

平成22年 5月 28日現在

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770100

研究課題名（和文）細胞分化のタイミングを制御する転写因子 Hes の分解システムの解明

研究課題名（英文）Analyses on the degradation of Hes, a transcription factor, regulates timings of cellular differentiation

研究代表者

小林 妙子 (KOBAYASHI TAEKO)

京都大学・ウイルス研究所・助教

研究者番号：40402804

研究成果の概要（和文）：

転写因子 *Hes* は、周期的に発現を振動させてリズムを刻み、個体発生のタイミングを制御すると考えられてきた。リズムを刻むためには *Hes* の速やかな分解が必要だが、その分解がどのように制御されているのか、また *Hes* のリズムが実際にどのように細胞分化を制御しているのかは分かっていなかった。まず、*Hes7* タンパク質の分解について検討を行い、いくつかのアミノ酸がタンパク質分解だけではなく *Hes7* の機能に必須であることを明らかにした。また、マウス胚性幹(ES)細胞において *Hes1* の発現量が3-5時間の周期で振動（オシレーション）しており、*Hes1* の発現量に応じて分化の方向が異なること（*Hes1* が高い細胞は初期中胚葉に、低い細胞は神経に分化すること）を見いだした。さらに、*Hes1* の発現を完全に失った ES 細胞は、高い効率で均一に神経系に分化することを明らかにした。遺伝的に均一な集団である ES 細胞が、*Hes* のリズムを利用して様々な細胞に分化する能力を調節していることが分かった。

研究成果の概要（英文）：

The basic helix-loop-helix (bHLH) gene *Hes* is expressed in an oscillatory manner and regulates the differentiation timings at developmental stages. Oscillatory expression of *Hes* depends on rapid degradation of the gene products, but the precise mechanisms of both how the degradation of *Hes* protein are regulated and how the timings of cell differentiation are regulated by *Hes* oscillation remain unclear. First, we found that some lysine residues are essential not only for the instability of *Hes7* protein but also for the transcriptional repressor activity. Second, we found that expression of *Hes1* oscillates in mouse embryonic stem (ES) cells every 3-5 hours. ES cells expressing low and high levels of *Hes1* tended to differentiate into neural and mesodermal cells, respectively. Furthermore, inactivation of *Hes1* facilitated neural differentiation more uniformly at earlier time. We revealed that the cyclic expression of *Hes1* gene contributes to heterogeneous differentiation of homogenous ES cell populations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・機能生物化学

キーワード：細胞内タンパク質分解、転写因子の発現振動（オシレーション）

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞に発現している転写因子 Hes は周期的に発現が振動して、発生のタイミングを制御すると考えられてきた。Hes の周期的な発現振動にはネガティブフィードバックと Hes 遺伝子産物の速やかな分解が必須である。しかし、どのように Hes タンパク質の分解が制御されているのか、また Hes の振動が実際どのように細胞分化を制御するのかは全く明らかになっていなかった。

## 2. 研究の目的

細胞内でどのように Hes の分解が制御されているのか、また Hes の振動がどのように幹細胞の分化を制御しているのかを明らかにする事を目的とした。言い換えると、Hes の振動を支える細胞システム、ならびに、Hes の振動と幹細胞分化の関係を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

平成 20 年度

Hes7 タンパク質はユビキチン化されプロテアソームにより分解される。そこでユビキチン化を受けると予想されるリジン残基をそれぞれアルギニンに変換した変異体タンパク質(K14R, K17R, K22R, K52R, K55R, K129R, K211R)を用いてユビキチン化のターゲットとなるアミノ酸残基の探索とこれらの変異体の性質を解析した。

平成 21 年度

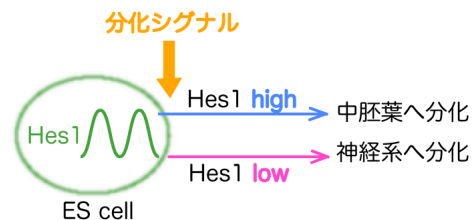
幹細胞のモデルとして ES 細胞を用い、Hes1 の発現を、免疫染色、一細胞からのリアルタイム PCR、Hes1 の発現をルシフェラーゼで可視化できるレポーター細胞を用いたリアルタイムイメージングにより解析した。転写因子 Hes1 が転写を制御する下流遺伝子を DNA アレイを用いて同定した。Hes1 の遺伝子座に蛍光タンパク質を導入し Hes1 タンパク質レベルを可視化した細胞を用いて Hes1 の発現量の高い細胞と低い細胞を分け、分化の性質を調べた。また、Hes1 ノックアウト細胞を作製して解析した。

## 4. 研究成果

Hes7 の不安定性に必須のリジン残基を複数個(K14, K22, K52, K55)同定することが出来た。K22, K52, K55 はリプレッサー活性を失っていることが分かった。全ての変異体で、細胞内での核局在のパターンやホモ二量体化に異常は見られなかったが、K22R, K55R 変異体ではターゲット DNA 配列への結合能力が低下し、K52R 変異体では、野生型に比べて他の Hes family 遺伝子との相互作用が強く、おそらく不活性なヘテロ二量体を作りやすいことが分かった。これらの発見は、Hes7 の 22 番目、52 番目、55 番目リジン残基は、

タンパク質分解だけではなく Hes7 の機能発現に必須であることを明らかにした。

次に、ES 細胞において Hes1 が、ES 細胞内で 3-5 時間の周期で発現振動 (オシレーション) することを見いだした。Hes1 の下流因子からその振動を制御する分子の同定を試みた結果、Hes1 の分解に関与すると思われるいくつかの因子を同定することが出来た。同時に、細胞周期の G2/M 期のインヒビターである Gadd45g や神経分化に必須とされる Notch シグナルのリガンドである Delta-like1(Dll1)が同定されたので、Hes1 の発現振動と分化との関連を調べた。まず、これらの下流因子の発現もダイナミックに変動していることが分かり、その発現変動が細胞の分化能力に影響すると予想された。そこで、Hes1 の発現レベルが高い細胞と低い細胞を分離した結果、Hes1 タンパク質の発現が高い細胞は初期中胚葉に、発現が低い細胞は神経に分化する傾向があった。この結果は、分化誘導時の Hes1 の発現レベルによって、その後の分化の方向性が決定されることを示す。さらに、Hes1 ノックアウト ES 細胞株を作成し、神経への分化誘導を行った結果、高い効率で均一に神経系に分化した。以上の発見により、Hes1 の短周期のオシレーションによって、様々な分化ポテンシャルをもつ ES 細胞が作られ、幹細胞の不均一な分化に寄与することを見いだした。遺伝子の発現振動は、同じ遺伝的背景を持つ ES 細胞が、多様な細胞分化を可能にする基本メカニズムの一つであると考えられた。



(図) ES 細胞における Hes1 の発現振動は分化シグナルに対して多様な応答を可能にする。分化誘導時に Hes1 タンパク質の発現が低いと神経系へ、高いと中胚葉に分化する。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 小林妙子、影山龍一郎、Hes1 regulates embryonic stem cell differentiation by suppressing Notch signaling., Genes Cells、査読有、2010、accepted
- ② 小林妙子、影山龍一郎、Hes1 oscillation: making variable choices for stem cell

differentiation.、Cell Cycle、査読有、9巻、2010、207-208

- ③ 小林妙子、水野浩彰、今吉格、古澤力、白髭克彦、影山龍一郎、The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells.、Genes and Development、査読有、23巻、2009、1870-1875
- ④ 小林妙子、影山龍一郎、Dynamic advances in NF-kappaB signaling analysis.、Science Signaling、査読有、2巻、2009、pe47
- ⑤ 影山龍一郎、大塚俊之、小林妙子、Roles of Hes genes in neural development.、Dev Growth Differ.、査読有、50巻、2008、S97-103
- ⑥ 石井章子、小林妙子、影山龍一郎、Requirement of multiple lysine residues for the transcriptional activity and the instability of Hes7.、Biochem Biophys Res Commun.、査読有、372巻、2008、142-146

[学会発表] (計 12 件)

- ① 理研シンポジウム「細胞システムの動態と論理 II」、2010年4月8-9日、独立行政法人理化学研究所・和光、発表者：小林妙子、振動遺伝子 Hes1 による ES 細胞の分化調節機構 (招待講演)
- ② CDB Symposium 2010, Frontiers in Organogenesis、2010年3月23-25日、理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター、発表者：小林妙子、The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells.
- ③ Keystone Symposia, Stem Cell Differentiation and Dedifferentiation、2010年2月15-20日、Keystone Resort, Colorado, USA、発表者：小林妙子、The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells.
- ④ 第2回 定量生物の会、2010年1月10-11日、大阪大学、発表者：小林妙子、振動遺伝子 Hes1 が胚性幹細胞の多様な分化応答に寄与する
- ⑤ 第82回 日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸ポートアイランド、発表者：小林妙子、The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells.
- ⑥ 第82回 日本生化学会大会、2009年10月21-24日、神戸ポートアイランド、発表者：Tan, S.L.、小林妙子、MicroRNA-9 regulates the timing of neural stem cell differentiation by fine-tuning Hes1 expression in the developing cortex.
- ⑦ 神戸薬科大学 研究セミナー、2009年10月15日、神戸薬科大学、発表者：小林妙子、転写因子 Hes1 の発現振動が胚性幹細胞の多様な分化応答に寄与する (招待講

演)

- ⑧ 大学院教育コース 再生医療・臓器再建コースミーティング、2009年10月9日、京都大学、発表者：小林妙子、The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells (招待講演)
- ⑨ The international symposium on complex systems biology、2009年9月29日-10月1日、東京大学、発表者：小林妙子、The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells.
- ⑩ 大学院教育コース 発生・細胞生物学コースミーティング、2009年7月24日、京都大学、発表者：小林妙子、The cyclic gene Hes1 contributes to diverse differentiation responses of embryonic stem cells (招待講演)
- ⑪ 第1回 定量生物の会、2009年1月11日、東京大学、発表者：小林妙子、マウス胚性幹 (ES) 細胞における Hes1 の発現振動
- ⑫ 大学院教育コース [発生・形態形成学・生殖医学] ミーティング、2008年7月2日、京都大学、発表者：小林妙子、Hes1 oscillations contribute to diverse differentiation response of embryonic stem cells (招待講演)

[図書] (計 1 件)

- ① 影山龍一郎、小林妙子、他、共立出版、神経の分化、回路形成、機能発現、2008、318-323

[産業財産権]

□出願状況 (計 1 件)

名称：多能性幹細胞からの神経細胞の分化誘導方法

発明者：小林妙子、影山龍一郎

権利者：京都大学

種類：特願

番号：2009-168045

出願年月日：2009年7月16日

国内外の別：国内

□取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

[その他]

・研究室ホームページ

<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/Lab/Kageyama/index.html>

・報道関連

①新聞報道

朝日新聞(2009年8月15日夕刊8面)、  
京都新聞(2009年8月15日夕刊8面)、  
日本経済新聞(2009年8月16日34面)、  
毎日新聞(2009年8月15日夕刊7面)、  
読売新聞(2009年8月15日夕刊2面)に  
報道。

②インターネット報道

Yahoo ニュース、京都大学ホームペー  
ジの研究成果欄(1)、ウイルス研究所ホーム  
ページトップの「最新の研究成果」欄(2)  
に掲載。

(1)[http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news\\_data/  
h/h1/news6/2009/090815\\_1.htm](http://www.kyoto-u.ac.jp/ja/news_data/h/h1/news6/2009/090815_1.htm)

(2)<http://www.virus.kyoto-u.ac.jp/>

③テレビ報道

NHK 教育「サイエンスゼロ」(2010年4  
月3日)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 妙子 (KOBAYASHI TAEKO)  
京都大学・ウイルス研究所・助教  
研究者番号：40402804

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし