

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、卵子および精巣に多量に存在し、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、胚細胞ヒストンによる体細胞のリプログラミングを、特に山中4因子(Oct3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc)と組み合わせることによって検討した。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、胚細胞ヒストンと通常の体細胞ヒストンとに異なるアフィニティで結合する因子を同定し解析した。さらに、胚細胞ヒストンの生理機能を明らかにするため、変異マウスを作製し、その表現系について解析した。今後、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と、その生理機能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

- 胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の効率化
- 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
- 胚細胞ヒストンの生理機能の解析

§3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1) 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、**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(京大・山中教授より供与)から調製した **MEFs** 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すでに観察している。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。さらに、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、リプログラミング効率がさらに上昇する事を見出した。そして、胚細胞ヒストンは山中4因子 (**Oct3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc**)によるリプログラミングを顕著に亢進することが示された。

2) 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

胚細胞ヒストンが体細胞のリプログラミングを誘導する分子メカニズムを明らかにするため、胚細胞ヒストンと通常の体細胞ヒストンに異なるアフィニティで結合する因子の同定を試みた。まず、His タグの付いた胚細胞ヒストン(**H2aa, H2ba**)と体細胞ヒストン (**H2A, H2B**)を大腸菌で発現させ、精製後、ニッケル-Sepharose に結合させ、アフィニティ樹脂を作製した。これに **HeLa** 細胞の抽出液を混合し、洗浄後、結合因子を分離し、**SDS-PAGE** で解析した。そして胚細胞ヒストンと通常の体細胞ヒストンに異なるアフィニティで結合するタンパク質バンドを同定し、それを質量分析によって解析した。また胚細胞ヒストンは、精巣の生殖細胞等で発現が高いことから、マウス精巣抽出液を調製し、同様の解析を行った。胚細胞ヒストンに、より高いアフィニティで結合する因子、又逆に弱いアフィニティで結合する因子が複数同定された。これらの因子の機能から、胚細胞ヒストンは固いクロマチン構造を緩める作用があるのではないかと推定された。

3) 胚細胞ヒストンの生理機能の解析

胚細胞ヒストンの生理機能を理解することは、胚細胞ヒストンによるリプログラミングを理解するために有用である。そのため2種類の胚細胞ヒストン (**H2aa, H2ba**) を共に欠損する変異マウスを作製し、**BALB/c** マウスに5回バッククロスを行い、遺伝的バックグラウンドを揃えたマウスを得て、その表現系を解析した。ホモ変異雄マウスでは、ほとんど成熟精子が検出されず、精巣の重量も顕著に低下していた。精巣の切片を観察した所、多くの変成 **pachytene** 細胞が観察され、また **spermatid** の数はかなり少なく、また観察されたほとんどの **spermatid** は変成していた。これらの結果から変異マウスでは多くの **pachytene** 細胞が分化異常を呈し、**spermatid** に分化した一部の細胞も、そこで分化を停止すると考えられた。

さらに詳細な分子メカニズムを明らかにするため、**SCP1** 抗体と **SCP3** 抗体を用いた免疫染色実

験を行った所、多くのクロモソームで両者の共局在が観察されず、*synapsis* の形成不全が観察された。さらに *spermiogenesis* の段階でも、ヒストンの Transition proteins (TNPs) への置換が正常に行われていないことが示唆された。上記のヒストン結合因子の解析から、胚細胞ヒストンはヘテロクロマチンなどの固いクロマチン構造を弛緩させることが示唆されているので、胚細胞ヒストンはこのクロマチン弛緩作用により、*synapsis* 形成や TNPs への置換に重要な役割を果たすと推定された。

§4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Staton TL, Lazarevic V, Jones DC, Lanser AJ, Takagi T, Ishii S & Glimcher LH: Dampening of death pathways by Schnurri-2 is essential for T cell development. *Nature* 472, 105-109 (2011). DOI: 10.1038/nature09848
2. Nagao M, Saita Y, Hanyu R, Hemmi H, Notomi T, Hayata T, Nakamoto T, Nakashima K, Kaneko K, Kurosawa H, Ishii S, Ezura Y & Noda M: Schnurri-2 deficiency counteracts against bone loss induced by ovariectomy. *J. Cell. Physiol.* 226, 573-578 (2011). DOI: 10.1002/jcp.22521
3. Egoh A, Nosuke Kanesashi S, Kanei-Ishii C, Nomura T & Ishii S: Ribosomal protein L4 positively regulates activity of a *c-myc* proto-oncogene product. *Genes Cells* 15, 829-841 (2010). DOI: 10.1111/j.1365-2443.2010.01421.x
4. Jones DC, Schweitzer MN, Wein M, Sigrist K, Takagi T, Ishii S & Glimcher LH: Uncoupling of growth plate maturation and bone formation in mice lacking both Schnurri-2 and Schnurri-3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 8254-8258. DOI: 10.1073/pnas.1003727107
5. Maekawa T, Jin W & Ishii S: The role of ATF-2 family transcription factors in adipocyte differentiation: antiobesity effects of p38 inhibitors. *Mol. Cell. Biol.* 30, 613-625 (2010). DOI: 10.1128/MCB.00685-09

(4-2) 知財出願

- ①平成22年度特許出願件数(国内 0件)
- ②CREST 研究期間累積件数(国内 0件)