

高橋 淑子

京都大学大学院理学研究科・教授

神経堤細胞をモデルとした生体内での細胞リプログラミング法の開発

## §1. 研究実施体制

### (1)「高橋」グループ

① 研究代表者:高橋 淑子(京都大学大学院理学研究科、教授)

② 研究項目

- ・NC細胞を中心とした神経幹細胞の動態制御と生体内リプログラミング法の基盤作り
- ・生体内イメージング法を用いたNC細胞リプログラミングと細胞動態の制御

### (2)「國貞」グループ

① 主たる共同研究者:國貞 隆弘(岐阜大学、教授)

② 研究項目

- ・ES→NC分化誘導過程における分化制御因子の検証

### (3)「荻野」グループ

① 主たる共同研究者:荻野 肇(奈良先端科学技術大学院大学、研究チーム長)

② 研究項目

- ・ツメガエル胚におけるヒストン脱メチル化因子を用いたリプログラミング系の確立

### (4)「榎本」グループ

① 主たる共同研究者:榎本 和生(大阪バイオサイエンス研究所、研究部長)

② 研究項目

- ・エピジェネティック制御ネットワークの構築と可視化

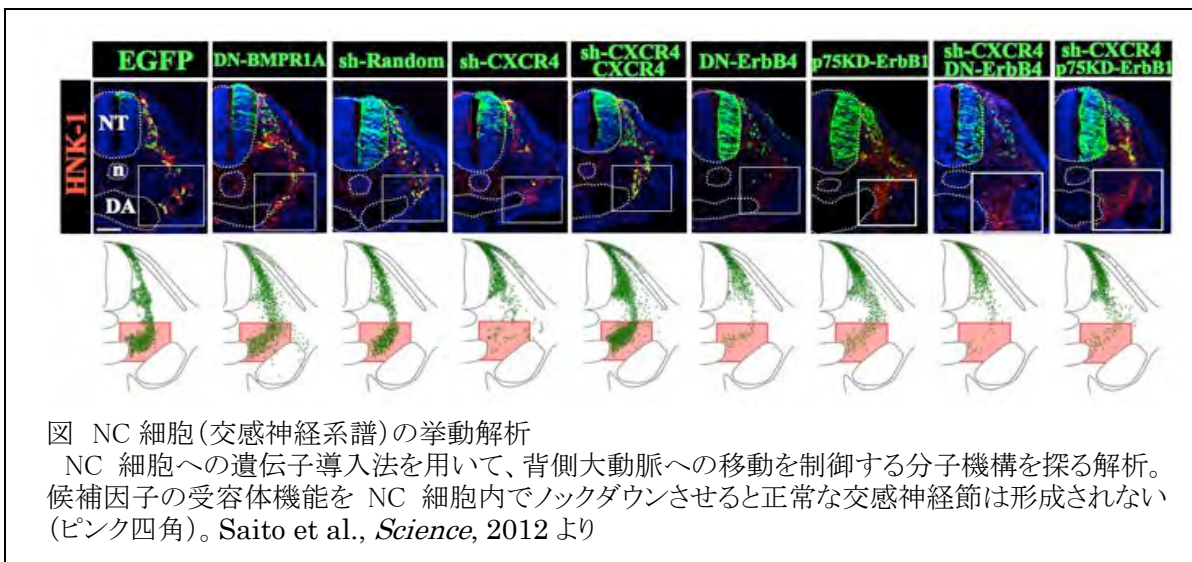
## §2. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(3-1)に対応する)

### A. 高橋グループ(京都大学大学院理学研究科)

NC細胞の研究:NC細胞の研究は、古くからニワトリ胚を中心に発展してきた。我々はその豊富な知見の蓄積をいかすと共に、さらに分子生物学的なアプローチを取り入れた解析法を考案し、NC細胞の分化制御機構の解明を目指して研究を進めている。H24年度は、主にNC細胞 lineage 中の交感神経系に注目し、その挙動を制御する周辺環境およびそのシグナルの解析を行った。交感神経前駆細胞(Sg細胞)が最初に到達するのが背側大動脈であることから、この血管の影響を調べたところ、Sg細胞の移動における誘引活性を有することを見出した。誘引活性の実体は、ケモカインSDF1とNeuregulin1であった。さらにこれら2種類の誘引因子は、背側大動脈から分泌されるBMPによってその周辺組織で発現誘導を受け、その結果としてSg細胞に作用することが明らかになった<sup>2)</sup>。

SN細胞の研究:脊椎動物を特徴づけるもう一つの器官である尾(しっぽ)は、体後方領域で起こる神経形成(Secondary Neurulation:SN)を中心に形成される。H24年度は、SN前駆細胞への遺伝子導入効率の最適化を行うと共に、*in vivo*におけるSN細胞のライブイメージング解析法の立ち上げを行った。



## B. 國貞グループ(岐阜大学大学院医学研究科)

我々が開発したES細胞の神経堤細胞(NC細胞)への分化誘導法や生体からのNC細胞の分離法を駆使して、NC細胞の発生とその分化の機構の解明をめざしている。現在まで、NC細胞系列レポーターSox10-EGFPを組み込んだES細胞とマウスを作製し、NC細胞の標識に成功し、ES細胞と生体のNC細胞の両面からのリプログラミング関連遺伝子の解析が可能となっている。さらにNC細胞の純化し、DNAアレーによる遺伝子発現の差異に基づいてNC細胞遺伝子データベースの構築にも成功している。

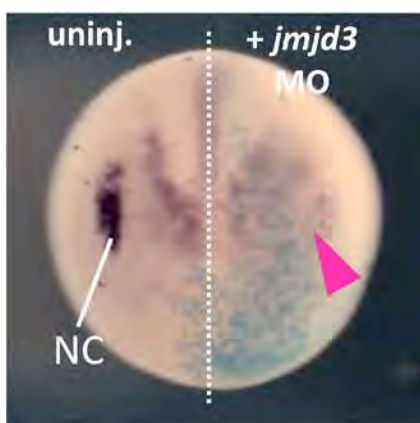
### 進捗・成果

DNAアレーで構築したNC細胞遺伝子データベースより、NC細胞リプログラミングに適すると推定される遺伝子を絞り込み、その解析を行った。候補遺伝子を産総研の五島らから供給されたレトロウイルスを使って、Sox10-EGFPを組み込んだES細胞のNC細胞分化誘導系や、同レポ

ーターを組み込んだマウスの発生初期のNC細胞培養系に遺伝子導入して、NC細胞発生・分化に関する遺伝子の同定を行っている。

### C. 荻野グループ(奈良先端科学技術大学院大学バイオサイエンス研究科)

ヒストン H3 の 27 番目のリジン(H3K27)の脱メチル化は、クロマチンの脱凝縮に作用することが知られている。本年度までに、H3K27 脱メチル化酵素の Jmjd3 あるいは Utx を、様々な分化制



Jmjd3に対するアンチセンスモルフォリノオリゴ(MO)を導入したツメガエル初期神経胚。MOを導入した側でNCマーカー(*Twist*)の発現が失われている(矢頭)。

御転写因子(NC由来の神経節細胞で発現する転写因子 Neurogenin1(Ngn1)や、眼で発現するPax6等)と組み合わせてツメガエル胚で発現させると、それぞれの転写因子がもつ分化誘導効果を増大させることを発見した。その作用機序についてクロマチン免疫沈降法による解析をおこなったところ、Pax6とJmjd3を一緒に発現させた場合、Pax6蛋白質が内在のPax6遺伝子の自己活性化型エンハンサーに結合しやすくなることがわかった。また、Jmjd3はNC特異的に発現し、その発現をアンチセンスモルフォリノオリゴで阻害すると、NC形成が阻害されることがわかった(左図)。

一方、ヒストン H3 の 9 番目のリジン(H3K9)に対する脱メチル化もクロマチンの脱凝縮に働くことが知られている。そこで、H3K9 脱メチル化酵素の Jmjd1A や Jmjd2A, Jhdm1D 等も同定単離し、Ngn1 や Pax6 等の分化制御転写因子と組み合わせて発現させてみたが、Jmjd3 や Utx のような分化促進活性はみられなかった。このことから転写因子の分化誘導効果を増大させる活性は、H3K27 脱メチル化酵素に特異的な可能性が示唆された。

また、NCサブタイプ間での細胞リプログラミングに向けて、*Slug*や*Six1*、*Otx2*、*Pax2*等の遺伝子のNC特異的なエンハンサーを用いたトランスジェニック実験系の構築を進めた。特記すべきこととして、*Pax2*とそのパラログ*Pax8*のエンハンサー解析から、原索動物から脊椎動物への遺伝子進化においては、組織特異的なサイレンサー配列の新規獲得が重要であったことを発見した。この発見は、遺伝子の活性化に働くエンハンサーの変化にのみ注目してきた従来の分子進化学の考え方を覆すものとなった<sup>10)</sup>。

### D. 榎本グループ(大阪バイオサイエンス研究所)

ショウジョウバエ感覚ニューロンを解析モデルとして、末梢神経系の機能分化機構およびリプログラミング機構を簡便に評価できるアッセイ系を構築した<sup>12,13,14)</sup>。このシステムを用いて網羅的RNAiスクリーニングを開始し、すでに10個程度のエピジェネティック制御因子が、それぞれ異なる末梢神経分化に関わる可能性を見いだした。今後、さらにスクリーニングを進行させるとともに、同定したエピジェネティック因子群の機能について、とくに「末梢神経への分化制御」について詳

細な解析を行う予定である。

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ◆高橋グループ

1. Macdonald, J., Taylor, L., Sherman, A., Kawakami, K., Takahashi, Y., Sang, HM. and McGrew, MJ.: Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using *piggyBac* and *Tol2* transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**: 1466-1472, 2012 (DOI:10.1073/pnas.1118715109)
2. Saito, D., Takase, Y., Murai, H. and Takahashi, Y.: The dorsal aorta initiates a molecular cascade that instructs sympatho-adrenal specification. *Science (Report)*, **22**, 1578-1581, 2012 (DOI:10.1126/science.1222369)
3. Freeman, S., Chrysostomou, E., Kawakami, K., Takahashi, Y. and \*Daudet, N.: Tol2-mediated gene transfer and in ovo electroporation of the otic placode: a powerful and versatile approach for investigating embryonic development and regeneration of the chicken inner ear. *Methods Mol Biol.* **916**:127-39, 2012 (DOI:10.1007/978-1-61779-980-8\_10)
4. Atsuta, Y., Tadokoro, Y., Saito, D., Takahashi, Y.: Transgenesis of the Wolffian duct visualizes dynamic behavior of cells undergoing tubulogenesis in vivo. *Dev. Growth Differ.*, in press

##### ◆國貞グループ

5. Aoki, H., Hara, A., Era, T., Kunisada, T. and Yamada, Y.: Genetic ablation of *Rest* leads to in vitro-specific derepression of neuronal genes during neurogenesis. *Development*, **139**: 667-677, 2012. (DOI:10.1242/dev.072272)
6. Yamada, K., Ohno, T., Aoki, H., Semi, K., Watanabe, A., Moritake, H., Shiozawa, S., Kunisada, T., Kobayashi, Y., Toguchida, J., Shimizu, K., Hara, A. and Yamada, Y.: EWS/ATF1 expression induces sarcomas from neural crest-derived cells in mice. *J. Clin. Invest.* in press (DOI:10.1172/JCI63572)
7. Hirata, A., Utikal, J., Yamashita, S., Aoki, H., Watanabe, A., Yamamoto, T., Okano, H., Bardeesy, N., Kunisada, T., Ushijima, T., Hara, A., Jaenisch, R., Hochedlinger, K. and Yamada, Y.: Dose-dependent roles for canonical Wnt signaling in de novo crypt formation and cell cycle properties of the colonic epithelium. *Development*, **140**(1), 66-75, 2013 (DOI:10.1242/dev.084103)
8. Yoshimura N., Motohashi, T., Aoki, H., Tezuka, K., Watanabe, N., Wakaoka, T., Tra,

T. and Kunisada, T.: Dual origin of melanocytes defined by Sox1 expression and their region-specific distribution in mammalian skin. *Dev. Growth Differ.*, **55**, 270-281, 2013. (DOI: 10.1111/dgd.12034)

◆萩野グループ

9. Sudou, N., Yamamoto, S., Ogino, H. and Taira, M.: Dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cer* and *gsc* in the stepwise formation of the Spemann-Mangold organizer. *Development*, **139**: 1651-1661, 2012. (DOI:10.1242/dev.068395)

10. Ochi, H., Tamai, T., Nagano, H., Kawaguchi, A., Sudou, N. and Ogino, H.: Evolution of a tissue-specific silencer underlies divergence in the expression of *pax2* and *pax8* paralogues. *Nat. Commun.*, **3**: 848, 2012. (DOI:10.1038/ncomms1851)

11. Nabeshima, A., Nishibayashi, C., Ueda, Y., Ogino, H., Araki, M.: Loss of cell-extracellular matrix interaction triggers retinal regeneration accompanied by *Rax* and *Pax6* activation. *Genesis*, in press (doi: 10.1002/dvg.22378).

◆榎本グループ

12. Eneling, K., Brion, L., Pinto, V., Pinho, M. J., Sznajdar J. I., Mochizuki, N., Emoto, K., Soares-da-silva, P. and Bertorello, A. M.: Salt-inducible kinase 1 regulates E-cadherin expression and intercellular junction stability. *FASEB J.*, **26**: 3230-3239, 2012 (DOI:10.1096/fj.12-205609)

13. Lee, S., Uchida, Y., Emoto, K., Umeda, M., Kuge, O., Taguchi, T. and Arai, H.: Impaired retrograde membrane traffic through endosomes in a mutant CHO cell defective in phosphatidylserine synthesis. *Genes Cells.*, **17**(8), 728-736, 2012 (DOI:10.1111/j.1365-2443.2012.01622.x)

14. Kato, U., Inadome, H., Shirouzu, H., Emoto, K., Kobayashi, T. and Umeda, M.: An aminophospholipid translocase complex P-type ATPase ATP8A1 and mROS3 regulates cell migration. *J. Biol. Chem.*, **15**;288(7):4922-34. (DOI: 10.1074/jbc.M112.402701)