

「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

H24 年度  
実績報告

米田 悦啓

大阪大学大学院 生命機能研究科・医学系研究科 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、さらに、その核—細胞質間輸送のバランスを変化させた Oct4 変異体を用いて、その重要性を明らかにする。また、importin ファミリーやヌクレオポリンの細胞リプログラミングや ES 細胞の未分化維持における役割を解析する。
- 2) tetO 配列を含む合成反復 DNA からなる人工染色体 (tetO-HAC) 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む。tTS の結合によりヘテロクロマチン化が誘導されると自身のセントロメア機能が破壊される人工染色体 (自己脱落制御可能な人工染色体) を構

築する。この人工染色体上の loxP 部位に、更に山中4因子 (Oct4, SOX2, Klf4, c-Myc) の発現カセットを組み込み、MEF へ導入して iPS 細胞誘導と人工染色体の脱落制御を行う。

#### 1. Oct4 の核—細胞質間輸送と細胞リプログラミング

Oct4 の核—細胞質間輸送の平衡状態を変えた Oct4 変異体を発現する ZHBTc4 由来の安定発現細胞株を用いてマイクロアレイ遺伝子発現解析を行った。その結果、ほとんどの Oct4 下流の遺伝子群は変異型 Oct4 によっても野生型 Oct4 と同様に制御されていることが分かった。また、発現に差異の見られた Oct4 下流の遺伝子に関しては、変異型 Oct4 と Sox2, KLF4, c-Myc による MEF のリプログラミングの際にそれらの過剰発現やノックダウンを行ったが、有意な影響は見られなかった。リプログラミングに必要な核内リプログラミング関連因子を単離・同定する目的で、野生型、あるいは変異型 Oct4 を発現する安定発現細胞株を用いて、核画分に存在する Oct4 結合タンパク質の単離・同定を進めている。

#### 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

ES 細胞で高発現を示す複数の importin $\beta$  ファミリー遺伝子をそれぞれノックダウンすると、Nanog, Oct4, Sox2 の遺伝子発現に、それぞれが異なる影響を示すことが分かった。また、ES 細胞の未分化性維持に不可欠である輸送因子 importin  $\alpha 1$  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内輸送を促進していることが分かった<sup>1)</sup>。さらに、通常、細胞質に存在する importin  $\alpha 1$  の核内集積が細胞の老化をもたらすことがわかった<sup>5)</sup>。

#### 3. 脱落制御可能な人工染色体の作製

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、この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<sup>3) 4)</sup>。更に、この人工染色体へ山中4因子 (Oct4, SOX2, Klf4, c-Myc) からなる各種発現誘導カセットを組み込み、これら4因子からの多様な発現レベルを確認した。

#### 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 細胞誘導カセットを組み込んだ人工染色体を MEF へ導入し、iPS 細胞誘導と人工染色体脱落実験を進めている。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

1. Ogawa Y, Miyamoto Y, Oka M, 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)

2. 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)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 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)