

影山 龍一郎

京都大学ウイルス研究所・教授

短周期遺伝子発現リズムの動作原理

§ 1. 研究実施の概要

本年度は、胚性幹(ES)細胞における **Hes1** を中心としたオシレーションネットワークの全体像およびその意義について解析した。ES 細胞は多分化能をもち、半永久的に増殖することから、再生医療への応用が期待されている。しかし、ES 細胞は、多分化能をもつが故に均一な細胞集団に分化させるのが非常に困難で、不要なタイプの細胞あるいは未分化な細胞が混入してしまう。さらに、未分化な細胞は腫瘍を形成することが知られている。すなわち、ES 細胞の性質は、利点でもあるが欠点でもあり、再生医療への応用に向けて大きな壁となっている。しかし、ES 細胞がいろいろな刺激に対して示す多様な分化応答の分子基盤については、よくわかっていなかった。そこで、我々は、ES 細胞が示す多様な分化応答に **Hes1** が関与する可能性について検討した。その結果、ES 細胞において **Hes1** の発現は3～5時間周期でオシレーションすること、**Hes1** の標的遺伝子 **Deltalike1** や **Gadd45g** の発現もオシレーションすること、**Hes1-high** ES 細胞は遅いタイミングで中胚葉系に分化しやすく **Hes1-low** ES 細胞は早いタイミングで神経系に分化しやすいこと、そして **Hes1** 遺伝子をノックアウトした ES 細胞は早いタイミングで均一に神経系に分化することがわかった。したがって、**Hes1** オシレーションはES細胞の多様な分化応答性に寄与することが明らかになった。また、**Hes1** ノックアウト ES 細胞は均一に神経系に分化することから、神経系の再生医療への応用が期待された。

一方、体節形成過程に見られる発現振動の動態に関して、空間離散の数値モデルに基づいて空間パターンの数値シミュレーションを行った。その結果、個々の細胞は振動性を持たない場合でも、空間不均一性と **activator** による結合により発振が出現して多様な時空間パターンが生成されることを明らかにした。今後は、このモデルを元に、実験と理論の連携によって、分節時計の新しいモデルの構築を目指す。

§ 2. 研究実施体制

(1)「影山」グループ

① 研究分担グループ長: 影山 龍一郎 (京都大学)

② 研究項目

短周期遺伝子発現リズムの動作原理

(2)「吉川」グループ

① 研究分担グループ長: 吉川 研一 (京都大学) 研究項目

② 研究項目

短周期遺伝子発現リズムの数値モデル構築

§ 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)

影山グループ

本年度は、胚性幹(ES)細胞における **Hes1** を中心としたオシレーションネットワークの全体像およびその意義について解析した。ES 細胞は多分化能をもち、半永久的に増殖することから、再生医療への応用が期待されている。しかし、ES 細胞は、多分化能をもつが故に均一な細胞集団に分化させるのが非常に困難で、不要なタイプの細胞あるいは未分化な細胞が混入してしまう。さらに、未分化な細胞は腫瘍を形成することが知られている。すなわち、ES 細胞の性質は、利点でもあるが欠点でもあり、再生医療への応用に向けて大きな壁となっている。しかし、ES 細胞がいろいろな刺激に対して示す多様な分化応答の分子基盤については、よくわかっていなかった。そこで、我々は、ES 細胞が示す多様な分化応答に **Hes1** が関与する可能性について検討し、以下のことを明らかにした。

まず、ES 細胞における **Hes1** の発現を免疫染色法にて検討したところ、細胞毎に発現レベルが異なること、また発現は **Notch** シグナルではなく、**LIF** および **BMP** によって制御されていることがわかった(図1)。さらに、ES 細胞に **Hes1** レポーターを導入してリアルタイムで **Hes1** の発現を可視化したところ、ノザンやウェスタン法では一定レベルで持続発現しているようにみえる条件下でも、シングルセルレベルでは3~5時間周期で発現がオシレーションしていた。次に、胚性幹細胞における **Hes1** の標的遺伝子群をマイクロアレイ法および **ChIP-on-Chip** 法によって網羅的に探索したところ、多くの遺伝子が **Hes1** によって発現抑制を受けることがわかった。その中には、**Notch** のリガンドある **Deltalike1 (Dll1)** および細胞増殖を抑制する **Gadd45g** も含まれており、それぞれの発現レポーターを ES 細胞に導入して、リアルタイムで発現動態を解析した。その結果、**Dll1** や **Gadd45g** の発現も **Hes1** と同様にオシレーションすることがわかった(図1)。このことから、ES 細胞の増殖・分化能は、**Hes1** オシレーションとともに時々刻々と変化すると考えられた。この

点を明らかにするために、ES 細胞の Hes1 遺伝子に Venus 蛍光遺伝子をノックインして Venus-Hes1 の融合蛋白が発現するようにし、蛍光強度に従って Hes1-high および Hes1-low の ES 細胞を分離した。分離後すぐに、これらの細胞の分化能を検討したところ、Hes1-high ES 細胞は遅いタイミングで中胚葉系に、Hes1-low ES 細胞は早いタイミングで神経系に分化しやすいことが明らかになった(図2)。これらの結果から、Hes1 オシレーションは ES 細胞の多様な分化応答に寄与すると考えられた。この点をさらに検討するために、Hes1 遺伝子をノックアウトした ES 細胞を作製して分化能をしらべたところ、早いタイミングで均一に神経系に分化した。以上の結果から、Hes1 発現オシレーションが ES 細胞の多様な分化応答性に重要な役割を担うことが明らかになった(図2)[文献1]。また、Hes1 ノックアウト ES 細胞は、均一に神経系に分化することから、神経系の再生医療への応用が期待された。

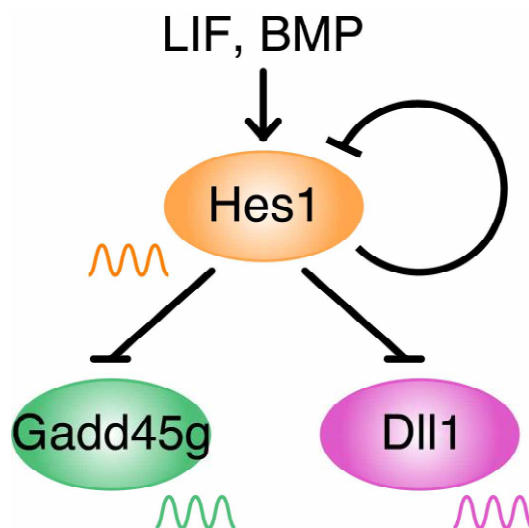


図1: ES 細胞における Hes1 および標的遺伝子の発現動態。ES 細胞では、Hes1 の発現はオシレーションし、その標的遺伝子である Gadd45g や Deltalike1 (Dll1) の発現もオシレーションする。

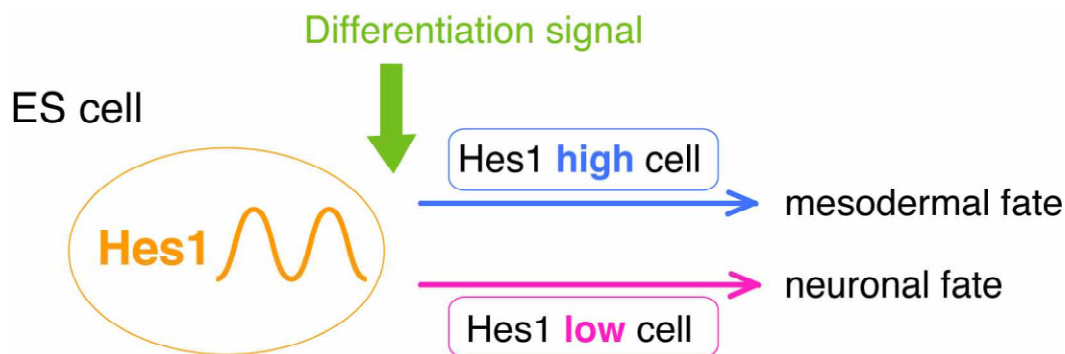


図2: ES 細胞の多様な分化応答に Hes1 オシレーションが寄与。ES 細胞では Hes1 の発現がオシレーションしている。分化誘導したときに、Hes1 の発現レベルが高いと中胚葉系に分化しやすい

いが、*Hes1* の発現レベルが低いと神経系に分化しやすい。したがって、*Hes1* の発現オシレーションは、ES 細胞の多様な分化応答性に寄与する。

吉川グループ

体節形成など生物の形づくりは、時空間情報の精密な処理を通じて実現されている。これまでの形態形成の数値モデルの多くは、偏微分で記述される空間連続系でパターン形成を調べてきた。その中でも、拡散不安定性によって安定な定常パターンが誘導される Turing パターンは特に精力的に研究されてきた。しかし、連続変数を用いた偏微分方程式系の数値モデルによる定常パターンの数値解析は、細胞という生体組織の最小単位に起因する離散性がパターンに及ぼす影響を正しく評価できないという欠点がある。そこで、本研究では新たに体節形成を模した空間離散の数値モデルに基づき、空間パターンの形成過程を数値シミュレーションによって研究した。本研究では、未分節中胚葉(PSM)の後端にある分節時計、FGF などの濃度勾配、胚の成長、そして PSM 内での遺伝子発現波の伝搬と停止など、実験で観察された要素をモデルに取り込み、数値シミュレーションを行った。その結果、図3で示すように規律正しい空間周期パターンを形成する結果を得た。そして、空間連続の系とは全く異なる現象が現れることが確認された。

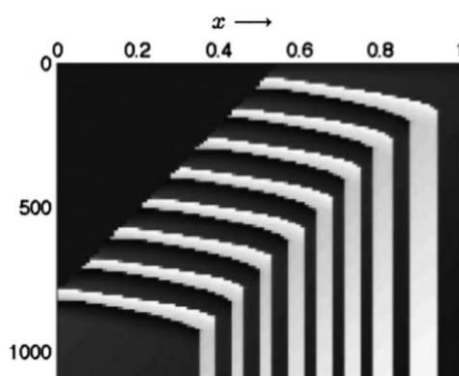


図 3：空間離散の数値モデルで得られた活性因子の空間分布の時間変化

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

影山グループ

[1] Kobayashi, T., Mizuno, H., Imayoshi, I., Furusawa, C., Shirahige, K., and Kageyama, R. (2009) The cyclic gene *Hes1* contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells. *Genes & Dev.* 23, 1870-1875. (DOI: 10.1101/gad.1823109)

- [2] Gonzalez, A., and Kageyama, R. (2009) Hopf Bifurcation in the Presomitic Mesoderm during the Mouse Segmentation. **J. Theor. Biol.** 259, 176-189. (DOI: 10.1016/j.jtbi.2009.02.007)
- [3] Wall, D.S., Mears, A.J., McNeill, B., Mazerolle, C., Thurig, S., Wang, Y., Kageyama, R., and Wallace, V.A. (2009) Progenitor cell proliferation in the retina is dependent on Notch-independent Sonic hedgehog/Hes1 activity. **J. Cell Biol.** 184, 101-112. (DOI: 10.1083/jcb.200805155)
- [4] Murata, J., Ohtsuka, T., Tokunaga, A., Nishiike, S., Inohara, H., Okano, H., and Kageyama, R. (2009) Notch-Hes1 pathway contributes to the cochlear prosensory formation potentially through the transcriptional down-regulation of p27(Kip1). **J. Neurosci. Res.** 87, 3521-3534. (DOI: 10.1002/jnr.22169)
- [5] Arai, M., Masada, A., Ohtsuka, T., Kageyama, R., and Ishibashi, M. (2009) The first Hes1 dimer inhibitors from natural products. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** 19, 5778-5781. (DOI: 10.1016/j.bmcl.2009.07.146)
- [6] Imayoshi, I., Sakamoto, M., Yamaguchi, M., Mori, K., and Kageyama, R. (2010) Essential roles of Notch signaling in maintenance of neural stem cells in the developing and adult brains. **J. Neurosci.** 30, 3489-3498. (DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4987-09.2010)

吉川グループ

- [7] Nagahara, H., Ma, Y., Takenaka, Y., Kageyama, R., and Yoshikawa, K. (2009) Spatio-temporal pattern in somitogenesis: a non-Turing scenario with wave propagation. **Physical Rev. E.** 80, 0219106(1-7). (DOI: 10.1103/PhysRevE.80.021906)

(4-4) 知財出願

- ① 平成21年度特許出願内訳(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1 件)