

「人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 作製・制御等の医療基盤技術」
平成 20 年度採択研究代表者

石井 俊輔

(独)理化学研究所 石井分子遺伝学研究室 主任研究員

胚細胞ヒストンによるリプログラミング機構

1. 研究実施の概要

卵子および精子に存在する2種類のヒストンバリエントが、受精卵から内部細胞塊までの初期胚に存在し(胚細胞ヒストンと呼ぶ)、その存在量が分化と共に減少することを見出した。また、ES 細胞でも、これらの2種類の胚細胞ヒストンは、低いながらも有意に発現し、ES 細胞の *in vitro* 分化と共に、その発現レベルがほとんど無くなることを明らかにした。さらに、線維芽細胞にこれらの胚細胞ヒストンを発現させると、Nanog や Oct3/4 などの ES 細胞特異的遺伝子の発現が誘導されることを見出した。これらの結果は、胚細胞ヒストンを体細胞に発現させると、体細胞のリプログラミングが誘導されることを示唆している。種々の発現ベクターを用いて胚細胞ヒストン体細胞に発現させたり、また他のリプログラミング因子や薬剤と共に発現させ、胚細胞ヒストンによる体細胞のリプログラミングの効率化を検討した。また胚細胞ヒストンによるリプログラミングの分子メカニズムを明らかにするため、胚細胞ヒストン複合体を精製し、その構成因子を同定した。さらに胚細胞ヒストンの生理機能を明らかにするため、変異 ES 細胞と変異マウスの作製を行なった。今後、これらの研究を通じて、胚細胞ヒストンの分化における役割と、リプログラミングの分子メカニズムを明らかにする予定である。

2. 研究実施内容

1) 胚細胞ヒストン発現の詳細解析

卵子および精子に存在する2種類の胚細胞ヒストンの発現レベルを mRNA レベル、及びタンパク質レベルで詳細に解析した。これらの胚細胞ヒストンは、受精卵でも非常に高いレベルで存在し、8細胞期までに徐々に低下することが分かった。これらのヒストンは、内部細胞塊や ES 細胞でも、低いながらも有意に存在しており、その存在量が分化と共に低下し、体細胞ではほとんど検出できないことを明らかにした。

2) 胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の効率

Nanog 遺伝子プロモーター下流に EGFP 遺伝子を挿入した PAC クローンのトランスジェニック

マウスから調製した MEFs (京大・山中教授より供与) に、胚細胞ヒストンとヒストンシャペロンを一過的に発現させると、EGFP を発現し、ES 細胞様の形態を示す細胞コロニーが出現することを観察した。そこで、強さの異なるプロモーター(アクチン、CAG プロモーターなど)を用いた発現ベクターを作製し、同様の実験を行なった所、プロモーターが強い程、上記の ES 細胞様コロニーの出現頻度が高いという結果は、得られなかった。またセンダイウイルスベクターを用いて、2種類の胚細胞ヒストンを継続的に高いレベルで発現する細胞集団を作製したが、ES 細胞様コロニーは得られなかった。これらの結果は、胚細胞ヒストンによるリプログラミングには、発現レベルが高いことが、必ずしも必要ではないことを示唆している。

一方、HDAC 阻害剤 バルプロ酸 (VPA) が、山中4因子による iPS 細胞作製の効率を促進するとの、Melton らによる報告 (Nat Biotech, 2008, Oct) を基に、胚細胞ヒストンによるリプログラミングへの VPA の影響を調べた。発現ベクター導入後、細胞を VPA 処理した場合、複数の胚細胞ヒストンとヒストンシャペロンの発現ベクターを導入する必要はなく、いずれか一つの胚細胞ヒストンの発現ベクターを導入するだけで、ES 細胞様コロニーが得られることを見出した。またこのようなコロニーの得られる頻度は、最初の観察に比べると、10 倍以上高いことも判明した。しかし、これらの条件で得られた ES 細胞様コロニーは、60 日程度で増殖が停止し、iPS 細胞株を樹立することはできなかった。現在、さらに多様な条件を検討しつつある。

上記の試みと並行して、胚細胞ヒストンが、山中4因子によるリプログラミングに及ぼす影響について検討した。その結果、c-Myc が無くても、胚細胞ヒストンがあれば、ある程度の効率で、iPS 細胞様のコロニーが得られることを見出した。

3) 胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の分子機構:

MEFs に、3種類の胚細胞ヒストンとヒストンシャペロンを一過的に発現させ、全体の DNA メチル化の程度を、特異抗体を用いた ELISA で測定した所、胚細胞ヒストンの発現によって、DNA メチル化の程度が有意に低下していることが示唆された。そこで、胚細胞ヒストンが局在する遺伝子座を決定するためには、タイリングアレイを用いた Chip-on-chip 法による解析が、必須と考え、胚細胞ヒストンに対する特異抗体の免疫沈降効率と特異性を検討した。その結果、これらの抗体は、この目的に充分使用可能であることが判明した。

一方、胚細胞ヒストンに特異的に結合する因子を同定する目的で、これらのヒストンを含む複合体の精製を行なった。FLAG と HA の2種類のタグを C 末端に持つ胚細胞ヒストンを発現する HeLa 細胞株を作製した。この細胞を大量培養し、抗 FLAG 抗体と抗 HA 抗体を用いて、複合体を精製した。精製複合体に含まれる構成因子を、質量分析で解析した結果、幾つかの因子が同定された。現在、これらの因子と胚細胞ヒストンとの相互作用について解析しつつある。

4) 胚細胞ヒストンと多分化能との関連:

胚細胞ヒストンと多分化能との関連を理解するためには、欠損 ES 細胞および変異マウスの作製と解析が必須である。2種類の胚細胞ヒストン遺伝子は隣接しており、その発現は、両遺伝子の間に存在する共通のプロモーターで制御されている。従って、一方の遺伝子の欠損が、他方の遺伝子の発現に影響する可能性もあり得るので、両方の遺伝子の欠損がどのような表現型を示すかを解析することが効率的と判断した。そこで、両遺伝子を欠損させるため、Neomycin 耐性遺伝子を

有するターゲティングベクターを作製し、両遺伝子を欠損した ES 細胞を得、キメラマウスを作製した。現在、変異の生殖系列への伝達を確認しつつある。一方、両遺伝子を欠損した ES 細胞が得られるかどうかを検討するため、Puromycin 耐性遺伝子を有するターゲティングベクターを作製し、両遺伝子のホモ変異 ES 細胞を 1 株だけ得た。現在、この細胞株の性状を検討中である。

一方、胚細胞ヒストンと多分化能との関連を理解するためには、これらのヒストンを過剰発現するトランスジェニックマウスの作製と解析が有用である。そこで、2種類のトランスジェニックマウスの作製を試みた。まず、比較的高いレベルで、すべての組織で発現させるため、CAG プロモーター (CMV とアクチンの融合プロモーター) の下流に、IRES を介して胚細胞ヒストン遺伝子を繋いだベクターを構築し、トランスジェニックマウスを作製した。これまでに、3ラインが得られており、現在解析中である。

3. 研究実施体制

(1)「石井」グループ

①研究分担グループ長: 石井 俊輔 ((独)理化学研究所、主任研究員)

②研究項目

- ・胚細胞ヒストンの発現解析、リプログラミング効率の検討、Chip-on-chip 解析、胚細胞ヒストントランスジェニックマウスの作製
- ・胚細胞ヒストン変異 ES 細胞及び変異マウスの作製と解析
- ・胚細胞ヒストン複合体の精製と解析