

「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

米田 悦啓

大阪大学生命機能研究科・教授

人工染色体を用いた新たな細胞リプログラミング技術開発

1. 研究実施の概要

本研究では脱落制御可能な人工染色体を用い、更にリプログラミングに最適な核-細胞質間物質輸送の場を構築することにより、高効率かつ安全な細胞リプログラミング (iPS 細胞誘導) の技術開発を目指している。初年度は人工染色体へ、任意の遺伝子を組み込めるように loxP 配列を挿入することを優先して進めた。各種人工染色体前駆体ベクター構築を進め、このベクターを人工染色体保有細胞株に導入選択して loxP 部位を組み込んだ人工染色体株を少数分離した。現在更に loxP 部位を低コピーで維持する人工染色体株の単離を進めている。今後、loxP 挿入配列をもつ安定な人工染色体構築が達成できた場合は、この人工染色体 loxP サイトへ組み換え酵素 Cre により、ヘテロクロマチン化を過剰に誘導する tTS 遺伝子 (tetR 融合蛋白質) を組み込み、Dox を培地から除いたときに人工染色体の不安定化が起こる自己完結型の脱落制御可能人工染色体システムが構築できたことを確認する。脱落制御可能な人工染色体が構築できれば、iPS 誘導に必要な遺伝子を組み込み、高効率で安全な iPS 細胞樹立技術の開発を目指す。また、細胞リプログラミングにおける核-細胞質間物質輸送制御機構に着目し、これまでに公開された遺伝子発現データベースをもとに核輸送関連因子群の遺伝子発現パターンを解析した結果、MEF に比べ未分化 ES 細胞や iPS 細胞で高発現する複数の importin ファミリー遺伝子、核膜孔構成因子が同定された。更にタンパク質レベルでの発現が大きく変化している複数の核輸送因子の存在が確認された。今後、未分化細胞で高発現する importin ファミリー、核膜孔構成因子に着目し、核-細胞質間物質輸送制御の観点から細胞リプログラミングの機構解明を目指す。また、これらの知見を踏まえて核輸送因子遺伝子を付加導入した人工染色体による iPS 細胞誘導の高効率化を試みる。

2. 研究実施内容

研究の目的:

自己脱落制御可能な哺乳類人工染色体を構築する事により、レトロウイルスベクターを用いた iPS 細胞樹立系のランダムな宿主染色体への挿入による問題点を克服し、安全な iPS 細胞樹立法の確立を目指す。また、細胞リプログラミングにおける核-細胞質間物質輸送制御の解析を通してリプログラ

ミングの分子機構の解明を進めると共に、リプログラミングの高効率化を図る。

研究実施内容:

染色体分配に必須なセントロメア機能を備えたヒト人工染色体は、宿主染色体に組み込まれることなく、独立した染色体として安定に細胞核内で維持される。この人工染色体を適切なタイミングで脱落させることは可能である。この人工染色体 **tetO** 配列上に、**tet** リプレッサー(**tetR**)-融合蛋白質 **tTS** を結合させることによりヘテロクロマチン化を過剰に誘導すると、人工染色体上のセントロメア機能は完全にOFFになり、細胞増殖とともに人工染色体は急速に細胞から脱落していく。そこで本研究では、この脱落制御可能な人工染色体上に **loxP** 配列を挿入し、この部位へ **tTS** 遺伝子の発現カセットを組み込み、自己脱落制御可能な人工染色体を開発することを目指す。これまでに **loxP** 部位を人工染色体に組込むためのベクターを構築し、このベクターを人工染色体保有細胞株に導入選択して **loxP** 部位を組込んだ人工染色体株をいくつか分離した。現在、これら人工染色体の構造解析を進めている。また、これとは平行して、**loxP** 部位ベクターと人工染色体前駆体 DNA をヒト細胞 HT1080 へ同時に導入し、**loxP** 部位を低コピーで維持する人工染色体株の単離を進めている。今後、**loxP** 挿入配列をもつ安定な人工染色体構築が達成できた場合は、この人工染色体 **loxP** サイトへ組み換え酵素 Cre により、ヘテロクロマチン化を過剰に誘導する **tTS** 遺伝子(**tetR** 融合蛋白質)を組み込み、**Dox** を培地から除いたときに人工染色体の不安定化が起こる自己完結型の脱落制御可能人工染色体システムが構築できたことを確認する。脱落制御可能な人工染色体が構築できれば、iPS 誘導に必要な遺伝子を組み込み、高効率で安全な iPS 細胞樹立技術の開発を目指す。一方、リプログラミングに必須な核-細胞質間物質輸送は特異的な核輸送関連因子群により制御されていると予想される。そこで、**importin- α** 、**importin- β** 、**RAN** サイクル関連因子、核膜孔構成因子の遺伝子発現パターンを解析し、細胞リプログラミング機構の分子レベルでの解明を進める。そしてリプログラミングに最適な核-細胞質間物質輸送の場を構築することによりiPS誘導の高効率化を目指す。これまでに未分化ES・iPS細胞で高発現する複数の **importin** ファミリー遺伝子、核膜孔構成因子が同定された。今後、これらの因子の細胞リプログラミングにおける機能を解析し、核-細胞質間物質輸送制御の観点から細胞リプログラミングの機構解明を試みる。

3. 研究実施体制

(1)「米田」グループ

①研究分担グループ長: 米田 悦啓(大阪大学、教授)

②研究項目

「人工染色体を用いた新たな細胞リプログラミング技術開発」

(2)「舩本」グループ

①研究分担グループ長: 舩本 寛(名古屋大学 准教授、かずさ DNA 研究所 室長(H20.12 ~))

②研究項目

「自己脱落制御可能な人工染色体の作製とこれを用いた iPS 細胞の樹立」