

米田 悦啓

大阪大学大学院・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。人工染色体 (tetO-HAC) へ任意の遺伝子を組込めるように、ニワトリ DT40 細胞での相同組み換えを利用する方法と、人工染色体前駆体 DNA と loxP 配列ベクターを同時にヒト HT1080 細胞へ co-transfection する方法の二通りの手法を用いて loxP 配列を挿入した。Dox を培地から除いたときにヘテロクロマチン化を誘導する tTS 遺伝子 (tetR-SD<sup>kid</sup> 融合蛋白質) の作用により、人工染色体セントロメアの機能破壊を制御できる人工染色体システムを構築する。また、tetO-HAC を人工染色体ベクターとして用いる場合は、tetR-VP16 の転写誘導系は山中 4 因子の誘導に利用出来ない。そこで新たに lacO/lacI-VP16 を用いた iPS 細胞誘導系を構築した。現在、この iPS 細胞誘導カセットを人工染色体 loxP 部位へ組み込む作業を進めている。また、高効率の細胞リプログラミングを達成するために様々な条件検討を行った結果、iPS 細胞誘導において培地の最適化が重要であることが分かった。更に、リプログラミングのタイミングの異なる iPS 細胞を比較した結果、早期のリプログラミングが高品質の iPS 細胞を得るために重要である事が分かった。一方、山中4因子の一つである Oct-4 は POU ファミリーに属する転写因子であり細胞質で翻訳された後に核へと局在化するが、heterokaryon assay を用いて解析を行った結果、Oct-4 はシャトリング活性を有し、核-細胞質間を行き来していることが分かった。そこで Oct-4 に核移行シグナル、或いは核外輸送シグナルを付加した変異体を作製し核-細胞質間の平衡状態を変化させ、そのリプログラミング効率への影響を解析した。その結果、Oct-4 の適度な核-細胞質間の平衡状態がリプログラミングに重要である事が示唆された。

## § 2. 研究実施体制

(1)「米田」グループ(大阪大学)

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

- ・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の解明

(2)「舩本」グループ

① 研究分担グループ長:舩本 寛(財団法人かずさDNA研究所、室長)

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

## §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)

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、高効率な iPS 細胞樹立技術を開発することを目的とする。

研究実施内容:

染色体分配到に必須なセントロメア機能を備えたヒト人工染色体(HAC)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-HAC)の 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破壊され、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、自己完結型の脱落制御可能な人工染色体を開発することを目指す。

研究目的を達成するため、本年度は以下の各項目についての研究計画を実施した。

### 1. 脱落制御可能な人工染色体の作製

人工染色体(tetO-HAC)へ、任意の遺伝子を組込めるように二通りの手法を用いて loxP 配列を挿入した。方法①では tetO-HAC を微小細胞核導入法によりニワトリ DT40 細胞へ移入し、相同組み換えを利用して loxP 配列を tetO-HAC 上へ挿入した<sup>1)</sup>。方法②では、人工染色体前駆体の tetO アルフォイド DNA BAC と loxP 配列ベクターを同時にヒト HT1080 細胞へ

co-transfection し、loxP 配列をもつ人工染色体を作製した。それぞれの人工染色体の構造解析と安定性、脱落制御についての解析を進めている<sup>2)</sup>。Dox を培地から除いたときにヘテロクロマチン化を誘導する tTS 遺伝子 (tetR-SD<sup>kid</sup> 融合蛋白質) の作用により、人工染色体セントロメアの機能破壊を制御できる人工染色体システムを構築する。

## 2. 人工染色体単離法・導入法の開発による iPS 作成の高効率化

脱落制御可能な人工染色体を用いて iPS 細胞誘導を行うためには、この人工染色体を線維芽細胞へ効率良く移入することが重要である。既存の微小細胞核導入法とともに、分裂期人工染色体を単離しリポフェクションにより細胞へ導入する方法の改良を進めた。また、tetO-HAC を人工染色体ベクターとして用いる場合は、tetR-VP16 の転写誘導系は山中 4 因子 (Oct4, SOX2, Klf4, c-Myc) の誘導に利用出来ない。そこで新たに lacO/lacI-VP16 を用いた iPS 細胞誘導系を構築し tetR-VP16 系と同等の iPS 細胞誘導能を確認した。現在、この iPS 細胞誘導カセットを人工染色体 LoxP 部位へ組み込む作業を進めている。

## 3. 高効率な体細胞リプログラミングの条件検討

マウス体細胞からの iPS 細胞誘導に関して様々な条件検討を行った。その結果、高効率のリプログラミングには培地の最適化が重要であることを見出した<sup>3)</sup>。

## 4. リプログラミングのタイミングと iPS 細胞の品質について

iPS 細胞誘導において、レトロウイルスのサイレンシングはリプログラミングの指標のひとつとして用いられている。今回、そのタイミングが異なる iPS 細胞を比較した結果、レトロウイルス感染後、早い段階 (11-14 日後) でサイレンシングを受けた iPS 細胞については安定したものが得られたのに比べ、より遅く (29-34 日後) にサイレンシングを受けたものは、細胞の形態や karyotype に異常が見られる事が分かった。これらのことから、iPS 細胞誘導において早期にリプログラミングを受けることが高品質の iPS 細胞を得るために重要である事が分かった<sup>4)</sup>。

## 5. 細胞リプログラミングにおける核-細胞質間輸送制御の重要性

山中4因子の一つである Oct-4 の細胞内局在に着目し Heterokaryon assay を行った結果、Oct-4 はシャトリング活性を有し、核-細胞質間を行き来している事が分かった。そしてその活性は核外輸送因子 Crm1<sup>5)</sup> の阻害剤であるレプトマイシンBでは阻害されなかったことから、Crm1 非依存的に核外輸送されていることが示唆された。更に Oct-4 に核移行シグナル、或いは核外輸送シグナルを付加した変異体の解析を行った結果、Oct-4 の適度な核-細胞質間の平衡状態がリプログラミング効率に重要である事が示唆された。また、核輸送因子や核膜孔構成因子にはそれぞれ多数の遺伝子が知られているが、それらの中には組織特異的を示し、細胞分化に重要な役割を果たしているものがあること<sup>6)</sup> が分かっている。そこで、リアルタイムPCRを用いて未分化細胞と体細胞でそれらの発現を比較した結果、未分化細胞で高発現を示す複数の因子を見出した。

## §4. 成果発表等

### (4-1) 原著論文発表

#### ●論文詳細情報

1. Iida Y., Kim J-H., Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Hayashi M., Erliandri I., Lee H-S., Samoshkin A., Masumoto H., Earnshaw W.C., Kouprina N., Larionov V., and Oshimura M.: Human Artificial Chromosome with a Conditional Centromere for Gene Delivery and Gene Expression, DNA RESEARCH 17, 293-301, (2010) (DOI:10.1093/dnares/dsq020)
2. Bergmann J.H., Gomez M., Martins N.M.C., Kimura H., Kelly D.A., Masumoto H., Larionov V., Jansen L.E.T. and Earnshaw W.C.: Epigenetic engineering shows H3K4me2 is required for HJURP targeting and CENP-A assembly on a synthetic human kinetochore, EMBO J. 30, 328-340, (2011) (DOI:10.1038/emboj.2010.329)
3. Okada M, Oka M, Yoneda Y. Effective culture conditions for the induction of pluripotent stem cells. Biochim Biophys Acta., 1800, 956-963, (2010) (DOI:10.1016/j.bbagen.2010.04.004)
4. Okada M, Yoneda Y. The timing of retroviral silencing correlates with the quality of induced pluripotent stem cell lines. Biochim Biophys Acta., Biochim Biophys Acta. 1810, 226-235, (2011) (DOI:10.1016/j.bbagen.2010.10.004)
5. Oka M, Asally M, Yasuda Y, Ogawa Y, Tachibana T, Yoneda Y. The mobile FG nucleoporin Nup98 is a cofactor for Crm1-dependent protein export. Mol Biol Cell., 21, 1885-1896, (2010) (DOI: 10.1091/mbc.E09-12-1041)
6. Asally M, Yasuda Y, Oka M, Otsuka S, Yoshimura S, Takeyasu K and Yoneda Y. NUP358, a nucleoporin, functions as a key determinant of the nuclear pore complex structure remodeling during skeletal myogenesis. FEBS J., 278, 610-621, (2010) (DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07982.x)

### (4-2) 知財出願

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