

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. 研究実施体制

(1)「石井」グループ

① 研究代表者: 石井 俊輔 ((独)理化学研究所、主任研究員)

② 研究項目

- ・胚細胞ヒストンによるリプログラミング誘導の効率化
- ・ヒト胚細胞ヒストンによるヒト体細胞のリプログラミング
- ・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

§ 2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

研究のねらい

体細胞核の卵子への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。しかし、その実体は不明である。一方、ヒストンのアセチル化やメチル化などの化学修飾は、エピジェネティック制御を介してリプログラミング過程に重要な役割を果たしている。本研究では、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)に注目して、胚細胞ヒストンによるリプログラミングを解析し、新たな体細胞リプログラミング方法を開発することを目指している。

これまでの研究の概要

2種類の胚細胞ヒストン H2aa と H2ba は卵子と精巣だけでなく、受精卵にも多く存在し、8細胞期までに徐々に消失する。胚細胞ヒストンは、内部細胞塊や ES 細胞でも、少な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。このように胚細胞ヒストンの発現は、細胞の全能性、多分化能と関連しているように見える。2種類の胚細胞ヒス

トン (H2aa と H2ba)と、卵子に存在するヒストンシャペロンであるリン酸化型ヌクレオプラスミン (P-Npm2)を、山中4因子 (Oct3/4, Sox-2, Klf-4, c-Myc) と一緒に MEFs で発現させると、山中4因子だけを発現させた場合に比べ、より早期に、かつ 20 倍の高い効率で iPS 細胞が作製できた。

研究進捗状況と研究成果

胚細胞ヒストンと山中4因子との様々な組み合わせを検討した結果、Klf4とOct3/4だけではiPS細胞は作製できないが、この2つの因子に胚細胞ヒストンとリン酸化型ヌクレオプラスミン (P-Npm2)とを加えると、高い効率でiPS細胞を作製できた。このiPS細胞はES細胞と同様の遺伝子発現パターンを持つ事、Oct3/4、Nanog 遺伝子などのメチル化も顕著に低下していることを確認した。また、この iPS 細胞を用いてキメラマウスを作製し、この iPS 細胞が生殖細胞系列を含む種々の細胞組織に分化できる能力を持つことを確認した。

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。2種類の胚細胞ヒストン遺伝子を欠損する雌マウスは一見正常であったが、産仔数が野生型の約半分に低下していた。また、この雌マウスの卵子から生じた受精卵の約半分は、Blastocyst までの初期発生過程が正常に進まないことが示された。このように卵子の胚細胞ヒストンは初期発生に重要な役割を果たすことが明らかとなった。一方、2種類の胚細胞ヒストン遺伝子を欠損する雄マウスは不妊であった。精巣では、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 pachytene 細胞が分化異常を呈し、spermatid に分化した一部の細胞も、そこで分化を停止していた。詳細な解析の結果、spermiogenesis の段階では、ヒストンの Transition proteins (TNPs) への置換が正常に行われていなかった。また、Meiosis I が終了した後、Meiosis II が正常に進まないことも示された。以上のように、胚細胞ヒストンは初期発生と精子形成におけるゲノムリプログラミングに重要な役割を果たすことが明らかにされた。

今後の見通し

山中教授ら(京大)は、マウス及びヒトの体細胞に、Klf4、Oct3/4、Sox2、c-Myc の4つの遺伝子を強制発現させ、体細胞から iPS 細胞を作製する方法を確立した。これら4つの遺伝子はいずれもES細胞で発現しており、この方法は、ES細胞特異的な転写因子を体細胞に導入することにより、リプログラミングを誘導したものと考えられる。一方、私達のアプローチは、卵子に多量に存在する胚細胞ヒストンを強制発現させ、リプログラミングを誘導するものであり、核移植を真似たものと考えられる。

本研究では、核移植を真似た体細胞のリプログラミング方法の確立を目指しているため、山中4因子なしで、iPS細胞作製を試みたい。これまでのデータでは、まだES細胞に多く発現するKlf4

と Oct3/4 が必要である。卵子に特異的に存在し、受精卵の初期発生に必須の因子を組み合わせることにより、山中4因子なしで、iPS 細胞を作製できるのではないかと期待している。現在いくつかの候補を見出し、検討しつつある。

ノックアウトマウスの解析から、卵子の胚細胞ヒストンは、生殖細胞系列のリプログラミング過程に重要な役割を果たすことが示唆された。自然界では、生殖細胞の形成、受精卵の発生の過程でプログラミングが行われており、この分子メカニズムについては不明な点が多い。胚細胞ヒストンの生理機能のさらに詳細な解析は、この自然界のリプログラミング過程の理解につながると共に、体細胞からの人為的な iPS 細胞の作製方法のさらなる改善につながるものと考えている。

§ 3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. Seong KH, Li D, Shimizu H, Nakamura R & Ishii S. Inheritance of stress-induced, ATF-2-dependent epigenetic change. *Cell* 145, 1049-1061 (2011).
(DOI: 10.1016/j.cell.2011.05.029)
2. 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)

(3-2) 知財出願

- ① 平成 23 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)