

「エピジェネティクスの制御と生命機能」研究領域 領域活動・評価報告書

－平成 25 年度中間評価実施研究課題－

研究総括 向井 常博

1. 研究領域の概要

本研究領域は、エピジェネティクスの制御と生命機能の解明という視点をもった研究を対象とします。より詳しくは、エピジェネティクスの制御機構の解明、様々な生命現象とエピジェネティクスの関わり、エピジェネティクスの多様性や異常がかかわる疾患の解析を対象とします。それらの研究を通してエピジェネティクスの生命機能としての分子基盤を明らかにする事で、細胞リプログラミングに立脚した幹細胞作製・制御による革新的医療基盤技術の創出を目指します。

具体的な研究内容としては、1) 動植物を問わずさまざまなモデル生物を用いてエピジェネティクスの制御機構をいろいろな角度から追求し、明らかにする、2) エピジェネティクスの個体差・多様性を探るとともに、エピジェネティクスの異常にもとづく疾患の解析を行なう、3) エピジェネティクスの解析や制御に資する技術の開発を行う、といった課題が考えられます。

2. 中間評価対象の研究課題・研究者名

件数: 1件(うち、通常型1件)

※研究課題名、研究者名は別紙一覧表参照

3. 研究実施期間

平成 22 年 10 月～平成 26 年 3 月(※平成28年 3 月終了予定)

4. 中間評価の手続き

研究者の研究報告書を基に、評価会(領域会議等)での発表・質疑応答、領域アドバイザーの意見などを参考に、下記の流れで研究総括が評価を行った。

(中間評価の流れ)

平成 25 年 7 月 評価会開催

平成 25 年 8 月 研究総括による中間評価

平成 25 年 9 月 被評価者への結果通知、研究計画見直し

5. 中間評価項目

(1) 研究の進捗状況と今後の見込み

(2) 研究成果の現状と今後の見込み

6. 評価結果

総論

対象が1名なので省略

1. 牧 信安 研究者「両生類の再生を支えるエピジェネティック機構の解明と応用」

イモリのレンズ再生において、卵母細胞型リンカーヒストン B4 の発現がレンズの分化転換に必要であるが、B4 の体細胞発現に Klf4 が関わっている可能性を明らかにした。また、レンズの分化転換に DNA の脱メチル化(脱メチル化酵素)が必要であることを明らかにした。

実験系の構築に予想以上に時間がかかり実験は緒についたところである。B4の発現制御を中心に研究が進められているが、目的は再生(脱分化・分化誘導機構)そのもののエピジェネティックな解明である。今後の展開の期待は、脱分化・分化誘導のエピジェネティックな分子基盤を明らかにすることにより、再生医療への応用に結びつけることである。

7. 評価者

研究総括 向井常博 西九州大学 学長

領域アドバイザー(五十音順、所属、役職は平成 25 年 3 月末現在)

牛島 俊和 国立がん研究センター 上席副所長
角谷 徹仁 国立遺伝学研究所総合遺伝研究系 教授
金児-石野 知子 東海大学健康科学部 健康科学研究科 教授
古関 明彦 理化学研究所 免疫アレルギー化学総合研究センター グループディレクター
佐々木 裕之 九州大学生体防御医学研究所 所長
白鬚 克彦 東京大学分子細胞生物研究所 教授
眞貝 洋一 理化学研究所基幹研究所 主任研究院
田嶋 正二 大阪大学蛋白質研究所 教授
中西 理 独立行政法人 医薬基盤研究所 部長
広瀬 進 国立遺伝学研究所・名誉教授

(参考)

件数はいずれも、平成 25 年 12 月末現在。

(1)外部発表件数

	国 内	国 際	計
論 文	0	0	0
口 頭	1	2	3
その他	2	1	3
合 計	3	3	6

(2)特許出願件数

国 内	国 際	計
0	0	0

(3)受賞等

・なし

(4)招待講演

国際 0件

国内 1件

別紙

「エピジェネティクスの制御と生命機能」領域 中間評価実施 研究課題名および研究者氏名

研究者氏名 (参加形態)	研 究 課 題 名 (研究実施場所)	現 職(平成 26 年 3 月末現在) (応募時所属)	研究費(3 年間) (百万円)
牧 信安 (専任)	両生類の再生を支えるエピジェネ ティクスの機構の解明と応用 (大阪大学 蛋白質研究所)	科学技術振興機構 さがけ研究員 ((米) デイトン大学)	74

牧信安 (専任)	両生類の再生を支えるエピジェネ ティクス機構の解明と応用	科学技術振興機構 さがけ研究員 ((米)デイトン大学)	74
-------------	---------------------------------	-----------------------------------	----

研究報告書

「両生類の再生を支えるエピジェネティクス機構の解明と応用」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 22 年 11 月～平成 28 年 3 月

研究者: 牧 信安

1. 研究のねらい

両生類は我々と同じ脊椎動物であるにも関わらず、極めて高い組織再生能を有している。例えば、有尾両生類イモリは、レンズ、網膜、脳、脊椎、四肢、顎、心臓、小腸等、体のほとんどの組織を再生することができる。この高い再生能はユニークな細胞制御、1) **脱分化**と、それに引き続く 2) **分化誘導**によって支えられている(図 1)。本さがけ研究では、上記のユニーク細胞制御に着目し、両生類の再生能力を支えるエピジェネティックな基盤を明らかにする。最終的に、得られた知見を再生医療へ応用する。

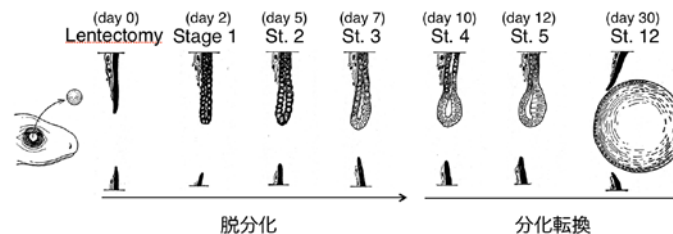


図1. レンズ再生における脱分化と分化転換

テーマ 1) 脱分化

一般に終末分化した細胞は多分化性が失われると考えられているが、イモリの再生過程では、脱分化・分化転換と呼ばれる可塑的な細胞制御が見られる。この過程で分化細胞が別の細胞種へと変化する。脱分化を体細胞核のリプログラミングとして捉え、なぜイモリは体細胞核を可塑的に制御出来るのか、エピジェネティックな視点で解明する。さらに、得られた知見を iPS や、分化細胞に対するダイレクトリプログラミングの効率化に応用する。

テーマ 2) 分化誘導

iPS や ES 細胞からの分化誘導研究が進む一方で、これらの幹細胞から組織レベルでの再生を誘導することにほとんど成功していない。この最大の理由は、位置情報の欠如と考えられる。組織の再生には、失われた位置情報を正しく再編し、幹細胞に 3 次元的な組織形成を誘導する必要がある。本研究では、両生類の手の再生系をモデルとして研究を行い、位置情報の再編機構を解明する。特に、シグナル産生細胞の可塑的な制御が位置情報を再編していると考え、このエピジェネティック制御を解明する。

2. 研究成果

さがけ研究3年間で得られた研究成果について、概要と詳細に分けて記載ください。図、表、写真等を含めて構いません。「5. 主な研究成果リスト」を参照してください。

(1) 概要

本研究ではイモリで得られた知見を応用し、再生出来ない動物に再生を誘導することを目指している。ネッタイツメガエルは、成体で四肢を再生できないこと、ゲノム配列が解読されていること、そしてトランスジェニック技術の確立していることから、ネッタイツメガエルの系を導入した。

エピジェネティクスは細胞レベルでの制御であるため、分化や再生におけるエピジェネティクス研究では、均一な細胞集団に対して解析することが必須である。厳密な解析のために PEC (虹彩色素上皮) からレンズへの分化転換培養系を導入した。さらにこの系に対するノックダウン系も新規に確立し、エピジェネティクス研究に先鋭化した実験系を構築することが出来た。

実験系の構築と平行して卵母細胞型リンカーヒストン B4 の研究を進めた。イモリはなぜ体細胞で B4 を発現できるか明らかにする目的で、B4 のプロモーター解析を行った。その結果、B4 の体細胞発現に TSS -272 bp に存在する Klf4 結合予想配列が必要であることを示した。この結果は、iPS 因子と B4 の遺伝子ネットワークを形成している可能性を示唆するものである。

イモリの脱分化過程における DNA 脱メチル化が B4 の発現制御に関わっていることが予想された。そこで、脱メチル化酵素の解析を進め、ノックダウン実験により、DNA 脱メチル化酵素がレンズ分化転換に必要であることを示した。

(2) 詳細

1) 実験系の構築

1-1) ネッタイツメガエル

イモリの再生能力は極めて高いが、ゲノム配列が未解読なため、ゲノムワイドなエピジェネティック解析をイモリで行うことは出来ない。ネッタイツメガエルは、幼生期後肢の再生能力を持ち、そのゲノム配列も解読されている。そして、ネッタイツメガエル成体は後肢再性能が失うので、ネッタイツメガエルを導入することにより再生能が失われる原因をステージ間や動物間で比較解析することが出来る。さらに、本研究では再生出来ない動物に再生を誘導することを目指しており、この目的にもトランスジェニック技術が確立しているネッタイツメガエルは適している。そこで、新規にネッタイツメガエル系を立ち上げ、トランスジェニックカエルを作成出来るまでに実験系を構築した。この系を用いて 2-2) に示す B4 トランスジェニックカエルを作出した(図 2)。

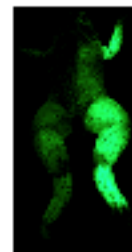


図 2. B4 遺伝子が導入されたネッタイツメガエル。1.5ml 瓶により CNV-B4-2A-CFP を導入した。

1-2) 虹彩色素上皮細胞培養に対する遺伝子ノックダウン実験系の開発

エピジェネティクスは細胞レベルでの制御である。したがって、分化や再生におけるエピジェネティクス研究では、細胞系譜を明確にし、均一な細胞集団に対して解析することが必須である。しかし、虹彩 PEC 層はストローマ層と融合しているため、レンズ再生中のイモリから PEC 層のみを回収・解析することが不可能であった。そこで、単離した PEC 層をレンズ細胞

へ分化させる組織培養系 (Hayashi et al, 2006) を導入し、PEC-レンズ分化系譜に対する解析を可能にした(図 3)。さらに、この細胞培養系を用いて遺伝子ノックダウンに成功し、両生類の再生研究で唯一と言って良い遺伝子ノックダウン系を初めて構築した。以上のように、脱分化・分化転換に対するエピジェネティクス研究に特化した実験系を開発することが出来た。実際にこの系を用いて、3) レンズ分化転換における DNA メチル化制御の必要性を示した。

1-3) 遺伝子発現データベースの構築

手持ちのイモリ EST データベースはスケールの小ささから、再生過程の遺伝子発現解析やヒストン複合体 MAS 解析のデータベースに耐えうるものではなかった。そこでイモリのレンズ再生過程の虹彩に対して 20Gb スケールの RNA seq データベースを構築した。このデータベースは遺伝子発現解析や MAS 解析に十分耐えうるクオリティであった。3) に示す DNA メチル化関連酵素群の解析に、本データベースの配列を用いた。

2) B4 による体細胞核のリプログラミングの作用機序の解明

卵母細胞への核移植で引き起こされる体細胞核リプログラミング過程で、体細胞型リンカーヒストン H1 は卵母細胞型リンカーヒストン B4 に置換されることが知られる。この置換はクロマチンを弛緩し、体細胞核のリプログラミングに必要であることが明らかになっている。さきがけ研究以前に、イモリのレンズ再生では体細胞である PEC で B4 が発現すること、そしてこの発現がレンズ分化転換に必要であることを見出した。さきがけ研究前期 3 年で、イモリ B4 はなぜ体細胞で卵母細胞型リンカーヒストンが発現できるか解明する目的で、2-1) B4 のプロモーター解析を行った。そして 2-2) B4 が再生出来ない動物に再生を誘導するか明らかにする目的で、B4 トランスジェニックカエルを作成した。さらに、2-3) B4 の iPS 誘導活性の解析を行った。

2-1) B4 プロモーター解析

イモリはなぜ体細胞で B4 を発現できるか明らか

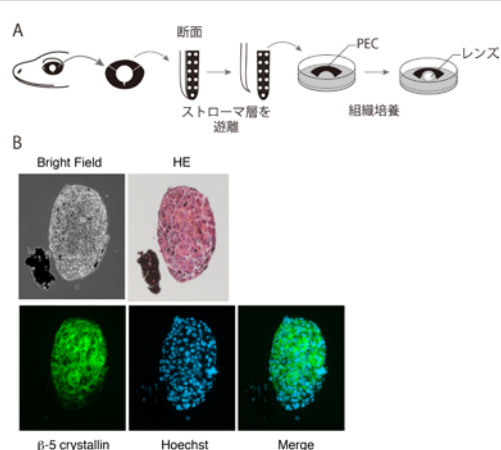


図 3. レンズ分化転換の組織培養系. A) PEC 層はストローマ層と融合している。均一な細胞集団を得るために、PEC 層からストローマ層を酵素的に解離した。得られた PEC 層を組織培養しレンズへの分化転換を誘導した。B) 誘導体におけるレンズ分化マーカー、 β -5 crystallin の発現。

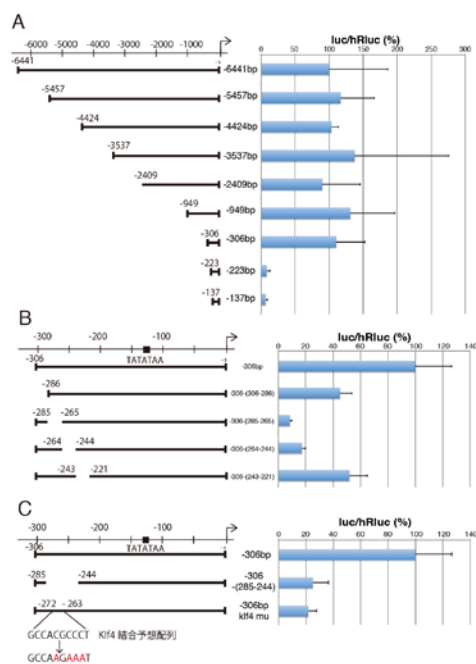


図 4. B4 遺伝子のプロモーターアッセイ. (A) B4 TSS 上流 6.4kbp のディレクションコンストラクトを用いた解析により、TSS-306 から -223 にプロモーター活性があることが明らかになった。(B) その内部配列をさらにディレクションし、TSS-285 から -244 にプロモーター活性があることが明らかになった。(C) この約 40 bp の配列に対してエレメント解析を行った所、Klf4 結合配列が検索された。Klf4 結合配列の変異コンストラクトのプロモーター活性は顕著に減少した。

にする目的で、B4のプロモーター解析を行った。PEC 初代培養に対してプロモーターアッセイを行い、B4 の体細胞発現に関わる領域を探索した。B4 TSS 上流 6.4kb に強いプロモーター活性が認められたので、種々の欠失変異コンストラクトを用いて領域を狭めて解析を進めた。最終的に部分変異コンストラクトを用いて TSS -272 bp に存在する Klf4 結合予想配列 (GCCACGCCCT) が B4 の体細胞発現に関わる領域であることを突き止めた(図 4)。iPS4 因子の 1 つである Klf4 が PEC の分化転換過程で発現することが明らかにされている (Maki et al., 2009)。今回の結果から、幹細胞因子と B4 が単に独立して発現しているわけではなく、それらが複雑な遺伝子ネットワークを形成している可能性が推察された。今後は Klf4 のノックダウンを行い、Klf4 による B4 の体細胞発現機構を明らかにする。

2-2) B4 による再生誘導の試み

再生過程でイモリは B4 が発現するのに対して、組織再生出来ないカエルは、B4 を発現しない。したがって、B4 の発現と両生類の組織再生能の連関が示唆された。そこで、B4 をカエルで発現することにより、四肢の再生が誘導できるか検証した。

CMV-B4-2A-GFP をネットアイツメガエルに導入し、体細胞で B4 を発現するトランスジェニックカエルを作成した。トランスジェニックカエル 29 個体の前肢を切断し組織再生誘導を検証したが、顕著な再生能の改善は認められなかった。今後は、発現プロモーターやヒストンシヤペロンの導入について検討する必要がある。

2-3) iPS 誘導活性の解析

卵母細胞型リンカーヒストンが、iPS 誘導活性を持つ可能性が期待された。そこで、MEF や NS(神経幹細胞)でイモリ B4 を発現させ、iPS 誘導活性を解析した。B4 単独で発現した場合でも、B4 と山中 4 因子(Oct4, Klf4, cMyc, Sox2)と共発現した場合でも、iPS 誘導活性は確認されなかった。

3) レンズ分化転換における DNA メチル化制御の必要性

マウス卵母細胞型リンカーヒストン H1foo のプロモーター領域は細胞分化にともない DNA メチル化される。さらにプロモーターアッセイにより、この領域のメチル化は H1foo の発現を抑制することが示されている (Maeda et al., 2008)。以上から、イモリの脱分化過程における DNA 脱メチル化が B4 の発現制御に関わっていることが予想された。そこで、DNA 脱メチル化酵素について研究を行った。組織培養 PEC に対するノックダウン実験により脱メチル化酵素がレンズ分化転換に必要であることを明らかにした (図 5)。今後、脱分化・分化転換における脱メチル化酵素と B4 の発現制御機構を統合して理解する。

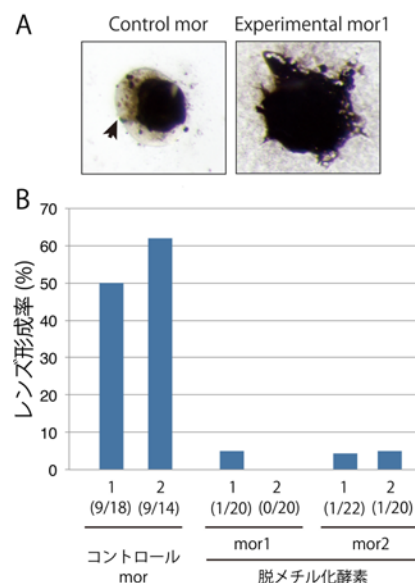


図 5. 脱メチル化酵素のノックダウンによるレンズ分化転換の阻害. A) レンズ形成の阻害. B) レンズ形成率. 脱メチル化酵素に対して 2 種類の morpholino を作成し (mor1, mor2)、それぞれ 2 回実験を行った。

3. 今後の展開

3年間のさがけ研究結果をふまえて、残りのさがけ研究期間(4年目、5年目)における、今後の研究の展開について記載してください。

テーマ 1) 脱分化

B4 の体細胞発現制御

B4 のプロモーター解析で、Klf4 結合配列が B4 の体細胞発現に関わることが明らかになった。これまで両遺伝子の関連は予想していなかったが、前半 3 年間の研究により両遺伝子のネットワークを解析するきっかけが与えられた。iPS と核移植のリプログラミングでそれぞれ働く遺伝子のネットワークを示すことが出来れば意義深いため、引き続き研究を進める。まず、Klf4 のノックダウン実験により、Klf4 が B4 の発現制御を行っていることを明らかにすることから始める。

B4 の機能解析

B4 によるカエルの再生誘導や、iPS 誘導について期待した結果は得られていない。この研究を進めるためには、ヒストンシャペロンなど B4 の機能を補助する分子についての考慮が必要である。さがけ研究開始当初、有効な遺伝子発現データベースがなかったため、B4 の機能解析は限られたことしか出来なかった。しかし、さがけ 3 年間で、レンズ再生虹彩組織の RNA seq を行い信頼できる遺伝子発現データベースを作成することが出来た。これを利用して複合体タンパク質の同定を足がかりに、B4 の機能解析を行う。レンズ再生中の PEC に対して免疫沈降し、MAS 解析により B4 複合体タンパク質を同定する。特に、この解析でクロマチンへのリクルート機構を解明したい。B4 が Sox2, Pax6, Msx1 などの特定の転写因子と結合し MafB や crystallin などの遺伝子へとリクルートされるのか、もしくは NAP1 などのヒストンシャペロンによって非選択的にリクルートされるのか明らかにする。さらに、B4 がリクルートされる遺伝子の同定も行う。PEC の脱分化過程で B4 がゲノムワイドにクロマチンにリクルートされているのか、再生過程で活性化される遺伝子に選択的にリクルートされているか、ChIP PCR で解析する。

DNA メチル化制御

さがけ研究前半で DNA 脱メチル化酵素がレンズ分化転換に必要であることを示した。両生類はなぜ分化転換が可能なのか、それを支える基盤をこの脱メチル化酵素を中心として解析する。脱メチル化酵素のノックダウン実験により、どの遺伝子の脱メチル化が必要なのか、ターゲット遺伝子を明らかにする。特に、脱メチル化酵素と B4 の関連を明らかにしたい。当初考えたように、脱分化・分化転換における B4 の発現に B4 遺伝子の脱メチル化が必要なのか解析する。別の可能性として、B4 によるクロマチンの弛緩が脱メチル化酵素のリクルートを促していることが考えられるので、この可能性も検証する。

テーマ 2) 分化誘導

組織の再生に失われた位置情報の再編が必要である。本テーマでは、シグナル産生細胞が可塑的に制御され位置情報を再編していることを、両生類の四肢再生系をモデルとして明らかにする。この細胞の制御が、四肢を再生できるイモリと、再生出来ないカエルで、どのように

異なるか明らかにする。さらにこの細胞の遺伝子発現をRNA seqにより解析するとともに、この発現制御を可能にするエピジェネティックな制御を明らかにする。

4. 評価

(1) 自己評価

再生医療への応用のために、再生出来ない動物に再生を誘導することを本研究の最終目標としている。成体が四肢を再生出来ないネットアイツメガエルは、ゲノム配列が解読されていることやトランスジェニック技術が確立している点が有効であるため、この系を新規に導入しトランスジェニックカエルを作成出来るまでに系を構築した。カエルに対する再生誘導実験が可能になるだけでなく、イモリとカエルの再生機構を比較解析し、生物に学べる環境を構築出来たことは、今後のさきがけ研究の進展に極めて意義深いと考えている。

エピジェネティクスは細胞レベルでの制御であるため、エピジェネティクス解析は、均一な細胞集団に対して行う必要がある。私はこの点を突き詰め、単離したPECからレンズ分化まで追跡出来る培養系を導入した。さらにこの系に対して、遺伝子ノックダウンを行うことに成功した。正にエピジェネティクス研究に先鋭化した系を構築出来たことについて高く自己評価している。

RNA seqにより、B4 複合体の MAS 解析に必要な遺伝子配列データベースも構築され、今後の研究に必要な基盤がほぼ整ったことは一定の成果である。

必要な実験系の構築に予想以上に時間がかかったが、一方で B4 の体細胞発現に Klf4 結合配列が関わっていること、そしてDNA脱メチル化酵素がレンズ分化転換に必要であることなどを明らかにし、生物学的な成果も得ることが出来た。DNA 脱メチル化酵素の研究では、構築された遺伝子配列データベースと PEC 培養系ノックダウンが有効に働いた。このことは、今後の展開の確実性に関わるもので意義深い。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、中間評価を行った)。

イモリのレンズ再生において、卵母細胞型リンカーヒストン B4 の発現がレンズの分化転換に必要であるが、B4 の体細胞発現に Klf4 が関わっている可能性を明らかにした。また、レンズの分化転換に DNA の脱メチル化(脱メチル化酵素)が必要であることを明らかにした。

実験系の構築に予想以上に時間がかかり実験は緒についたところである。B4の発現制御を中心に研究が進められているが、目的は再生(脱分化・分化誘導機構)そのもののエピジェネティックな解明である。今後の展開の期待は、脱分化・分化誘導のエピジェネティックな分子基盤を明らかにすることにより、再生医療への応用に結びつけることである。

5. 主な研究成果リスト

本研究課題に関連して研究者主導で得られた成果について、代表的なものを中心に**各項目5つ程度を目安**に記載してください。ただし、特許については、本課題の成果であれば全て記載してください。2014年6月時点での公開を希望しない成果は、その旨記載してください。

※論文は、2014年3月末までにアクセプトされたものであれば、in press(印刷中)でも構いません

※特許の場合、通常、出願情報が公開されるのは出願日から1年半以降です。それ以前に

公開する場合は出願人にご確認ください。

(1)論文(原著論文)発表

無

(2)特許出願

研究期間累積件数:0 件

(2)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

英語総説 (invited review)

1. **Maki N.** *, Kimura H., Epigenetics and Regeneration. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2013, 367, 237–257 (*, corresponding author)

学会発表

1. **Maki N.**, Suetsugu-Maki R., Sano S., Nakamura K., Nishimura O., Tarui H., Del Rio-Tsonis K., Ohsumi K., Agata K. Tsonis P.A. Stepwise reprogramming in newt lens transdifferentiation. Asia-Pacific Developmental Biology Conference 2012, 台北, 台湾, 2012 年 10 月
2. **Maki N.**, Suetsugu-Maki R., Sano S., Nakamura K., Nishimura O., Tarui H., Del Rio-Tsonis K., Ohsumi K., Agata K. Tsonis P.A. Expression of oocyte-type linker histone is required for newt lens transdifferentiation. Commemorative Symposium for the 27th International Prize for Biology. 京都, 2011 年 11 月.
3. **Maki N.**, Suetsugu-Maki R., Sano S., Nakamura K., Nishimura O., Tarui H., Del Rio-Tsonis K., Ohsumi K., Agata K., Tsonis P.A., Expression of oocyte-type linker histone is required for newt lens transdifferentiation. 日本発生生物学会, 那覇市, 2011 年 5 月

招待講演

1. 牧 信安 イモリの分化転換における核内分子機序. 愛媛大学グローバル COE セミナー, 松山市, 2011 年 9 月

社会貢献

1. 牧 信安. イモリの分化転換における体細胞核のリプログラミング, ノートルダム清心女子高等学校, 2012 年 10 月 *スーパー・サイエンス・ハイスクールでの講義.