

西田 栄介

京都大学 大学院生命科学研究科・教授

細胞リプログラミングと分化における転写調節機構

## § 1. 研究実施体制

(1) 「西田」グループ

① 研究代表者: 西田 栄介 (京都大学 大学院生命科学研究科、教授)

② 研究項目

- ・ I. 細胞リプログラミング過程における転写プログラム変換の分子機構の解明
- ・ II. 細胞分化の諸過程における遺伝子発現変換プログラムの解明
- ・ III. 転写カスケードを用いて分化細胞から別の分化細胞へ転換させる自動プログラムの樹立とその機構解明
- ・ IV. 転写調節の分子基盤である転写因子の作用機構およびエピジェネティック制御の調節機構の解明

## § 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)

I. 細胞リプログラミング過程における転写プログラム変換の分子機構の解明

マウス胎仔繊維芽細胞およびマウス胎仔神経幹細胞にリプログラミング因子を導入し、リプログラミング初期における遺伝子発現パターンについてマイクロアレイ解析を行った。さらに、マイクロアレイの結果をもとに *in silico* 転写因子予測法を用いて解析した結果、リプログラミング過程に重要な転写因子の候補を同定した。また、高速シーケンサーを用いてスプライシングバリエーションごとの発現量を解析する手法を開発し、iPS 細胞と ES 細胞に特異的なスプライシングバリエーションを同定した。

II. 細胞分化の諸過程における遺伝子発現変換プログラムの解明

培養細胞 C2C12 を用いた筋分化システムにおいて、ERK5 MAP キナーゼ/Sp1/Klf2&4 というシグナル伝達経路が、筋細胞の融合に機能することがわかった。さらに、Klf2&4 のターゲットとして、接着分子である Cdh15 や Npnt を同定し、筋細胞の融合を制御する作用機序を明らかにした。別

の実験系では、培養細胞 Caco2 を使った小腸分化システムにおいて、Hippo 経路と Wnt/ $\beta$ -catenin 経路のクロストークを明らかにした(図1)<sup>1)</sup>。さらに、小腸の幹細胞維持や分化システムについて in vivo での解析を開始した。また、新たな分化モデル系として、培養細胞 UCBTRET-21 やマウス胎仔繊維芽細胞を用いた脂肪細胞への分化の系を確立した。さらに、キナーゼ siRNA ライブラリーを用いて、脂肪分化に重要である遺伝子を探索し、候補遺伝子をいくつか同定した。

### III. 転写カスケードを用いて分化細胞から別の分化細胞へ転換させる自動プログラムの樹立とその機構解明

項目 I と連携して、リプログラミング初期における遺伝子発現パターンを網羅的に解析したところ、リプログラミング途中段階の時期特異的マーカー遺伝子となり得る、いくつかの候補遺伝子を見つけることができた。リプログラミング途中段階の細胞を解析するためには、単一細胞レベルでの追跡が必要であるため、タイムラプス蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージングの系を立ち上げた(図 2)。次に、時系列マーカー候補遺伝子の1細胞レベルでの発現状態変化を知るため、各プロモーター約 1kb にレポーター(蛍光タンパク質)をつなぎ、レンチウイルスやレトロウイルスを用いて細胞に導入し、ライブセルイメージングを試みたが、ウイルスを用いたレポーターの導入は、細胞間で発現強度のばらつきが大きく、発現パターンの変化を正確に追えないことが判明した。そこで、ノックインマウスやトランスジェニックマウスを用いたレポーターの作製および解析を開始した。また、新たな実験系として、マウス胎仔繊維芽細胞にリプログラミング因子を導入し、エピブラスト用の培地で培養することにより、iEpil 細胞(induced Epiblast-like cells)を誘導する系を確立し、iPS 細胞誘導過程と iEpil 細胞誘導過程における遺伝子発現パターンについてマイクロアレイ解析を行った。両者の遺伝子発現パターンを比較した結果、iPS 細胞と iEpil 細胞の違いを決める候補遺伝子をいくつか同定した。

### IV. 転写調節の分子基盤である転写因子の作用機構およびエピジェネティック制御の調節機構の解明

昨年度は、筋分化のマスターレギュレーターである転写因子 MyoD と脂肪細胞のマスターレギュレーターである転写因子 PPAR $\gamma$ を用いて、筋分化および脂肪分化の系を確立した。さらに、MyoD と PPAR $\gamma$ の作用の相互関係について、その作用機序を明らかにした。

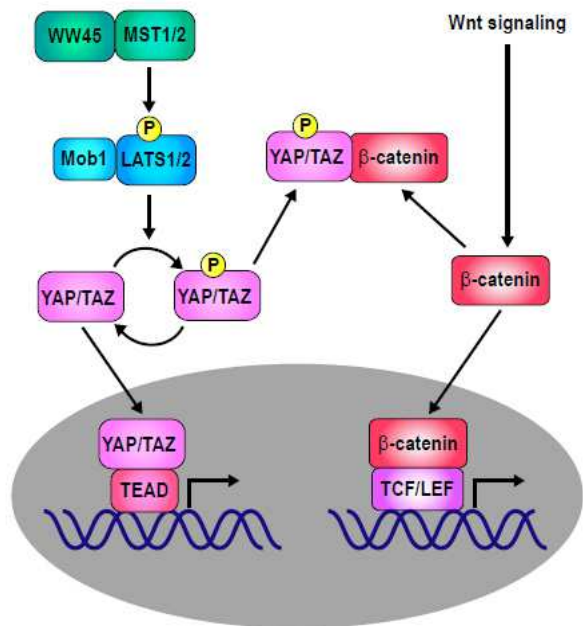


図 1 小腸上皮細胞における Hippo 経路と Wnt/β-catenin 経路のクロストーク

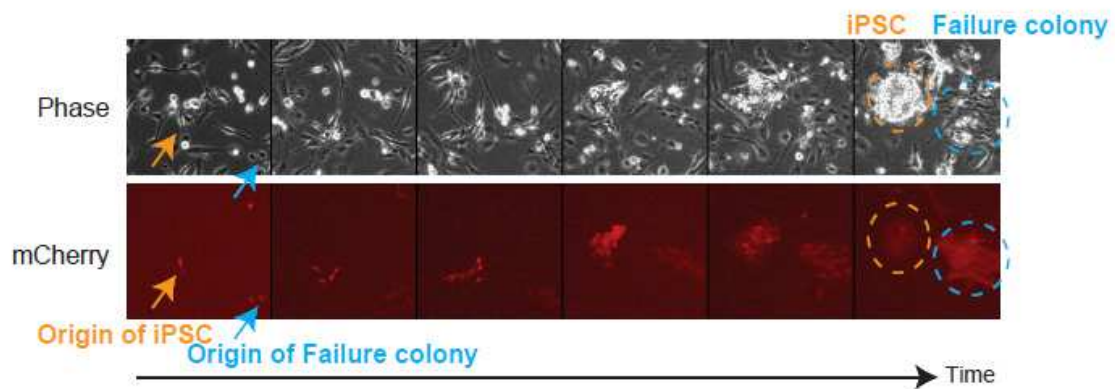


図 2 タイムラプス蛍光顕微鏡を用いたライブセルイメージング

### § 3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ●論文詳細情報

1. Imajo M, Miyatake K, Iimura A, Miyamoto A and Nishida E, "A molecular mechanism that links Hippo signalling to the inhibition of Wnt/beta-catenin signalling" *EMBO J.* 31, 1109-1122, 2012, (doi: 10.1038/emboj.2011.487.)

2. Matsumura S, Hamasaki M, Yamamoto T, Ebisuya M, Sato M, Nishida E, and Toyoshima F, "ABL1 regulates spindle orientation in adherent cells and mammalian skin" *Nature Commun.*, 3, 626, 2012, (doi: 10.1038/ncomms1634.)

**(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)