことを示している。このような条件下で、OKS に GLIS1 を加えて実験したところ、GLIS1 による iPS 細胞作製効率の向上は見られなかった（図 1A)。次に、OKSM との相乗効果も検討するため、OKSM にさらに GLIS1 を加えたが、それでも iPS 細胞作製効率の向上は見られず、むしろ全長の GLIS1 は阻害的に働いた（図 1B)。GLIS3 についても同様に iPS 細胞作製効率を検討したが、顕著な効果は見られなかった。カエル GLIS1 についても検討したが、結果は同じだった（図 1B)。GLIS1 および GLIS3 は N 末端側に自己抑制的な領域があることが知られているので、N 末端側を欠失させたコンストラクト（ΔN）も検討したが、リプログラミング活性は見られなかった（図 1A、B)。これらの結果から、GLIS1 が初期化因子として iPS 細胞作製に寄与するには、より厳密な実験条件の検討が必要であることがわかり、遺伝子間の機能比較には不向きであることが判明した。

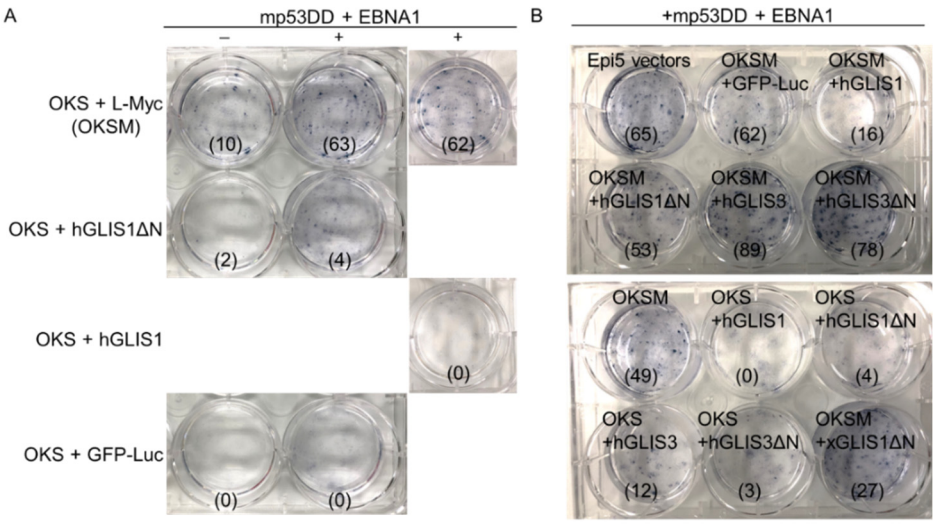


図 1. iPS 細胞作製実験において、GLIS1 は期待されたリプログラミング活性を示さなかった

エピソーマルベクターを用いた遺伝子導入により、ヒト皮膚線維芽細胞から作製したiPS細胞のコロニーをアルカリフォスファターゼ染色した染色像を示す。カッコ内の数字はカウントしたコロニーの数を表す。

A） mp53DDおよびEBNA1を一緒に導入することで、OKSMは十分なiPS細胞作製活性を示した。一方で、ヒトGLIS1（hGLIS1）は全長、およびN末端側欠失型（ΔN）のどちらをOKSと共発現させた場合でも、iPS細胞作製活性を示さなかった。

B） OKSMにヒトGLIS1（hGLIS1）、ヒトGLIS3（hGLIS3）、カエルGLIS1（xGLIS1）を加えても、相乗的な効果は見られなかった。逆に、hGLIS1はリプログラミングに対して抑制的に働いた。すべてのサンプルにmp53DDおよびEBNA1を一緒に導入している。

2. 細胞 X へのダイレクトリプログラミング実験において、羊膜類 GLIS1 は高いリプログラミング活性をもつが、カエルやゼブラフィッシュの GLIS1 はもたない

より定量的にGLIS1のリプログラミング活性を検討するため、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の発現量を定量的RT-PCRで比較した。この実験では、GLIS1はERT2融合タンパク質として発現させており、Tam添加による核移行依存的にリプログラミングが起こることが先行研究により示されている。実験の結果、ヒトGLIS1のリプログラミング活性と比較した際、マウスGLIS1・カメGLIS1・ゼブラフィッシュGLIS1aは弱いながらも活性を示したが、カエルGLIS1・ゼブラフィッシュGLIS1b・ナメクジウオGLIS1/3は活性をほとんど示さなかった（図2A）。これらの結果から、少なくとも顎口類の系統で、GLSI1がリプログラミング活性を獲得したことが示唆された。

一方で、ヒトおよびマウスのGLIS3は弱いながらもリプログラミング活性を示した（図2A）。データは割愛するが、カエルGLIS3・ゼブラフィッシュGLS3はほとんど活性を示さなかった。このことは、遺伝子の分岐の古さよりも実験に用いた細胞と遺伝子の進化的距離の方が活性に寄与していることを意味し、GLIS1およびGLIS3と働く共役因子が、ヒトに至る系統の中で共進化してきたことを示唆している。そこで、ZincFingerドメインとC末端側領域を入れ替えたキメラコンストラクトを用いて実験を行ったところ、ヒトGLIS1とヒトGLIS3のキメラでは、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（図2B）。一方、ヒトGLIS1とカエルGLIS1のキメラでは、カエルGLIS1のZinc Fingerドメインはヒト GLIS1と同等の機能をもつものの、C末端側領域は全く互換性を示さなかった（図2B）。これらの結果から、GLIS1とGLIS3の分岐後、ZincFingerドメインに生じた数アミノ酸の違いが、結合するDNA配列やパートナーとなる転写因子に違いを生み、機能的な違いをもたらしたこと、羊膜類GLIS1のC末端側領域に進化の過程でリプログラミング活性に必要な転写共役因子と結合するようになったこと、その共役因子はGLIS3とも共進化している可能性があることが示唆された。

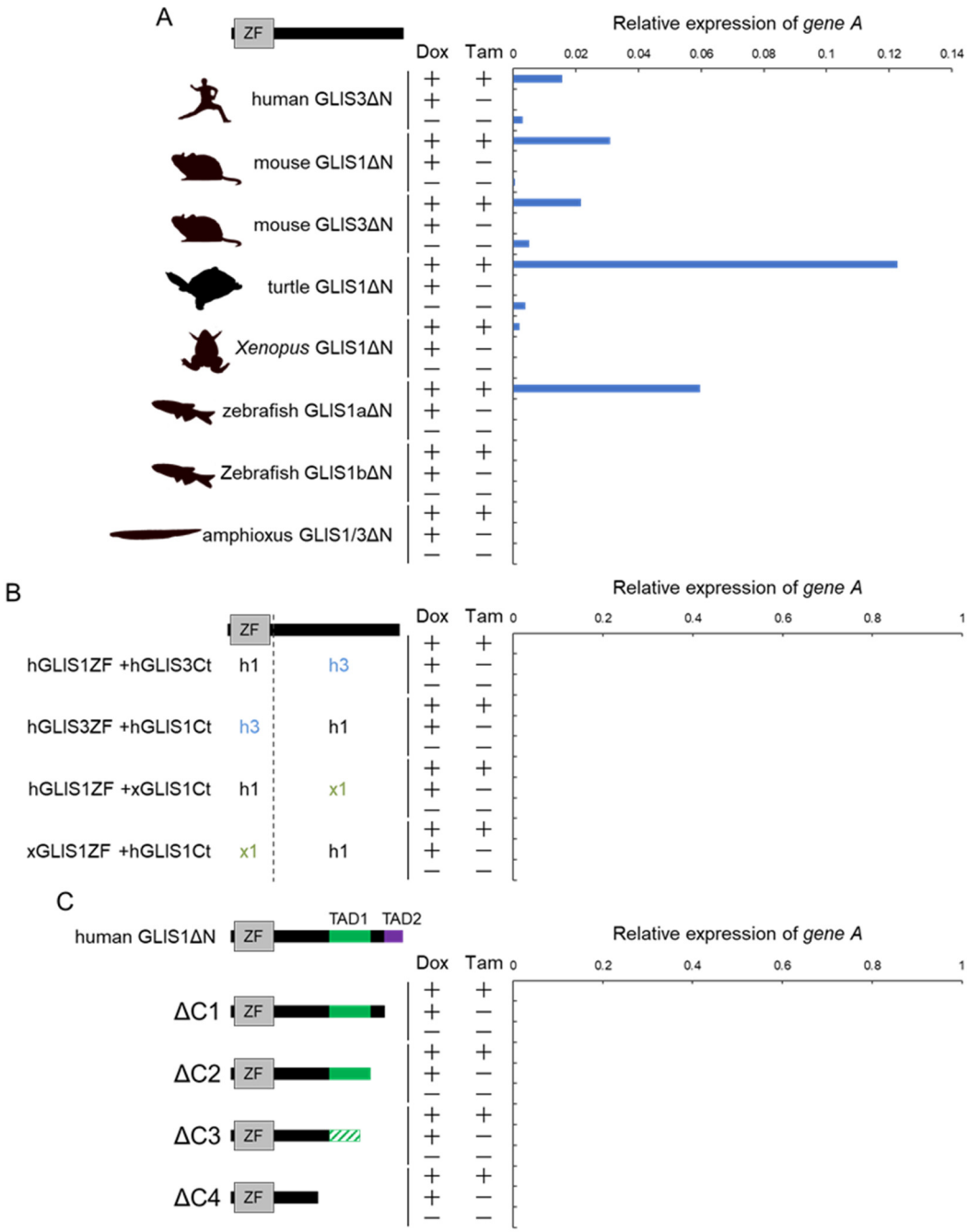


図 2. 細胞 X へのダイレクトリプログラミング実験において、GLIS1 と GLIS3 は活性の違いを示した

HEK293細胞を細胞Xへダイレクトリプログラミングしたときのマーカー遺伝子Aの発現量を、ヒトGLIS1ΔNに対する相対的な発現量で表した。DoxとTamの両方で処理したときのみ、GLIS1/3は活性を示す。

A) ヒト GLIS3、マウス GLIS1、マウス GLIS3、カメ GLIS1、ツメガエル GLIS1、ゼブラフィッシュ GLIS1a、ゼブラフィッシュ GLIS1b、ナメクジウオ GLIS1/3 の活性比較

B) B ヒト GLIS1 とヒト GLIS3、およびヒト GLIS1 とカエル GLIS1 のキメラコンストラクトの活性比較。

C) ヒト GLIS1 の C 末端側領域欠損コンストラクトの活性比較（TAD1 及び TAD2 は転写活性化ドメイン）。

3. ヒト GLIS1 のリプログラミング活性は、C 末端側領域の転写活性化ドメインに依存する

ヒト GLIS1 の C 末端側領域のどの部分がリプログラミング活性に必要なのかを調べるため、欠損コンストラクトを作製し、同様のアッセイ（細胞 X へのダイレクトリプログラミング実験）を行った。その結果、これまで転写活性化ドメインとして報告されていた二つの領域［4］を欠損させたときにリプログラミング活性が大きく減じることを見出した（図 2C）。この二つの領域（TAD1 と TAD2）には羊膜類の GLIS1 に特異的なアミノ酸配列が存在するので、この領域に結合する共役因子が、リプログラミング活性に大きく関わることが示唆された。しかしながら、羊膜類 GLIS1 とのアミノ酸配列相同性が低いゼブラフィッシュ GLIS1a がリプログラミング活性を示したことから（図 2A）、GLIS1 の C 末端側領域には特定の立体構造を取らずにリプログラミングのための共役因子と結合する領域が存在することが想定される。本研究によって、GLIS1 のリプログラミング活性が進化の歴史の中でどのように獲得されてきたのか、その一端が解明されるとともに、今後どこに着目して研究を進めることで、GLIS1 によるリプログラミング機構の解明に近づけるかが明らかとなった（表 1 参照）。

表 1. GLIS1 と GLIS3 の発現および機能のまとめ

	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	*GLIS1*	*GLIS3*	*Glis1*	*Glis3*	*Glis1*	*Glis3*	*glis1*	*glis3*	*glis1a*	*glis1b*	*glis3*	*gjlis1/3*
母性遺伝子発現	✗	✗	✔	✗	?	?	✔	✗	✗	✗	✗	✗
繊毛組織での発現	✔ (腎臓)	✔ (腎臓, 膵臓, 肺)	✔ (腎臓)	✔ (腎臓, 膵臓, 肺)	?	?	?	✔ (腎臓)	✔ (膵臓)	✔ (膵臓)	✔ (腎臓, 膵臓)	✔ (鰓, 腸)
リプログラミング活性	✔✔✔	✔	✔	✔	✔	n.d.	✗	✗	✔	✗	✗	✗

共同研究者・謝辞

本研究で使用した一部実験試料は、順天堂大学大学院医学研究科難病診断治療研究センターの松本征仁客員准教授より提供を受けた（方法参照）。また、理化学研究所生命医科学研究センター応用ゲノム解析技術研究チーム（チームリーダー：岡崎康司）のメンバーの日頃の研究支援に深く謝意を表する。

文　献

1) Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, Shibukawa R, Kodanaka I, Ichisaka T, et al. Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. Nature. 2011;474(7350):225–8. PMID: 21654807 DOI: 10.1038/nature10106

2) Yasuoka Y, Matsumoto M, Yagi K, Okazaki Y. Evolutionary History of GLIS Genes Illuminates Their Roles in Cell Reprograming and Ciliogenesis. Mol Biol Evol. 2020;37(1):100–9. PMID: 31504761 DOI: 10.1093/molbev/msz205

3) Okita K, Yamakawa T, Matsumura Y, Sato Y, Amano N, Watanabe A, et al. An efficient nonviral method to generate integration-free human-induced pluripotent stem cells from cord blood and peripheral blood cells. Stem Cells. 2013;31(3):458–66. PMID: 23193063 DOI: 10.1002/stem.1293

4) Kim YS, Lewandoski M, Perantoni AO, Kurebayashi S, Nakanishi G, Jetten AM. Identification of Glis1, a novel Gli-related, Krüppel-like zinc finger protein containing transactivation and repressor functions. J Biol Chem. 2002;277(34):30901–13. PMID: 12042312 DOI: 10.1074/jbc.M203563200