

戦略的創造研究推進事業 CREST  
研究領域「人工多能性幹細胞(iPS細胞)作製・  
制御等の医療基盤技術」  
研究課題「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」

## 研究終了報告書

研究期間 平成20年6月～平成26年3月

研究代表者:米田 悦啓  
(独立行政法人医薬基盤研究所、  
研究所長)

## § 1. 研究実施の概要

### (1) 実施概要

#### 研究の目的:

本研究では細胞リプログラミングに適した核-細胞質間物質輸送の場を理解し、その構築を再現させることで、安全で効率の良い iPS 細胞樹立技術を開発することを最終的な目標としている。そこで本研究計画では、細胞リプログラミングや ES 細胞の未分化維持における核-細胞質間物質輸送制御機構の重要性を明らかにするための研究を進めた。これと平行して、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遺伝子挿入による問題点を克服する研究を進めた。

#### 1. 未分化 ES 細胞で高発現する核輸送関連因子群の同定とその役割

核輸送因子や核膜孔構成因子の中には、未分化 ES 細胞で高発現するものがあることがわかった。それらの一つである importin  $\alpha 2$  の解析を行ったところ、importin  $\alpha 2$  には未知の基質認識部位が存在し、さらに、この部位 Oct6 などの神経分化を誘導する転写因子が結合すると核へと輸送されなくなることが明らかになった。一方、未分化維持に働く転写因子である Oct4 は importin  $\alpha 2$  の既知の基質認識部位に結合することで効率よく核へと運ばれた。したがって importin  $\alpha 2$  は複数の基質認識部位を持ち、その使い分けによって、核へと運ぶか否かを決定し、ES 細胞の未分化性を保っていることがわかった。これらの結果から、未分化 ES 細胞で高発現する核輸送因子の重要性を示すことが出来た。

#### 2. Oct4 の核-細胞質間輸送制御と体細胞リプログラミング

細胞リプログラミングや ES 細胞の未分化維持に重要な転写因子である Oct4 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。さらに Oct4 の核-細胞質間輸送の平衡状態を変化させた変異体の機能解析を行った結果、これらの変異体ではリプログラミング効率が大きく低下することが分かった。一方、これらの変異体は野生型と同等の転写活性を保持し、ES 細胞の未分化性を維持する機能を有することが明らかになった。以上の結果から、Oct4 の適度な核-細胞質間局在の平衡状態がリプログラミング効率に重要であり、また、ES 細胞の未分化維持と体細胞リプログラミングにおいて Oct4 が異なる機能を有することが示唆された。

#### 3. 脱落制御可能な人工染色体の作製

インシュレーターで挟んだ遺伝子組込み部位 (loxP 配列) を挿入した人工染色体を作製した。この人工染色体 loxP 部位へ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) 発現カセットを組み込んで、自己脱落制御可能な人工染色体を作製した。実際にこの人工染色体は Dox 含有培地では安定分配維持されるが、培地から Dox を除くとヘテロクロマチンの誘導によりキネトコア構造が破壊され分裂時に細胞から脱落することを明らかにした。そこで、この自己脱落制御可能な人工染色体へ山中4因子 (Oct4, SOX2, Klf4, c-Myc) からなる各種 iPS 細胞誘導遺伝子カセットを組み込み、これら挿入4因子からの多様な発現レベルが誘導可能であることを確認した。

#### 4. 人工染色体導入法の改良と iPS 細胞の誘導

既存の微小細胞核導入法と共に、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2通りの方法を用いて、iPS 細胞誘導遺伝子カセットを組み込んだ人工染色体をマウス胎児線維芽細胞 (MEF) へ導入した。

### (2) 顕著な成果

#### <優れた基礎研究としての成果>

1. 論文: Yasuhara, N., Yamagishi, R., Arai, Y., Mehmood, R., Kimoto, C., Fujita, T., Touma, K., Kaneko, K., Kamikawa, Y., Moriyama, Y., Yanagida, T., Kaneko, H. and Yoneda, Y. Importin alpha subtypes determine differential transcription factor localization in embryonic stem cells maintenance. *Dev. Cell*, 26: 123-135 (2013) (doi: 10.1016/j.devcel.2013.06.022.)

#### 概要:

Importin  $\alpha$  は真核生物の細胞核に、転写因子などの核タンパク質を運び入れる輸送因子で

ある。我々は、ES 細胞で高発現する importin  $\alpha$  2が、複数の基質認識部位を有し、未分化性を維持する転写因子の輸送を促進するだけでなく、細胞分化を誘導する転写因子の核内輸送を阻害することにより細胞の分化を抑制するという、2 つの制御機能を持ち、未分化性を維持していることを初めて明らかにした。

- 論文: Oka, M., Moriyama, T., Asally, M., Kawakami, K. and Yoneda, Y. Differential role for transcription factor Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, 288: 15085-15097 (2013) (doi: 10.1074/jbc.M112.448837.)

概要:

Oct4 は ES 細胞の自己複製・維持や体細胞リプログラミングにおいて重要な働きを持つ転写因子である。我々は、Oct4 の細胞内動態解析により、Oct4 は核-細胞質間をシャトルしていること、更に、Oct4 の核内滞在時間の制御が体細胞リプログラミングには重要であることを明らかにした。これらの結果より、Oct4 は、ES 細胞の自己複製・維持と体細胞リプログラミングにおいてそれぞれ異なる機能を持つという新たな可能性が示唆された。

- 論文: Ohzeki J, Bergmann JH, Kouprina N, Noskov VN, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H. Breaking the HAC Barrier: histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J*, 31(10), 2391-2402, 2012, (doi: 10.1038/emboj.2012.82)

概要:

これまで細胞へ人工染色体前駆体 DNA を導入しても HT1080 細胞など一部の細胞株でしか新規人工染色体形成が起こせなかったが、セントロメア形成機構におけるヒストンアセチル化酵素(HAT)の関与を明らかにし、導入 DNA 上で HAT 活性を制御することにより、これまで人工染色体形成が不可能であった細胞株でも人工染色体形成を可能にした。これにより人工染色体のベクターとしての利用価値が高まった。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 幹細胞研究に利用可能な低分子化合物の開発

概要:

Importin  $\alpha$  2の研究により、転写因子ではなく、その輸送に関わる因子の機能というユニークな切り口から、未知の分化制御系を見出した。importin  $\alpha$  は多様な細胞分化に関わると考えられ、発生・分化研究領域の新たな展開が期待される。また、新たに発見した importin  $\alpha$  2の基質結合領域は、わずか 1 アミノ酸の変異によりその能力を失うことから、幹細胞研究に利用可能な低分子化合物の開発につながると期待できる。

## § 2. 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

### ① 「米田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
米田 悦啓	独立行政法人医薬基盤 研究所	研究所長	H20. 6～
岡 正啓	大阪大学大学院生命機 能研究科生命機能専攻	助教	H20. 6～
安原 徳子	同上	特任助教	H20. 6～
浅利 宗弘	同上	特任研究員	H21. 1～H21. 9
小川 泰	同上	特任研究員	H21. 6～H23. 9
大江 総一	同上	特任研究員	H21. 6～H22. 3
安田 善也	同上	特任研究員	H22. 4～H23. 3
福本 昌宏	同上	特任研究員	H24. 4～H24. 8
永井 理博	同上	特任研究員	H23. 10～H25. 3
上川 泰直	同上	特任研究員	H20. 6～H23. 9
宜保 諒	同上	D3	H20. 6～H21. 3
盛山 哲嗣	同上	特任研究員	H20. 6～
岡田 稔	同上	D1	H20. 12～H23. 3
水口 千彰	同上	D5(リサーチ ア シスタント)	H23. 4～H25. 1
Percival Sangel	同上	D4	H24. 4～
井上 仁美	同上	特任研究員	H21. 4～
山田 幸司	同上	特任研究員	H25. 4～
川村 敬子	同上	技術補佐員	H21. 4～H22. 3

研究項目

- ・細胞分化過程における輸送因子発現パターンの網羅的解析
- ・未分化性誘導輸送因子に結合する新規リプログラミング因子の同定
- ・核輸送因子遺伝子を付加導入した人工染色体による iPS 細胞の高効率化

### ② 「舩本」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
舩本 寛	かずさ DNA 研究所・ホゲ ム研究部・細胞工学研	室長	H20. 6～
大関 淳一郎	同上	研究員	H20. 9～
中野 めぐみ	同上	研究員	H21. 2～H24. 3
大竹 興一郎	名古屋大学大学院理学 研究科(かずさ DNA 研委 託)	D3	H20. 6～H24. 3
平野 みえ	名古屋大学大学院理学 研究科生命理学専攻	助手	H20. 6～H20. 11
池部 智弥	名古屋大学大学院理学 研究科	M1	H20. 6～H21. 3

岡村 佳明	かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究部・細胞工学研	研究員	H21.5～
霜島 司	同上	研究員	H21.5～H24.3
庄野 暢晃	名古屋大学大学院理学研究科（かずさ DNA 研委託）	D3	H21.9～H24.3
飯田 芳文	同上	M1	H21.9～H22.3

#### 研究項目

- ・脱落制御可能な人工染色体の作製
- ・人工染色体の導入除去による iPS 細胞の樹立
- ・人工染色体システムの改良による iPS 作成の高効率化

#### (2)国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

金子寛生教授(日本大学・文理学部、物理生命システム科学科)との共同研究により、核輸送因子の機能解析に関し、計算構造生物学的手法を用いた研究と連携しながら進めている。また、本グループが作製した人工染色体 (tetO-HAC)は、co-transfection 法により loxP(lox71)配列を挿入して HAC を得る方法以外にも、鳥取大押村教授らとの共同研究により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換えによる方法でも loxP 配列が挿入された (Iida et al. DNA Res, 2010)。この loxP 配列挿入 tetO-HAC は米国 NIH の Vladimir Larionov 博士との共同研究でヒト DNA 損傷修復欠損細胞における遺伝子治療のモデル研究や転写、染色体不安定性の研究などに利用されている (Kim et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011; Lee H-S et al. BioMed Central Cancer, 2013; Lee NC et al. Cell Mol Life Sci, 2013)。

### § 3. 研究実施内容及び成果

#### (1) ES 細胞未分化維持、および細胞リプログラミング過程における核-細胞質間物質輸送制御機構の重要性 (大阪大学、米田グループ)

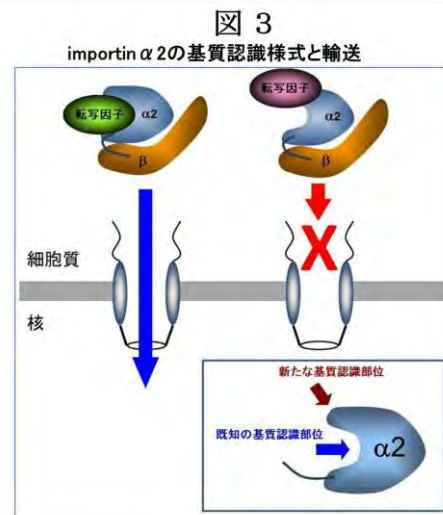
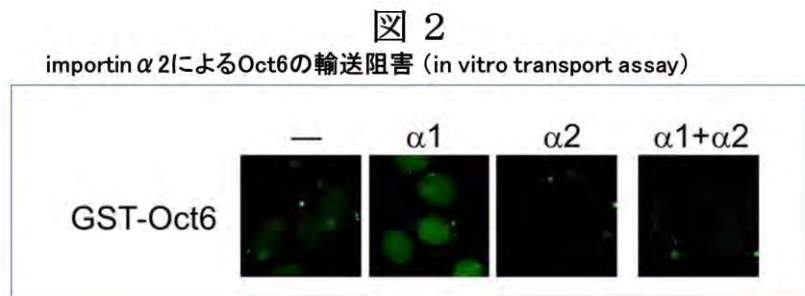
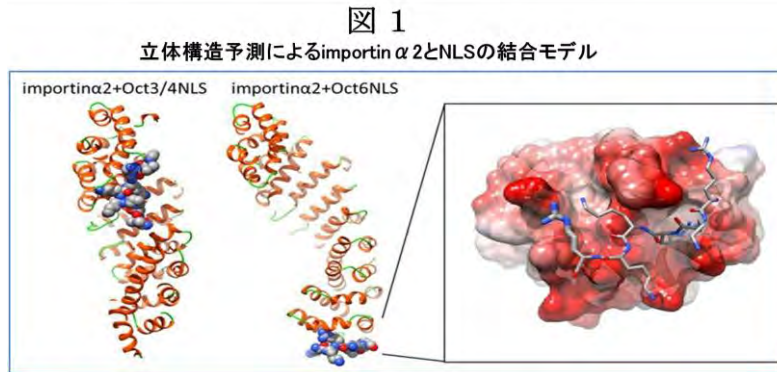
##### 1. Importin $\alpha 2$ による未分化 ES 細胞の新規維持機構の解明

これまでに、核輸送因子の一つである importin  $\alpha 2$  が未分化な ES 細胞で高く発現し細胞分化に伴って発現が低くなること、また、importin  $\alpha 2$  の発現は ES 細胞の未分化性維持に必要であり、その発現低下は分化を誘導することがわかっていた。しかしながら、importin  $\alpha 2$  がどのように細胞の未分化性維持に関わるのかは不明であった。本研究では、ES 細胞を用いた解析から得られた情報を手掛かりに、コンピューターシミュレーションを用いた立体構造予測によって、importin  $\alpha 2$  に未知の基質認識部位が存在することを発見した(図1, Yasuhara et al., Dev. Cell, 2013)。さらに、この部位に分化を誘導する Oct6 などの転写因子が結合すると核へと運ばれることがわかった(図2)。また、野生型の importin  $\alpha 2$  を恒常的に発現させた ES 細胞は、

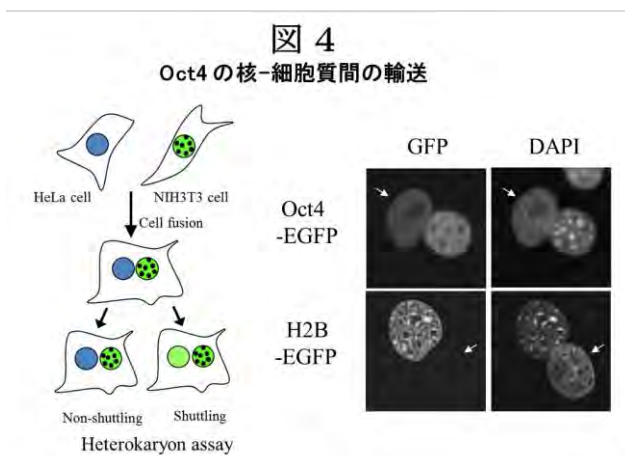
分化させても未分化性を維持することが分かった。Oct6 結合部位にアミノ酸置換を加えた変異型 importin  $\alpha 2$  では、分化への影響は見られなかった。したがって、importin  $\alpha 2$  の輸送阻害活性により、ES 細胞の未分化性が保たれることが明らかとなった。一方、未分化性維持に働く転写因子である Oct3/4 は新たに見つかった基質認識部位ではなく、既知の基質認識部位に結合することで効率よく核へと運ばれた。これらの結果から、importin  $\alpha 2$  は複数の基質認識部位を持ち、転写因子の種類によってその部位を使い分けることにより、核へ運ぶか否かを決定し、ES 細胞の分化・未分化性の運命決定に関与していることがわかった(図3)。

##### 2. Oct4 の核-細胞質間輸送制御と体細胞リプログラミング

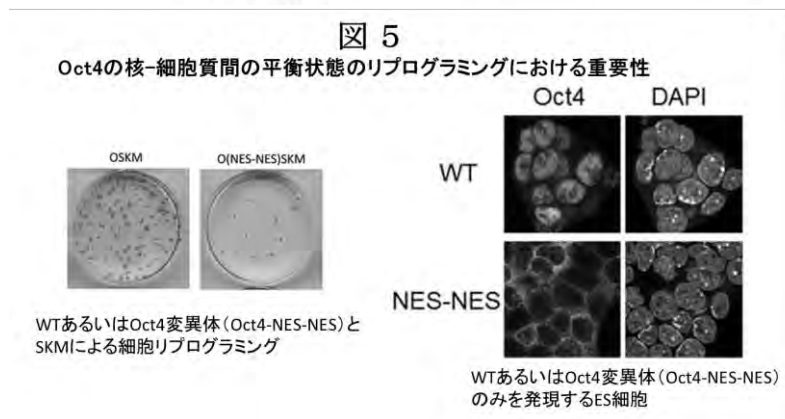
山中4因子の一つである Oct4 の細胞内局在に着目し Heterokaryon assay を行った結果、Oct4 はシャトリング活性を有し、核-細胞質間を行き来している事が分かった(図4)。また、DNA 結合ドメインを欠失した変異体では、その核外輸送の効率が大きく上昇することが分かった。これらの結果を受けて、Oct4 の核-細胞質間輸送の平衡状態を変化させるために Oct4 に核移行シグナル、或いは核外輸送シグナルを付加した変異体を作成して解析を行った結果、これらの変異体ではプロ



グラミング効率が大きく低下することが分かった(図5, Oka et al., JBC, 2013)。次に、これらの Oct4 変異体の転写活性や ES 細胞の未分化状態の維持における機能について解析した。レポーター遺伝子アッセイの結果から、これらの Oct4 変異体も野生型と同様の転写活性を保持すること、そして、転写活性とリプログラミング活性は必ずしも一致していないことが明らかになった。また、ZHBTC4 細胞(理研・丹羽先生より供与)を用いた実験により、変異型

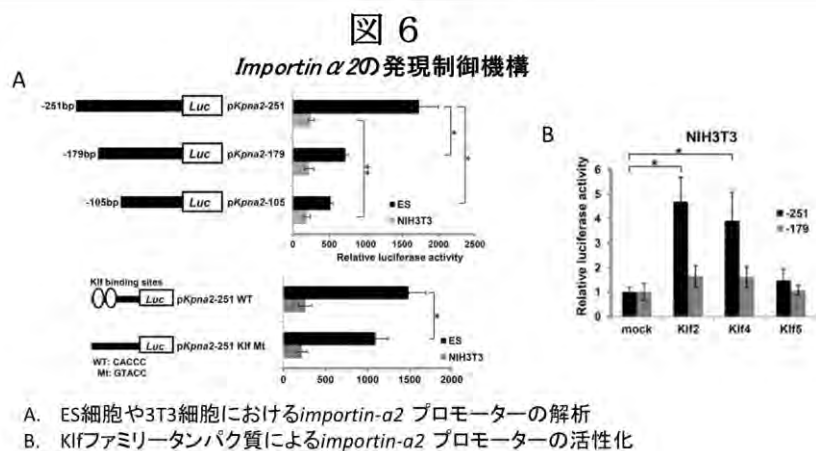


Oct4 のみを発現させた場合でもアルカリフォスファターゼ、Nanog 陽性の細胞を維持できることが分かった。さらに変異型 Oct4 のみを発現させた ES 細胞が、野生型と同程度の増殖能を示すことが分かった。以上の結果から、Oct4 の適度な核-細胞質間局在の平衡状態がリプログラミング効率に重要である事が明らかになった(図5)。また、ES 細胞の未分化維持と体細胞リプログラミングにおいて Oct4 は異なる機能を有することが初めて示唆された。



### 3. 未分化細胞で高発現する核輸送関連因子群の同定とその体細胞リプログラミング、未分化維持における役割

核輸送因子(importin/exportin)や核膜孔構成因子(nucleoporin)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な発現を示し、さらに、細胞分化に重要な役割を果たしているものがあることが分かっている(Asally et al. FEBS J., 2011)。そこで、リアルタイムPCRやウエスタンブロッティングにより未分化 ES 細胞と体細胞(MEF)でそれらの mRNA、タンパク質の発現を比較した結果、未分化 ES 細胞で高発現を示す複数の因子を見出した。核輸送因子 importin  $\alpha$  ファミリーに関しては、多くの importin  $\alpha$  において mRNA 及びタンパク質レベルで MEF と ES 細胞で発現に変化は見られなかったものの、importin  $\alpha 2$  の発現が MEF に比べ未分化 ES 細胞で顕著に高いことが分かった(未発表)。さらに、機能的に ES 細胞の未分化維持に重要であることが分



かった(上記、実施内容1参照)。そこで importin  $\alpha 2$  に関しては、そのプロモーター解析を行った。その結果、プロモーター上流の Krüppel-like factor (Klf) 結合配列が ES 細胞における高発現に重要であることが分かった(図6, Kamikawa et al. Exp Cell Res., 2011)。また、Klfファミリーのうち、Klf2 および Klf4 が機能的に重複しながら importin  $\alpha 2$  の高発現を維持していることが分かった。さらに、importin  $\alpha 2$  は輸送因子として働くだけではなく、核内で転写制御にかかわっていることが明らかとなった(Yasuda et al. EMBO J., 2012)。一方、通常、細胞質に存在する importin  $\alpha 2$  が核内に集積すると細胞の老化がもたらされることがわかった(Nagai et al. BBA, 2013)。また、輸送因子 importin  $\alpha 2$  は核膜孔構成因子の一つである Nup153 と結合し、importin  $\alpha / \beta$  依存的なタンパク質の核膜孔通過を促進していることが分かった(Ogawa et al., Traffic, 2012)。

つぎに、importin  $\alpha 2$  を含むすべての importin  $\alpha$  アイソフォームをそれぞれ山中4因子(Oct4, SOX2, Klf4, c-myc)と共に MEF 細胞に導入し、iPS 細胞の誘導効率を比較した。その結果、importin  $\alpha 2$  を共発現させることによる影響はほとんど見られなかったのに対し、importin  $\alpha 5$  を共発現させると iPS 細胞の誘導効率が上昇する事が分かった。Importin  $\alpha 5$  は未分化 ES 細胞でも MEF 細胞とほぼ同レベル発現しているが、更にその発現を上昇させることで細胞リプログラミングの効率に影響を与えることがわかった。また、importin  $\alpha$  アイソフォームはそれぞれ基質特異性を示すことから、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重要性が示唆された。ES 細胞で高発現を示す複数の importin  $\beta$  ファミリー遺伝子に関しては、それらをノックダウンすると、Oct4 が抑制されると共に SOX2 が誘導されるもの(IPO7)、Oct4 が誘導されると共に SOX2 が抑制されるもの(RanBP17, XPO4)があり、さらに、それぞれのノックダウンが ES 細胞の neural ectoderm や mesoendoderm への分化に異なる影響を及ぼすことが分かった(Sangel et al., FEBS Open Bio, 2014)。

#### 4. 体細胞リプログラミングの培養条件とリプログラミングのタイミングの重要性について

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(Okada et al. BBA, 2011)。

また、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が、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。以上のことから、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(Okada and Yoneda. BBA, 2011)。



## (2) 脱落制御可能な人工染色体を用いた iPS 細胞の作製(かずさ DNA 研究所 舛本グループ)

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(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。本研究では、この人工染色体の分配機能(セントロメア機能)を適切なタイミングで破壊し、細胞から脱落させることができるベクターシステムの開発を進めた。この脱落制御可能な人工染色体ベクターを用いることにより、レトロウイルスベクターを用いた iPS 細胞樹立法の問題点を克服し、本来の染色体に変異を与えない安全な iPS 細胞樹立を目標とし、研究を進めてきた。

### 1. 脱落制御可能な人工染色体の作製

#### ・LoxP サイトを持つ人工染色体の作成

相同組み換えを利用する手法により、既に構築済みの 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、loxP 配列を tetO-HAC 上へ挿入した(Iida et al. DNA Res, 2010)。この人工染色体は、ヒト細胞における遺伝子治療のモデル研究に利用されている(Kim et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011)。また、これとは別に tetO 配列を組込んだ人工染色体前駆体合成反復 DNA と変異型 loxP 配列(lox71)を含んだベクターを HT1080 細胞へ co-transfection 法により導入し、tetO-HAC 保有細胞株を得た。これらのうち解析した 9 株全てで、tetO-HAC に lox71 カセットが組込まれていることを確認した。

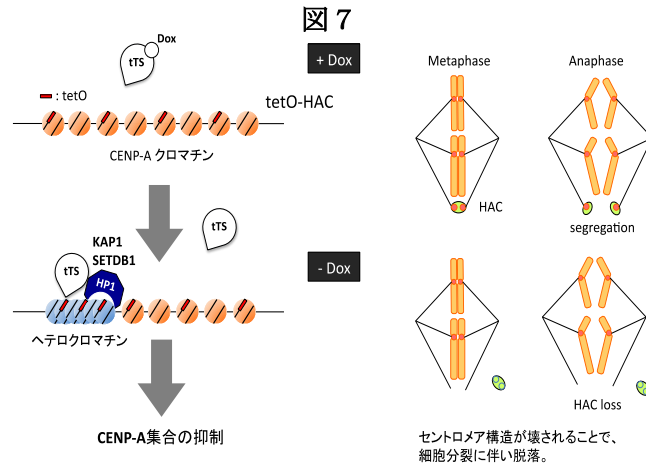
#### ・自己脱落制御人工染色体の構築

さらに、これらの tetO-HAC の lox71 部位へ、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)を組込んだ tetO-HAC を作製した。この tTS 発現カセット搭載 tetO-HAC を用いることで、Dox を培地から除くだけの操作で人工染色体のセントロメアクロマチン(CENP-A)の破壊による不安定化が起こり自己完結型の脱落制御可能な人工染色体ベクターシステムが構築できたことになる(図7)。また、これまでに、脱落制御可能な人工染色体構築のベースとなる反復配列とクロマチン構造との関連について解析し

(Kim et al. Genome Res. 2009)、脱落制御(セントロメア機能破壊)へ繋がる詳しいメカニズムを明らかにした(Cardinare et al. MBC, 2009; Bergmann et al. EMBOJ, 2011)。

そこで実際に、この tTS 発現カセット搭載 tetO-HAC 株を用い、人工染色体の自己脱落制御を確認した。

これらの結果から、培地中の Dox 濃度を制御するだけで、tetO-HAC から発現する tTS による自己脱落制御も可能であるという新たな人工染色体システムが開発できた。



### 2. 人工染色体の導入除去による iPS 細胞の樹立(舛本グループ・米田グループ)

#### ・lacO/lacI-VP16 系の開発 (追加項目)

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因子の発現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、人工染色体へ繋ぐ前に先ずこの構築をレトロウイルスベクターに繋いで tetO/tetR-VP16 (tTA) 系と iPS 細胞誘導効率を比較した。その結果、tetO/tetR-VP16 系に比べ半分近くまで効率は低下するものの、lacO/lacI-VP16 系を用いた場合でも tetO/tetR-VP16 系に匹敵する iPS 細胞誘導能があるシステムを構築できた(図12)。更に、得られた iPS 細胞におけるウイルスコピー数を調べたところ、これら発現誘導系では、レトロウイルスの挿入コピー数が非誘導系より一桁近く低くても、より効率よく iPS 細胞を誘導できることを示す非常に興味深い結果を得た。

これらの結果は、lacO/lacI-VP16 を用いた iPS 細胞誘導カセットを人工染色体に組込む場合も低コピーで十分に iPS 細胞を誘導できる可能性を示唆するものである。

・人工染色体を用いた iPS 細胞の作製

先の結果を受け、個々の因子をそれぞれ別の CAG プロモーターから発現させるものと、lacO/lacI-VP16 を用いた iPS 細胞誘導カセットを搭載した人工染色体を構築した。これらの人工染色体を MEF 細胞へ導入し、iPS 細胞誘導を行った。この結果から、人工染色体の MEF 細胞への導入には成功していることが明らかとなった。また、得られた株については、リプログラミング因子が発現していた。これらの結果から、人工染色体の MEF への導入やリプログラミング因子の発現は達成できているが、iPS 細胞へのリプログラミングや増殖能獲得にはまだ十分と言えるレベルにまでは達していないと考えられる。この問題を克服するため、現在、人工染色体の導入法の効率向上やリプログラミング因子の発現効率を向上させる改良を進めている。

### 3. 人工染色体システムの改良による iPS 作成の高効率化(舛本グループ)

・改良型人工染色体の開発、及び人工染色体単離法・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(tetO-HAC)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法により、直接人工染色体を細胞へ導入する方法の改良を進めた。直接導入法でも従来法より約一桁効率よく安定に人工染色体を不死化 MEF(iMEF)細胞へ移植することが可能になった。

これまでの結果から、(1)任意の遺伝子カセット搭載可能な tetO-HAC の作製、(2)tetO-HAC の自己脱落制御の確認、(3)lacO/lacI-VP16 系を用いた iPS 細胞誘導カセットの構築、(4) iPS 細胞誘導人工染色体の MEF への導入までの成果が得られており、脱落制御可能な人工染色体を用いた iPS 細胞の作製までに必要な技術開発がほぼ完了したと考えている。人工染色体を用いた iPS 細胞の作製については、(5)人工染色体導入効率の改善が達成されているが、iPS 細胞誘導効率の低さとの兼ね合いから、当初の計画よりも長い期間が必要となってしまっている。しかしながら、人工染色体導入 MEF コロニーがコンスタントに得られ始めたことと、HAC 上のリプログラミング因子の発現がすでに確認できていることから、今後は各操作の精度と効率をあげることで iPS 細胞誘導の達成も十分可能であると考えられる。また、iPS 細胞誘導と共に人工染色体の脱落誘導も進める。

#### § 4. 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 0件、国際(欧文)誌 34件)

1. Kim JH, Ebersole T, Kouprina N, Noskov VN, Ohzeki J, Masumoto H, Mravinac B, Sullivan BA, Pavlicek A, Dovat S, Pack SD, Kwon YW, Flanagan PT, Loukinov D, Lobanenko V and Larionov V. Human gamma-satellite DNA maintains open chromatin structure and protects a transgene from epigenetic silencing. *Genome Res.*, **19**, 533-544, (2009) (DOI: 10.1101/gr.086496.108)
2. Cardinale S, Bergmann JH, Kelly D, Nakano M, Valdivia MM, Kimura H, Masumoto H, Larionov V and Earnshaw WC. Hierarchical inactivation of a synthetic human kinetochore by chromatin modifiers. *Mol. Biol. Cell*, **20**, 4194-4204, (2009) (DOI:10.1091/mbc.E09-06-0489)
3. Mehmood R, Yasuhara N, Oe S, Nagai M and Yoneda Y. Synergistic nuclear import of NeuroD1 and its partner transcription factor, E47, via heterodimerization. *Exp. Cell Res.*, **315**, 1639-1652, (2009) (DOI:10.1016/j.yexcr.2009.02.025)
4. Ogawa Y, Miyamoto Y, Asally M, Oka M, Yasuda Y and Yoneda Y. Two isoforms of Nup60 (Nup50) differentially regulate nuclear protein import. *Mol. Biol. Cell*, **21**, 630-638, (2010) (DOI:10.1091/mbc.E09-05-0374)
5. Iida Y, Kim JH, Kazuki Y, Hoshiya H, Takiguchi M, Hayashi M, Erliandri I, Lee HS, Samoshkin A, Masumoto H, Earnshaw WC, Kouprina N, Larionov V and Oshimura M. Human Artificial Chromosome with a Conditional Centromere for Gene Delivery and Gene Expression. *DNA Res.*, **17**, 293-301, (2010) (DOI:10.1093/dnares/dsq020)
6. Bergmann JH, Rodríguez MG, Martins NM, Kimura H, Kelly DA, Masumoto H, Larionov V, Jansen LE and Earnshaw WC. 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)
7. Okada M, Oka M and 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)
8. Okada M and Yoneda Y. The timing of retroviral silencing correlates with the quality of induced pluripotent stem cell lines. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1810**, 226-235, (2011) (DOI:10.1016/j.bbagen.2010.10.004)
9. Oka M, Asally M, Yasuda Y, Ogawa Y, Tachibana T and 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)
10. 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)
11. Nagai M, Moriyama T, Mehmood R, Tokuhiko K, Ikawa M, Okabe M, Tanaka H and Yoneda Y. Mice lacking Ran Binding Protein 1 are viable and show male infertility. *FEBS Lett.*, **585**, 791-796, (2011) (DOI:10.1016/j.febslet.2011.02.002)
12. Moriyama T, Nagai M, Oka M, Ikawa M, Okabe M and Yoneda Y. Targeted disruption of one of the importin-alpha family members leads to female functional incompetence in delivery. *FEBS J.*, **278**, 1561-1572, (2011) (DOI:10.1111/j.1742-4658.2011.08079.x)
13. Sekimoto T, Miyamoto Y, Arai S and Yoneda Y. Importin-alpha protein acts as a negative regulator for Snail protein nuclear import. *J. Biol. Chem.*, **286**, 15126-15131, (2011) (DOI: 10.1074/jbc.M110.213579)
14. Kamikawa Y, Yasuhara N and Yoneda Y. Cell type-specific transcriptional regulation of the gene encoding importin-alpha 1. *Exp. Cell Res.*, **317**, 1970-1978,

- (2011) (DOI:10.1016/j.yexcr.2011.05.024)
15. Mehmood R, Yasuhara N, Fukumoto M, Oe S, Tachinbana T and Yoneda Y. Cross talk between distinct nuclear import pathways enables efficient nuclear import of E47 in conjunction with its partner transcription factors. *Mol. Biol. Cell*, **22**, 3715-3724, (2011) (DOI:10.1091/mbc.E10-10-0809)
  16. Yasuda Y, Miyamoto Y, Yamashiro T, Asally M, Masui A, Loveland KL and Yoneda Y. Nuclear retention of importin-alpha coordinates cell fate through changes in gene expression. *EMBO J.*, **31**, 83-94, (2011) (DOI:10.1038/emboj.2011.360)
  17. Kim JH, Kononenko A, Erliandri I, Kim T, Nakano M, Iida Y, Barrett CJ, Oshimura M, Masumoto M, Earnshaw WC, Larionov V and Kouprina N. Human Artificial Chromosome (HAC) vector with a conditional centromere for correction of genetic deficiencies in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **108**, 20048-20053, (2011) (DOI:10.1073/pnas.1114483108)
  18. Ohzeki J, Bergmann JH, Kouprina N, Noskov V, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V and Masumoto H. Breaking the HAC Barrier: Histone H3K9 acetyl/methyl balance regulates CENP-A assembly. *EMBO J.*, **31**, 2391-2402, (2012) (DOI:10.1038/emboj.2012.82)
  19. Ogawa Y, Miyamoto Y, Oka M, and Yoneda Y. The interaction between importin-alpha and Nup153 promotes importin-alpha/beta-mediated nuclear import. *Traffic*, **13**, 934-946, (2012) (DOI:10.1111/j.1600-0854.2012.01367.x)
  20. Nagai M and Yoneda Y. Downregulation of the small GTPase Ras-related nuclear protein accelerates cellular aging. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1830**, 2813-2819, (2012) (DOI: 10.1016/j.bbagen.2012.11.001)
  21. Gross S, Catez F, Masumoto H and Lomonte P. Centromere Architecture Breakdown Induced by the Viral E3 Ubiquitin Ligase ICP0 Protein of Herpes Simplex Virus Type 1. *PLoS ONE*, **7** e44227, (2012) (DOI:10.1371/journal.pone.0044227)
  22. Kouprina N, Samoshkin A, Erliandri I, Nakano M, Lee H-S, Fu H, Iida Y, Aladjem M, Oshimura M, Masumoto M, Earnshaw WC and Larionov V. Organization of Synthetic Alphoid DNA Array in Human Artificial Chromosome (HAC) with a Conditional Centromere. *ACS Synth. Biol.*, **1**, 590-601, (2012) (DOI:10.1021/sb3000436)
  23. Fujiki R, Sato A, Hata K, Tashiro F, Yasuhara N, Miyazaki J, Yoneda Y, Fujitani M, Yamashita T. Improvement in protocol to generate homogeneous glutamatergic neurons from mouse embryonic stem cells reduced apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **430**, 604-609, (2013) (DOI:10.1016/j.bbrc.2012.11.106)
  24. Tachiwana H, Miya Y, Shono N, Ohzeki J, Osakabe A, Otake K, Larionov V, Earnshaw WC, Masumoto H\* and Kurumizaka H\*, Nap1 regulates proper CENP-B binding to nucleosomes. *Nucleic. Acid. Res.*, **41**, 2869-2880, (2013) (DOI:10.1093/nar/gks1464)
  25. Lee H-S, Lee NC, Grimes BR, Samoshkin A, Kononenko AV, Bansal R, Masumoto H, Earnshaw WC, Kouprina N, Larionov V\*. A new assay for measuring chromosome instability (CIN) and identification of drugs that elevate CIN in cancer cells. *BMC Cancer*, **13**, 252, (2013) (DOI:10.1186/1471-2407-13-252)
  26. Lee NC, Kononenko AV, Lee H-S, Tolkunova EN, Liskovych MA, Masumoto H, Earnshaw WC, Tomilin AN, Larionov V and Kouprina N, Protecting a transgene expression from the HAC-based vector by different chromatin insulators. *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**:3723-37, (2013) (DOI:10.1007/s00018-013-1362-9)
  27. Morita M, Kuba K, Ichikawa A, Nakayama M, Katahira J, Iwamoto R, Watanabe T, Sakabe S, Daidoji T, Nakamura S, Kadowaki A, Ohto T, Nakanishi H, Taguchi R, Nakaya T, Murakami M, Yoneda Y, Arai H, Kawaoka Y, Penniger JM, Arita M and Imai Y. The lipid mediator protectin D1 inhibits influenza virus replication and improves severe influenza. *Cell*, **153**: 112-125 (2013) (DOI:10.1016/j.cell.2013.02.027)

28. Tanaka S, Nakano K, Sekimoto T, Oka M and Yoneda Y. Cell density- dependent nuclear accumulation of ELK3 is involved in suppression of PAI-1 expression. *Cell Struct. Funct.* **38**: 145-154 (2013) (DOI:10.1247/csf.13007)
29. Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K and Yoneda Y. Differential role for transcription factor Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells. *J. Biol. Chem.*, **288**: 15085-15097 (2013) (DOI:10.1074/jbc.M112.448837.)
30. Katahira J, Okuzaki D, Inoue H, Yoneda Y, Maehara K and Ohkawa Y. Human TREX component Thoc5 affects alternative polyadenylation site choice by recruiting mammalian cleavage factor 1. *Nucleic Acids Res.*, **41**: 7060-7072 (2013) (DOI:10.1093/nar/gkt414)
31. Young JC, Ly-Huynh JD, Lescesen H, Miyamoto Y, Browne C, Yoneda Y, Koopman P, Loveland KL, Jans DA. The Nuclear import factor importin  $\alpha$ 4 can protect against oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research*, **1833**: 2348-2356 (2013) (DOI:10.1016/j.bbamcr.2013.06.007)
32. Mizuguchi-Hata C, Ogawa Y, Oka M and Yoneda Y. Quantitative regulation of nuclear pore complex components by O-GlcNAcylation. *Biochim. Biophys. Acta-Molecular Cell Research*, **1833**:2682-2689 (2013) (DOI:10.1016/j.bbamcr.2013.06.008)
33. Yasuhara N, Yamagishi R, Arai Y, Mehmood R, Kimoto C, Fujita T, Touma K, Kaneko K, Kamikawa Y, Moriyama Y, Yanagida T, Kaneko H and Yoneda Y. Importin alpha subtypes determine differential transcription factor localization in embryonic stem cells maintenance. *Dev. Cell*, **26**: 123-135 (2013) (DOI:10.1016/j.devcel.2013.06.022)
34. Sangel P, Oka M, Yoneda Y. The role of Importin- $\beta$ s in the maintenance and lineage commitment of mouse embryonic stem cells. *FEBS Open Bio.*, **4**:112-120 (2014) (DOI:10.1016/j.fob.2014.01.001)

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Masumoto H, Okada T, and Okamoto Y. Human Artificial Centromeres: De novo assembly of functional centromeres on human artificial chromosomes. in "The Kinetochore: from Molecular Discoveries to Cancer Therapy". Eds. De Wulf P., and Earnshaw W.C. Springer Publ. New York. pp. 107-132 (2008)
2. Yasuhara N, Oka M and Yoneda, Y. The role of the nuclear transport system in cell differentiation. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **20**, 590-599, (2009)
3. 舛本寛:セントロメア形成を決定するクロマチン集合バランス、*生体の科学*: **62**:458-459 (2011)
4. Kouprina N, Earnshaw WC, Masumoto H, and Larionov V: A new generation of human artificial chromosomes for functional genomics and gene therapy. *Cell. Mol. Life Sci.*, **70**, 1135-1148, (2012) (DOI:10.1007/s00018-012-1113-3)
5. Bergmann JH, Martins NM, Larionov V, Masumoto H, Earnshaw WC. HAcKING the Centromere Chromatin Code: insights from Human Artificial Chromosomes *Chromosome Res.* **20**, 505-519, (2012) (DOI:10.1007/s10577-012-9293-0)
6. Nagai M, and Yoneda Y. The small GTPase Ran and Ran-binding proteins. *Biomol. Concepts* **3**, 307-318, (2012) (DOI: 10.1515/bmc-2011-0068).
7. Miyamoto Y, Loveland KL, Yoneda Y. Nuclear importin  $\alpha$  and its physiological importance. *Commun. Integr. Biol.*, **5**, 220-222, (2012) (DOI:10.4161/cib.19194)
8. Sekimoto T and Yoneda Y. Intrinsic and extrinsic negative regulators of nuclear protein transport processes. *Genes Cells.* **17**, 525-35, (2012) (DOI:10.1111/j.1365-2443.2012.01609.x)
9. Earnshaw WC, Allshire RC, Black BE, Bloom K, Brinkley BR, Brown W, Cheeseman IM, Choo KHA, Copenhaver GP, DeLuca JG, Desai A, Diekmann S,

Erhardt S, Fitzgerald-Hayes M, Foltz D, Fukagawa T, Gassmann R, Gerlich DW, Glover DM, Gorbsky GJ, Harrison SC, Heun P, Hirota T, Jansen LET, Karpen G, Kops GJPL, Lampson MA, Lens SM, Losada A, Luger K, Maiato H, Maddox PS, Margolis RM, Masumoto H, McAinsh AD, Mellone BG, Meraldi P, Musacchio A, Oegema K, O'Neill RJ, Salmon ED, Scott KC, Straight AF, Stukenberg PT, Sullivan BA, Sullivan KF, Sunkel CE, Swedlow JR, Walczak CE, Warburton PE, Westermann S, Willard HF, Wordeman L, Yanagida M, Yen TJ, Yoda K, and Cleveland DW. Esperanto for histones: CENP-A, not CenH3, is the centromeric histone H3 variant. *Chromosome Res.*, **21**, 101-106, (2013) (DOI 10.1007/s10577-013-9347-y)

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 14 件、国際会議 11 件)

1. Yoneda, Y. "Nuclear protein import and its significance to cell function" 2nd International SOX Meeting, September 16-19, 2008, Hyogo JAPAN
2. Masumoto H, Okada T, Ohzeki J, Nakano M and Larionov V: A Dynamic Assembly Balance of CENP-A Chromatin or Heterochromatin for Centromere Activity on Alpha-satellite Repeats. EMBO Workshop Chromosome Segregation: Centromeres and Kinetochores, Arcachon, Bordeaux, France, 28 Sept, 2008
3. 米田悦啓 「核—細胞質間蛋白質輸送と高次生命機能」 第6回日本糖鎖科学コンソーシアムシンポジウム 平成20年12月3日、東京
4. 米田悦啓 「核蛋白質輸送と生命機能」 BMB2008 第31回日本分子生物学会年会・第81回日本生化学会大会合同大会 平成20年12月9日～12日、神戸
5. 舛本寛、中野めぐみ、大関淳一郎、岡田晃明、V. Larionov、依田欣哉、W. C. Earnshaw セントロメア機能形成に関わるダイナミックなクロマチン集合バランス 第31回日本分子生物学会年会、神戸、2008年12月9-12日(シンポジウム発表)
6. Masumoto H, Ohzeki J, Nakano M, Okada T, Larionov V and Earnshaw WC: Dynamic Assembly mechanism of Centromere Chromatin and Heterochromatin on Human Satellite DNA. The 24th Naito Conference on "Nuclear Dynamics and RNA [II]" 25 June, Sapporo, 2009
7. 舛本寛: ヒト人工染色体形成メカニズムの解明: ベクターとしての利用に向けて、第9回遺伝子・デリバリー研究会、福岡、2009年9月7日(招待セミナー)
8. Yoneda, Y.: Nuclear protein transport and cell function.(Plenary talk) 7th Annual Scientific Meeting of ARC Centre of Excellence in Biotechnology and Development, Kalorama, Victoria, Australia, September 7-8, 2009
9. Masumoto H: A Dynamic Assembly Balance of Centromere Chromatin and Heterochromatin on Alpha-satellite DNA. The American Society of Human Genetics The 59th Annual Meeting, in The Invited Session "Epigenetics of human centromere formation", Honolulu, Hawaii, 20 Oct. 2009.
10. 舛本寛 コンディショナルセントロメアを持つ人工染色体、第82回日本遺伝学会大会、札幌、2010年9月22日
11. 米田悦啓 「核—細胞質間分子輸送機構から見た高次生命機能制御」、第2回シグナルネットワーク研究会、千里ライフサイエンスセンター、大阪、平成22年5月14日～15日
12. 米田悦啓 「核—細胞質間蛋白質輸送から見た高次生命機能」、第69回日本癌学会学術総会、大阪国際会議場、大阪、平成22年9月22日～24日
13. Yoneda, Y. "Nuclear protein import machinery and cell differentiation", BMB2010, Kobe, December 7-10, 2010
14. Masumoto H, Ohzeki J, Nakano M, Bergmann J, Noskov V, Kouprina N, Earnshaw WC and Larionov V: A chromatin assembly balance determines the fate of de novo kinetochore or heterochromatin formation on satellite DNA. EMBO Workshop on Chromosome Segregation and Aneuploidy, Edinburgh, 19 - 23 June 2010

15. Masumoto H: A chromatin assembly balance determines the fate of de novo kinetochore or heterochromatin formation on satellite DNA. The MEXT International Workshop 'Mitosis: Cell Proliferation Control', Tokyo, 8 November 2010
16. Yoneda Y.: "Nucleocytoplasmic protein transport and cell differentiation", International Symposium on Organelle Network: Interface among Infection-Immunity, Cell Biology and Glycobiology, Osaka, April 12-13, 2010
17. Yoneda Y.: "Nucleocytoplasmic transport and cell differentiation", OzBio2010, 12th IUBMB and 21st FAOBMB, Melbourne, Australia, September 26-October 1, 2010
18. Yoneda Y.: "Nucleocytoplasmic transport machineries and cell functions", Association of Pacific Rim Universities (APRU) Research Symposium on the Interface between Molecular Biology and Nano-Biology, Kyoto, November 24-26, 2010
19. Masumoto H, Ohzeki J, Nakano M, Noskov VN, Kouprina N, Earnshaw WC and Larionov V: Heterochromatin assembly balance determines the fate of de novo kinetochore formation on satellite DNA, 第63回日本細胞生物学会大会, 札幌, 6月27日-29日(ミニシンポジウム), (2011)
20. 舛本寛: ヒト人工染色体を創って調べる。第84回日本生化学会大会 9月21-23日京都 (シンポジウム招待)
21. Masumoto H, Ohzeki J, Nakano M, Kouprina N, Larionov V and Earnshaw WC: Chromatin assembly balance determines the fate of de novo kinetochore formation on satellite DNA, 第34回日本分子生物学会年会, 横浜, 12月13日-16日 (ワークショップ招待), (2011)
22. Masumoto H, Ohzeki J, Nakano M, Kouprina N, Larionov V and Earnshaw WC: A chromatin assembly balance on satellite DNA determines the fate of de novo kinetochore and HAC formation, Japanese-German JSPS and DFG-funded workshop "Centromeres and Artificial Chromosomes", Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK), Gatersleben, Germany, 31 October - 3 November (2011)
23. 舛本寛, 大関淳一郎, 中野めぐみ, Larionov V and Earnshaw WC: 細胞へ導入されたDNAの運命: 人工染色体形成, 宿主染色体への組込み, 核からの脱落, はどのように起こるか? 第84回日本遺伝学会大会, 博多, 2012年9月24-26日 (ワークショップ招待), (2012)
24. Yoneda Y: Differential role for Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells. 2012.10.27~10.31, ワイズマン研究所, イスラエル
25. Yasuhara N, and Yoneda Y: The novel role of the nucleocytoplasmic transport system in cell differentiation. 染色体ワークショップ・核ダイナミクス研究会, 淡路島, 2012年12月20日~22日

② 口頭発表 (国内会議 9 件、国際会議 1 件)

1. Yoneda, Y., Katahira, J., Sekimoto, T., Yasuhara, N., and Oka, M. "Nucleocytoplasmic transport of proteins and RNAs and its significance to cell function" 第60回日本細胞生物学会大会 2008年6月29日~7月1日、横浜
2. 米田悦啓 「核-細胞質間蛋白質輸送制御と高次生命機能」、日本分子生物学会 第9回春季シンポジウム、平成21年5月11日~12日、宮崎
3. 米田悦啓 「核膜孔を介した物質輸送による核機能制御」、第61回日本細胞生物学会大会、平成21年6月2日~4日、名古屋
4. Yoneda, Y. A novel regulatory mechanism by importin alpha and cell fate determination., 2009 International Meeting on Nuclear Trafficking, Banff, Canada, August 24-29, 2009
5. 米田悦啓 「Nuclear protein import machineries and cell differentiation」第32回日

本分子生物学会、平成21年12月9日～12日、横浜

6. 大関淳一郎、庄野暢晃、中野めぐみ、William C. Earnshaw, Vladimir Larionov、長瀬隆弘、舛本寛: セントロメアをアセチル化する機構の探索、第29回染色体ワークショップ、仙台、1月25日-27日(2012)
  7. 安原徳子、山岸良介、新井由之、柳田敏雄、金子寛生、米田悦啓: 核-細胞質間輸送と幹細胞分化、第34回日本分子生物学会年会、12月13-16日、パシフィコ横浜(2011)
  8. 安原徳子、山岸良介、木本千裕、金子寛生、米田悦啓: 核-細胞質間タンパク質輸送システムによる幹細胞のエピゲノム制御、第35回日本分子生物学会年会、福岡、2013年12月11日～14日
  9. Shono N, Ohzeki J, Nakano M, Nagase T, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H: Analysis of centromere chromatin assembly using tetO/tetR synthetic DNA system. 第35回日本分子生物学会年会、12月11日～14日、福岡国際会議場 (2012)
  10. Ohzeki J, Shono N, Otake K, Nakano M, Earnshaw WC, Larionov V, Nagase T, Masumoto H: Exploring of centromere acetylating mechanism using tetO-alfoid system. 第30回染色体ワークショップ・第11回核ダイナミクス研究会、12月19日～21日、淡路夢舞台国際会議場(2012)
- ③ ポスター発表 (国内会議 37 件、国際会議 8 件)
1. Yasuhara N, Memood R, Kamikawa Y, Touma K. and Yoneda Y. "A novel regulatory system to maintain ES cells through nuclear-cytoplasmic transport" 2nd International SOX Meeting, September 16-19, 2008, Hyogo JAPAN
  2. Memood R, Yoshikawa K, Shibasaki N, Kaneko A, Yasuhara N, Kondoh H and Yoneda Y. "Nuclear-cytoplasmic transport regulation of transcription factors" 2nd International SOX Meeting, September 16-19, 2008, Hyogo JAPAN
  3. Gibo R, Okada M, Yasuhara N and Yoneda Y. "Nuclear import mechanism of Nanog" 2nd International SOX Meeting, September 16-19, 2008, Hyogo JAPAN
  4. 大関淳一郎、Larionov V、舛本寛 セントロメア機能形成に関わるダイナミックなクロマチン集合バランス 第31回日本分子生物学会年会、神戸、2008年12月9-12日
  5. 上川泰直、安原徳子、米田悦啓 「細胞分化における importin alpha1 の転写制御」、第61回日本細胞生物学会大会、平成21年6月2日～4日、名古屋
  6. 安東沙貴子、安原徳子、上川泰直、當間憲一、米田悦啓 「importin alpha サブタイプ間の相補性」、第61回日本細胞生物学会大会、平成21年6月2日～4日、名古屋
  7. 安原徳子、Mehmood R、上川泰直、米田悦啓 「A novel regulatory system to maintain ES cells through the nuclear-cytoplasmic transport」、第82回日本生化学会大会、平成21年10月21日～24日、神戸
  8. 岡正啓、浅利宗弘、安田善也、立花太郎、米田悦啓 「A mobile nucleoporin, Nup98, plays an important role in a Crm1-dependent nuclear export」、第82回日本生化学会大会、平成21年10月21日～24日、神戸
  9. Mehmood R、安原徳子、米田悦啓 「Molecular dissection of the pathways underlying the nuclear import of NeuroD1, E47 and of their heterodimer」、第82回日本生化学会大会、平成21年10月21日～24日、神戸
  10. 水口千彰、安原徳子、浅利宗弘、米田悦啓 「The modulation in glycosylation state of nucleoporins in cell differentiation」、第32回日本分子生物学会、平成21年12月9日～12日、横浜
  11. 金子杏美、安原徳子、米田悦啓 「分化過程における KLF ファミリータンパク質の核-細胞質間局在の解析」、第32回日本分子生物学会、平成21年12月9日～12日、横浜
  12. Ohzeki J, Bergmann J, Noscov V, Nakano M, Larionov V, Earnshaw W and Masumoto H. Positive and negative regulators for de novo centromere assembly and the maturation.、第32回日本分子生物学会年会、横浜、2009年12月10日
  13. Kamikawa Y, Yasuhara N and Yoneda Y. "Transcriptional regulation of



- importin-alpha in embryonic stem cells” International Symposium on Organelle Network: Interface among Infection-Immunity, Cell Biology and Glycobiology, Osaka, April 12-13, 2010
14. Moriyama T, Nagai M, Oka M and Yoneda Y. “Targeted disruption of the nuclear import adaptor, importin-alpha 5, leads to female genital hypoplasia” International Symposium on Organelle Network: Interface among Infection-Immunity, Cell Biology and Glycobiology, Osaka, April 12-13, 2010
  15. Yasuhara N and Yoneda Y. “The role of the nucleocytoplasmic transport system in cell differentiation” International Symposium on Organelle Network: Interface among Infection-Immunity, Cell Biology and Glycobiology, Osaka, April 12-13, 2010
  16. Yasuhara N, Yamagishi R, Arai Y, Yanagida T, Kaneko H and Yoneda Y. “Differential nuclear import is a novel regulatory mechanism for maintaining pluripotency of ES cells” 第62回日本細胞生物学会大会、大阪国際会議場、大阪、平成22年5月19日～21日
  17. Mizuguchi C, Yasuhara N, Asally M and Yoneda Y. “The modulation in glycosylation state of nucleoporins in cell differentiation” 第62回日本細胞生物学会大会、大阪国際会議場、大阪、平成22年5月19日～21日
  18. Kamikawa Y, Yasuhara N and Yoneda Y. “Transcriptional regulation of importin alpha in mouse embryonic stem cells” 第62回日本細胞生物学会大会 大阪国際会議場、大阪、平成22年5月19日～21日、
  19. Moriyama T, Nagai M, Oka M and Yoneda Y. “Targeted disruption of the nuclear import adaptor, importin- $\alpha$ 5, leads to female genital hypoplasia” 第62回日本細胞生物学会大会、大阪国際会議場、大阪、平成22年5月19日～21日
  20. 岡正啓、盛山哲嗣、浅利宗弘、米田悦啓 “Nucleo-cytoplasmic shuttling of Oct-4”, BMB2010, Kobe, December 7-10, 2010
  21. Mehmood R, Yasuhara N and Yoneda Y. “Nuclear import of E47 and its partner transcription factors involves across talk between distinct nuclear import pathways” BMB2010, Kobe, December 7-10, 2010
  22. Moriyama T, Nagai M, Oka M and Yoneda Y. “Targeted disruption of one of the importin-alpha 5 family members leads to female functional incompetence in delivery” BMB2010, Kobe, December 7-10, 2010
  23. Ohzeki J, Bergmann J, Kouprina N, Noskov V, Nakano M, Kimura H, Earnshaw W, Larionov V and Masumoto H.: Modifications of histone H3K9 regulate de novo kinetochore assembly in human cells. 第33回 日本分子生物学会年会, 神戸、2010年12月9日
  24. 荒神尚子,小坂田裕子, 糀谷知子, 小林昇平、木村宏、中野めぐみ, 舛本寛, Larionov V, Earnshaw W,平岡 泰, 原口徳子: 人工染色体の分配異常により形成される微小核の細胞内動態と核構造、第33回 日本分子生物学会年会, 神戸、2010年12月9日
  25. Kamikawa Y and Yoneda Y: Cell-Type Specific Transcriptional Regulation of Importin-alpha 1、第63回日本細胞生物学会、6月27-29日、北海道(2011)
  26. Ohzeki J, Bergmann JH, Kouprina N, Noskov VN, Nakano M, Kimura H, Earnshaw WC, Larionov V and Masumoto H: Breaking the HAC barrier by operating a histone H3K9 acetyl/methyl switch, 第34回日本分子生物学会年会、12月13-16日、パシフィコ横浜(2011)
  27. Nakano M, Ohzeki J, Okamura Y, Shimojima T, Ikeno M, Larionov V, Earnshaw WC and Masumoto H.: Analyses of DNA elements and chromatin structures required for the efficient formation of human artificial chromosomes, 第34回日本分子生物学会年会、12月13-16日、パシフィコ横浜(2011)
  28. Okamura Y, Shimojima T, Nakano M, Ohzeki J, Hasegawa Y, Ikeno M, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H.: Generation of induced Pluripotent stem cells (iPSCs) using conditional human artificial chromosome (HAC), 第34回日本分子生物学会年会、

- 12月13-16日、パシフィコ横浜(2011)
29. Kimoto C, Yasuhara N, Yoneda Y: The mechanism to determine a nuclear transport pathway by NLS sequence. 第34回日本分子生物学会年会、12月13-16日、パシフィコ横浜(2011)
  30. Moriyama T, Oka M, Yoneda Y: Nucleocytoplasmic shuttling of estrogen receptor  $\alpha$ . 第64回日本細胞生物学会、5月28-31日、神戸国際会議場、神戸(2012)
  31. Kimoto C, Yasuhara N, Yoneda Y: Recognition mode of basic NLS sequence by importin  $\alpha 1$ . 第64回日本細胞生物学会、5月28-31日、神戸国際会議場、神戸(2012)
  32. Yasuhara N, Yamagishi R, Kaneko H, Kimoto C, Yoneda Y: Importin  $\alpha$  regulates the stem cell differentiation. 第64回日本細胞生物学会、5月28-31日、神戸国際会議場、神戸(2012)
  33. Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K, Yoneda Y: Differential role for Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of embryonic stem cells. 第64回日本細胞生物学会、5月28-31日、神戸国際会議場、神戸(2012)
  34. Oka M, Moriyama T, Asally M, Kawakami K, Yoneda Y: Differential role for Oct4 nucleocytoplasmic dynamics in somatic cell reprogramming and self-renewal of mouse embryonic stem cells. ISSCR, June 13-16, Yokohama, Japan (2012)
  35. 木本千裕、安原徳子、米田悦啓 : importin  $\alpha 1$  による塩基性核局在シグナル配列の認識様式 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11日~14日
  36. Moriyama T, Oka M, Yoneda Y : Estrogen receptor  $\alpha$  Subcellular Distribution and Functions. 第35回日本分子生物学会年会、福岡、2012年12月11日~14日
  37. Ohzeki J, Shono N, Otake K, Nakano M, Earnshaw WC, Larionov V, Nagase T, Masumoto H : Exploring of centromere acetylating mechanism using tetO-alphoid system. 第35回日本分子生物学会年会、12月11日~14日、福岡国際会議場 (2012)
  38. Nakano M, Ohzeki J, Otake K, Shono N, Larionov V, Earnshaw WC and Masumoto H : The Analysis of regulation and maintenance mechanisms of centromere functional structure with chromatin-alterable human artificial chromosome system. 第35回日本分子生物学会年会、12月11日~14日、福岡国際会議場 (2012)
  39. Okamura Y, Shimojima T, Nakano M, Ohzeki J, Hasegawa Y, Ikeno M, Earnshaw WC, Larionov V and Masumoto H : Generation of induced Pluripotent stem cells (iPSCs) using conditional human artificial chromosome (HAC). 第35回日本分子生物学会年会、12月11日~14日、福岡国際会議場 (2012)
  40. Otake K, Ohzeki J, Nakano M, Masumoto H : The effect of CENP-B binding to Alphoid DNA on the formation and maintenance of CENP-A chromatin. 第35回日本分子生物学会年会、12月11日~14日、福岡国際会議場 (2012)
  41. Shono N, Ohzeki J, Nakano M, Nagase T, Earnshaw WC, Larionov V, Masumoto H : Analysis of centromere chromatin assembly using tetO/tetR synthetic DNA system. 第35回日本分子生物学会年会、12月11日~14日、福岡国際会議場 (2012)
  42. 庄野暢晃、大関淳一朗、中野めぐみ、長瀬隆弘、Earnshaw WC、Larionov V、舛本寛 : tetO/TetR合成DNAシステムを用いたセントロメアクロマチン集合機構の解明、第30回染色体WS・第11回核ダイナミクス研究会、12月19-21日、淡路夢舞台国際会議場(2012)
  43. Sangel P, Oka M, Yoneda Y: Comparative Expression/Functional Analysis of Karyopherin-  $\beta$ s in Mouse Embryonic Stem Cells and Differentiated Cells. International Conference on Life Science & Biological Engineering, Mar 13-15, Tokyo, Japan (2013)
  44. 辻井 聡, 盛山 哲嗣, 岡 正啓, 米田 悦啓: Importin  $\alpha$  によるヒストン結合タンパク RBBP4 の核内移行: 第65回日本細胞生物学会、6月19-21日、ウインクあいち、愛知(2013)
  45. 盛山 哲嗣, 岡 正啓, 米田 悦啓: Estrogen receptor の核-細胞質間移動機構とその生理的意義の解明、第36回日本分子生物学会年会、神戸、2013年12月3日~6日

(5)受賞・報道等

① 受賞

1. 米田悦啓：日本医師会医学賞（平成21年11月1日付）
2. 米田悦啓：武田医学賞（平成25年11月12日付）

② マスコミ(新聞・TV等)報道(プレス発表をした場合にはその概要もお書き下さい。)

1. 産経新聞（平成25年7月30日付）  
ES細胞の未分化維持のしくみ解明 阪大、日大グループ iPS細胞作成の効率化に期待
2. 日刊工業新聞（平成25年7月30日付）  
哺乳類のES細胞未分化維持に輸送受容体が関与—阪大・日大
3. ウォール・ストリート・ジャーナル日本版（平成25年7月30日）  
細胞核への輸送受容体も重要=iPSに応用期待—大阪大と日大
4. マイナビニュース（平成25年7月30日付）  
阪大など、ほ乳類のES細胞が未分化性を維持する機構の一端を解明

(6) 成果展開事例

①社会還元的な展開活動

- ・インポータイン $\alpha$ のノックアウトマウスはイスラエルやオーストラリアの研究者に提供した。
- ・インポータイン $\alpha$ 2に関する研究成果を以下のURL

<http://www.jst.go.jp/pr/announce/20130730/>

[http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/07/20130730\\_1](http://www.osaka-u.ac.jp/ja/news/ResearchRelease/2013/07/20130730_1)

<http://news.mynavi.jp/news/2013/07/30/198/index.html>

<http://jp.wsj.com/article/JJ10318569496205663610217730336153314743350.html>)

で公開し、一般に情報提供している。

## § 5. 最後に

本研究では細胞リプログラミングにおける輸送因子の機能や核-細胞質間物質輸送制御の重要性を理解し、リプログラミングのプロセスを解明することを1つの大きな目的とした。その結果、核輸送因子が転写因子の核内移行を制御することを通して、未分化を維持する働きを持つという新しい機構や、Oct4 リプログラミング因子の核内滞在時間がリプログラミングに果たす重要性などを明らかにすることが出来た。これらの得られた知見は、核-細胞質間輸送制御が細胞リプログラミングに深く関連することを実証するものであり、当初の目的に沿った成果が得られたものと自己評価している。今後、核-細胞質間分子輸送という独自の視点をさらに追及してゆくことで、ユニークな視点から細胞リプログラミングの研究を推進することにより、転写因子そのものの研究だけでは得られない、さらにユニークな成果を挙げていくことができると考えている。チーム全体の研究は、情報交換を緊密に取りつつ、人工染色体による iPS 細胞作成にまでは現時点では至っていないが、概ね、予定通り進めることが出来たと考えている。またプロジェクト運営に関しては、研究費のうち、初年度を除き、人件費研究者雇用に当てた部分が多かったが、本研究に特任研究員として携わった多くのメンバーが、大学教員、研究機関の研究員、海外の研究員(留学)として、現在もアカデミックな研究職についていることから、本プロジェクトにより有能な若手を育てる貴重な機会が得られたと考えている。