

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. 研究実施体制

(1) 「米田」グループ

① 研究代表者: 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
 - Oct4 の核—細胞質間輸送制御と細胞リプログラミング
 - 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の構築

(2) 「舩本」グループ

① 主たる共同研究者: 舩本 寛 (財団法人かずさ DNA 研究所、室長)

② 研究項目

- ・脱落制御可能な人工染色体の構築と iPS 細胞の作製

§ 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)

研究の目的:

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のメカニズムを明らかにする。そして、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挿入による問題点を克服し、さらに、それを利用して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目的とする。

研究実施内容:

1) 細胞リプログラミングに必須の因子である Oct4 の核—細胞質間輸送制御機構の解析を行い、

その重要性を明らかにする。また、核-細胞質間の輸送に重要である核輸送因子、核膜孔(構成因子)、低分子量 GTP アーゼ Ran、および、その活性制御因子の細胞リプログラミング過程における発現制御、および、その役割を解析する。

2) 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。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する。そこで本研究では、この人工染色体上に 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の開発を進める。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)を組み込み MEF へ導入する。iPS 細胞誘導後にこの人工染色体の脱落制御を行う。

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. Oct4 の核-細胞質間輸送と細胞リプログラミング

Oct4 に核移行シグナル、あるいは核外移行シグナルを付加した変異体では、そのリプログラミング効率の顕著な低下がみられたため、それらの Oct4 変異体の転写活性、そして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 変異体も転写の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、Oct4 変異体は野生型 Oct4 発現抑制下(ZHBTc4 細胞、Dox (+))で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 のみを発現させた細胞株は ES 細胞と同程度の増殖能を示すことが分かった。

2. 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の構築

未分化 ES 細胞で高発現する輸送因子、ヌクレオポリンに関しては、遺伝子ノックダウンや、高発現による未分化 ES 細胞維持、および細胞リプログラミングへの影響の解析に着手した。さらに、未分化 ES 細胞で高発現する importin-alpha ファミリーの importin-alpha1 に関して、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⁴⁾。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-alpha1 の高発現を維持していることが分かった。さらに、importin-alpha1 は輸送因子として働くだけでなく、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⁶⁾。

3. 脱落制御可能な人工染色体の作製

人工染色体作成技術と脱落技術の開発を進め、遺伝子組み込み部位 loxP 配列を挿入した人工染色体(tetO-HAC)を多数作製した^{7,8)}。更に、この人工染色体(tetO-HAC)の loxP 部位へヘテロクロマチン化を誘導する tTS 遺伝子(tetR-SD^{kid} 融合蛋白質)を組み込んだ。Dox を培地から除いたときに tTS 遺伝子の作用により、それまで安定維持されていた人工染色体のセントロメアに機能破壊が起こり、自己脱落制御可能な人工染色体システムが構築できたことを確認した。

4. 人工染色体導入法の改良と iPS 細胞の誘導

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、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技術改良を進めた。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。この iPS 細胞誘導カセットを人工染色体 loxP 部位へ組み込み ES 細胞やレトロウイルスベクターによる iPS 化細胞と同等かそれ以上の山中 4 因子の発現誘導が起こることを確認した。この人工染色体を MEF へ導入し iPS 細胞誘導実験に着手した。

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

●論文詳細情報

1. 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)
2. Moriyama, T., Nagai, M., Oka, M., Ikawa, M., Okabe, M. and Yoneda, Y. Targeted disruption of one of the importin α family members leads to female functional incompetence in delivery. *FEBS J.*, 278: 1561-1572 (2011) (DOI: 10.1111/j.1742-4658.2011.08079.x)
3. Sekimoto, T., Miyamoto, Y., Arai, S. and Yoneda, Y. Importin α protein acts as a negative regulator for Snail protein nuclear import. *J. Biol. Chem.*, 286: 15126-15131 (2011) (DOI: 10.1074/jbc.M110.213579)
4. 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)
5. Mehmood, R., Yasuhara, N., Fukumoto, M., Oe, S., Tachibana, 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)
6. Yasuda, Y., Miyamoto, Y., Yamashiro, T., Asally, M., Masui, A., Loveland, K.L. and Yoneda, Y. Nuclear retention of importin α coordinates cell fate through changes in gene expression. *EMBO J.*, 31: 83-94 (2011) (DOI: 10.1038/emboj.2011.360)
7. Kim J-H., Kononenko A., Erliandri I., Kim T., Nakano M., Iida Y., Barrett C.J., Oshimura M., Masumoto M., Earnshaw W.C., Larionov V. & Kouprina N. Human Artificial Chromosome (HAC) vector with a conditional centromere for correction of genetic deficiencies in human cells. *PNAS*, 108: 20048-20053 (2011)

(DOI: 10.1073/pnas.1114483108)

8. 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, in press
9. Ogawa, Y., Miyamoto, Y., Oka, M., and Yoneda, Y. The interaction between importin-alpha and Nup153 promotes importin-alpha/beta-mediated nuclear import. Traffic, in press

(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)