

「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

卵子への体細胞の核移植によって、正常な個体が発生することから、卵子の細胞質は特殊なリプログラミング因子を含むことが示唆されているが、その実体は不明である。私達は、卵子に多量に存在する2種類のヒストンバリエント(胚細胞ヒストンと呼ぶ)について、これまでに以下の結果を得ている。1)胚細胞ヒストンは、卵子および精子に多量に存在し、また受精卵から内部細胞塊までの初期胚にも存在し、その存在量は分化と共に減少する。2)胚細胞ヒストンは、ES 細胞にも、低いながら有意に発現し、ES 細胞の分化と共に、その発現がほとんど無くなる。3)線維芽細胞にこれらの胚細胞ヒストンを発現させると、ES 細胞特異的遺伝子の発現が誘導される。これらの結果は、胚細胞ヒストンが体細胞のリプログラミングを誘導することを示唆している。本年度は、胚細胞ヒストンを発現させるための条件や細胞培養条件などの種々の条件を検討し、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、胚細胞ヒストンの ES 細胞での染色体上の局在を解析した。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 細胞と変異マウスを作製し、解析した。今後、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. 研究実施体制

(1)「石井」グループ

- ①研究分担グループ長: 石井 俊輔(独立行政法人理化学研究所、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

### § 3. 研究実施内容

#### 1) 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

胚細胞ヒストンがどのような標的遺伝子を直接制御するかを明らかにするため、Chip-on-chip アッセイを行なった。まず胚細胞ヒストン H2aa と H2ba に対する特異抗体を作製し、免疫沈降に使用できることを確認した。そして、Affymetrix 社のマウスプロモーターアレイを用いて、ES 細胞での、Chip-on-chip アッセイを行なった。すでに ES 細胞では、多分化能に関連する遺伝子は、ヒストン H3-K27me3 と H3K4me3 の両方が多く結合することが知られている (Bivalent ドメイン)。また、ES 細胞で発現している遺伝子は、ヒストン H3K4me3 が多く結合する。興味深いことに、2種類の胚細胞ヒストン H2aa と H2ba は、これらの遺伝子のプロモーター領域には結合せず、一方他の遺伝子には結合していた。この結果から、胚細胞ヒストンは H3K4me3 と遺伝子プロモーターに排他的に結合し、ES 細胞でのエピゲノム状態の制御に関与することが示唆された。

また、精巣の精細胞での胚細胞ヒストンの発現レベルは、ES細胞に比べはるかに高い。そこで、胚細胞ヒストンの発現レベルが精細胞の分化に伴って、どのように変化するかを解析した。その結果、胚細胞ヒストンの発現は、精原細胞から精母細胞に分化する過程では高く維持されており、相同組換えを経て、精子細胞への分化に伴い低下することが示された。そこで、精母細胞を大量調製し、これを用いて、上記のように Affymetrix 社のマウスプロモーターアレイを用いて、Chip-on-chip アッセイを行なった。精母細胞ゲノム上での胚細胞ヒストンの分布も、ES細胞ゲノム上でのヒストンH3-K27me3とH3K4me3の分布との相関を示唆していた。

#### 2) 胚細胞ヒストンと精細胞分化との関連

胚細胞ヒストンと細胞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である。そこで、両遺伝子を欠損したヘテロ ES 細胞を得、キメラマウスを作製した。2種類の胚細胞ヒストン遺伝子を欠損したヘテロ ES 細胞を用いて作製したキメラマウスのほとんど(雄)は不妊であり、精巣にはほとんど精細胞が観察されなかった。しかし、低いキメリズム(~30%程度)の1系統のキメラマウスから、ごく少数のヘテロ変異マウスを得ることができた。このヘテロマウスを用いて一連の解析を行い、これまでに以下の結果が得られた。1) ヘテロ変異マウ

スには、異常は全く見られなかった。2) ヘテロ変異マウス同士を交配して得られたホモ変異マウス (zygotic 胚細胞ヒストン欠損マウス) には、異常は見られなかった。3) ホモ変異雌マウスとヘテロ変異雄マウスを交配して得られたホモ変異雄マウスは、精子形成の異常が見られた。以上の結果から、maternal 及び zygotic 胚細胞ヒストンが欠損すると、spermatogenesis が正常に進行しないことが示された。このように、ICM に含まれる卵子由来の母性胚細胞ヒストンの量が、精細胞の発生・分化に大きな影響を持つことが分かった。現在、ホモ変異マウス同士の交配で生じる仔の発生を解析しつつある。

### 3) 胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の効率化

私達は、すでに 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ている。そして、種々の発現ベクターを用いた実験から、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と共に、ヒストンがヌクレオソームに導入される効率が重要であることが示唆された。しかし、これまでの条件で得られた ES 細胞様コロニーは、6 週間程度で増殖が停止し、iPS 細胞株を樹立することはできていなかった。そこで、さらに種々の条件を試みた結果、変異ヒストンヒストンシャペロンの利用と、発現ベクターの導入後の細胞培養条件の工夫の2つの条件によって、ES 細胞様コロニーの増殖継続期間が大幅に長くなることを見出した。現在、さらに条件を工夫し、iPS 細胞の作製条件を検討しつつある。

## § 4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ● 論文詳細情報

1. Maekawa T, Kim S, Nakai D, Makino C, Takagi T, Ogura H, Yamada K, Chatton B & Ishii S: Social isolation stress induces ATF-7 phosphorylation and impairs silencing of the 5-HT 5B receptor gene. *EMBO J.* 29, 196-208 (2010). doi:10.1038/emboj.2009.318