

「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

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。本年度は人工染色体へ、任意の遺伝子を組み込めるように loxP 配列を挿入することを優先して進めた。各種人工染色体前駆体ベクターと loxP 配列を含んだベクターを HT1080 及び HeLa 細胞へ co-transfection 法により導入し、人工染色体保有細胞株を多数分離した。現在人工染色体上の loxP 部位のコピー数、人工染色体の安定性、脱落制御についての解析を進めている。また、脱落制御できない既存の安定な人工染色体上の loxP 部位をモデルに組み換え酵素 Cre により任意の遺伝子を挿入可能にする技術を確認した。今後、loxP 挿入配列をもつ脱落制御可能な人工染色体株を選別し、この人工染色体 loxP 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) を組み込む計画である。次に、Dox を培地から除いたときに人工染色体の不安定化が起こる自己完結型の脱落制御可能人工染色体システムが構築できたことを確認する。脱落制御可能な人工染色体が構築できれば、iPS 誘導に必要な遺伝子を tTS 遺伝子と共に組み込み、高効率で安全な iPS 細胞樹立技術の開発を目指す。一方、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観点から、細胞リプログラミング高効率化及びその機構の解明を試みている。これまでに核輸送因子 importin- α のリプログラミングにおける機能解析の結果、importin- α ファミリーのうち importin- α 5 は山中 4 因子と共発現させることで iPS 細胞の誘導効率を上昇させる活性を持つ事が分かった。今後、importin- β ファミリー、RAN サイクル関連因子、核膜孔構成因子について更に解析を進める。また、山中 4 因子 (Oct4, SOX2, Klf4, c-Myc) の核-細胞質間局在制御の重要性を調べるために、4 因子に対して核局在化シグナルや核外移行シグナルを付加した変異体を作製し、それぞれの核-細胞質間の分布を変化させたときのリプログラミング効率の解析を進めている。現在までに、これらの因子の核-細胞質間の局在制御が、リプロ

グラミング効率に大きく影響する事が分かった。今後、4因子それぞれの核内輸送及び核外輸送がリプログラミングの過程でどのように制御されているかを解析する。

§ 2. 研究実施体制

(1)「米田」グループ

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)

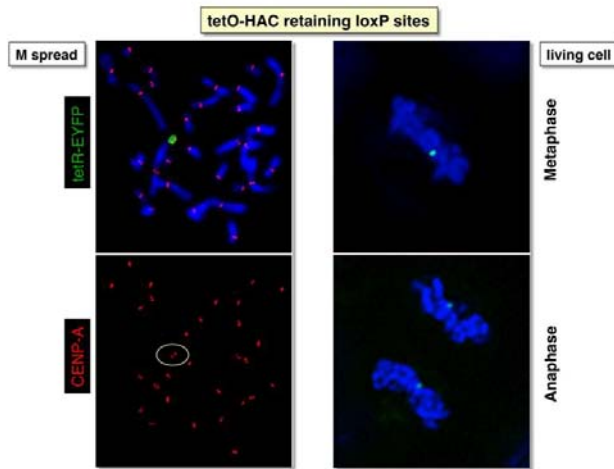
研究の目的 :

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 OFF になり、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旨とする。これまでに tetO 配列を組込んだ各種人工染色体前駆体ベクターと loxP 配列を含んだベクターを HT1080 及び HeLa 細胞へ co-transfection 法により導入し、人工染色体保有細胞株を多数分離した(図1)。現在、これら人工染色体の構造解析を進めている。また、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¹⁾、脱落制御へ繋がる詳し

図1



いメカニズムを明らかにした²⁾。今後、loxP 挿入配列をもつ脱落制御可能な人工染色体株を選別し、この人工染色体 loxP 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) を組み込む計画である。次に、Dox を培地から除いたときに人工染色体の不安定化が起こり自己完結型の脱落制御可能人工染色体システムが

構築できたことを確認する。脱落制御可能な人工染色体が構築できれば、iPS 誘導に必要な遺伝子を tTS 遺伝子と共に組み込み、高効率で安全な iPS 細胞樹立技術の開発を目指す。一方、核輸送因子 importin- α ファミリーの発現解析の結果、多くの importin α において mRNA 及びタンパク質レベルで MEF と未分化細胞で発現に変化は見られなかったものの、importin α 1 の発現が MEF に比べ未分化細胞で顕著に高いことが分かった。また importin α 1 を含むすべての importin α 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 α 1 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 α 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 α 5 は未分化細胞でも 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を示している。また、importin α 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。H22年度以降は importin β ファミリー遺伝子、核膜孔構成因子、RAN サイクル関連因子について更に解析を進める予定である。また、4因子 (Oct4, SOX2, Klf4, c-Myc) は転写因子として主に核に局在を示すことが知られているが、その核-細胞質間の局在制御の重要性を調べるために、4因子に対して核局在化シグナルや核外移行シグナルを融合した変異体を作製し、そのリプログラミングへの効率を解析している。その結果、これらの因子の核-細胞質間の局在制御が、リプログラミングの効率に大きく影響する事が分かった。また、細胞のリプログラミング過程においては転写因子などの核に局在するタンパク質の時間的・空間的機能制御が重要であると考えられるが、転写因子の核内外への輸送にはそれぞれ固有のメカニズムが存在し³⁾、高等真核生物においては組織特異的な輸送関連因子の発現が見られることがわかった⁴⁾。これらのことから、細胞の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想定される。今後、4因子の核-細胞質間局在を人為的に制御する事によりリプログラミングの更なる高効率化を試みると共に、4因子の核内輸送及び核外輸送のメカニズムを解明する。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. J-H. Kim, T. Ebersole, N. Kouprina, V. Noskov, J. Ohzeki, H. Masumoto, B. Mravinac, B. Sullivan, A. Pavlicek, S. Dovat, S. Pack, Y-H. Kwon, P. Franagan D. Loukinov, V. Lobanenkov, and V. Larionov. 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. S. Cardinale, J. H. Bergmann, D. Kelly, M. Nakano, M. Cervantes, M. M. Valdivia, H. Kimura, H. Masumoto, V. Larionov and W. C. Earnshaw: 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 Npap60 (Nup50) differentially regulate nuclear protein import. *Mol. Biol. Cell*, 21, 630-638, (2010) DOI: 10.1091/mbc.E09-05-0374