

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370104

研究課題名（和文） Znフィンガータンパクによる外胚葉分化決定の分子機序

研究課題名（英文） **Molecular Mechanism of neuroectodermal determination by zinc-finger proteins**

研究代表者

笹井 芳樹 (SASAI YOSHIKI)

独立行政法人理化学研究所・器官発生研究グループ・グループディレクター

研究者番号：20283616

研究成果の概要（和文）：

本研究では、哺乳類初期胚における神経外胚葉への分化の制御機序を明らかにするため、多能性幹細胞の試験管内分化系を用いて、この過程を制御する2つのZnフィンガータンパクの機能を解析した。まず、XFDL156のマウスのホモログであるmZfp12を単離し、mZfp12の強制発現が、ES細胞からの中胚葉分化を抑制し、神経分化を促進することを明らかにした。さらに、新規のスクリーニングでZfp521を単離し、これが未分化外胚葉から神経前駆細胞への分化に必須の遺伝子であることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

In this study, to understand the molecular mechanism underlying the neuroectodermal differentiation during early mammalian development, we analyzed the roles of two zinc-finger proteins that are involved in this process using in vitro differentiation system of pluripotent stem cells. We isolated mZfp12, a mammalian homolog of XFDL156, and showed that its overexpression in differentiating ES cells promotes neural differentiation and inhibits mesodermal differentiation. In addition, we isolated another zinc-finger protein Zfp521, and demonstrated its essential role in neuroectodermal differentiation from immature ectoderm.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2010年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：神経発生、細胞分化、転写因子、外胚葉、中胚葉、ES細胞、Znフィンガー因子、多能性幹細胞

1. 研究開始当初の背景

初期胚における中枢神経系発生の最も初発段階が如何に制御されているかについては、未だに不明な点の多い。特に、1) 多能性細胞から未分化外胚葉への分化決定と、2) 未分化外胚葉からの神経外胚葉（神経前駆細胞）への分化決定についての分子制御機序は、その制御遺伝子が知られていなかった。研究代表者は、これまでの研究成果より、アフリカツメガエルの初期胚において、XFDL156 という Znフィンガー型核内タンパクが外胚葉分化決定因子として機能していることを発見していた。しかし、哺乳類胚の中枢神経系発生の初期段階でも Znフィンガー型核内タンパクが働いているかは、不明であり、今回、その研究を進めた。

2. 研究の目的

脊椎動物の初期発生では、受精卵が分裂し一定の細胞数達した時に、未分化な多能性体細胞から3つの胚葉、即ち外胚葉、中胚葉、内胚葉が分化する。これらの胚葉への分化決定により、未分化な体細胞は多能性を失い、強い細胞系譜の制限を受けることになる。それらのうち、外胚葉からは中枢神経組織、神経堤由来組織（含む末梢神経系）、表皮、感覚上皮などが発生する。すなわち、脳を含めた中枢神経発生系組織の初発制御は、1) 多能性細胞（マウスの内部細胞塊、カエルのアニマルキャップ細胞など）からの未分化外胚葉への分化、2) 未分化外胚葉からの神経前駆細胞への分化の2段階になっている。

本研究では、マウス ES 細胞の分化系（浮遊凝集塊培養である SFEBq 法）を用いて、1) 2) のステップの制御を行なう分子機序を Znフィンガー型核内タンパクの働きの観点から明らかにしようとした。

3. 研究の方法

まず、アフリカツメガエル系で、外胚葉決定に必要な十分な役割を持つ Znフィンガー型核内タンパク XFDL156 のマウスホモログ mZfp12 を単離し、その発現制御や ES 細胞分化系への関与を遺伝子導入によって検討した。

さらに、未分化外胚葉からの神経前駆細胞への分化を制御する因子を探索するために、ゲノムワイドの GeneChip スクリーニングを行い、Zfp521 がこの段階で強く誘導されるだけでなく、経前駆細胞への分化を駆動する転写活性化因子として必須の役割を果たすことを明らかにした。

4. 研究成果

1) マウスの XFDL156 相同遺伝子である mZfp12 を単離し、マウス ES 細胞の分化系において、未分化外胚葉の分化に伴って転写活性化がされることを明らかにした。また、mZfp12 の強制発現が ES 細胞の中胚葉分化を抑制すること、即ち Activin や血清処理条件下に mZFP12 の強制発現が初期中胚葉マーカー発現を抑制し、逆に神経分化マーカーを誘導することを明らかにした。しかし、BMP 4 による神経分化抑制は mZFP12 の強制発現では拮抗されなかった。このことは、mZFP12 より後期に発現する別の神経特異的な転写因子が神経分化に必要であることを示唆した。

2) 未分化外胚葉から神経前駆細胞への分化を促進する因子を同定するために、ES 細胞を SFEBq 法によって選択的に神経分化させる際に、神経前駆細胞が分化する寸前から発現誘導がかかる転写因子を GeneChip によって網羅的にスクリーニングした。それらのうち、ES 細胞へ導入して、神経分化誘導を促進するものを機能的スクリーニングで同定したところ、Znフィンガー型転写因子である Zfp521 が同定された。この Znフィンガータンパクは核内因子で、ES 細胞分化系のみならず、in vivo のマウス初期胚でも神経前駆細胞に特異的な発現を示した。Zfp521 の強制発現は ES 細胞の培養系で神経分化を強く促進し、さらに通常は神経分化が強く抑制される BMP4 存在下でも神経分化を惹起することが明らかとなった。逆に、BMP4 存在下では、Zfp521 の内因性の発現は強く抑制されていた。さらに shRNA 法により、その機能を阻害すると、ES 細胞からの神経分化が強くされたが、内胚葉や中胚葉などの他の細胞種への分化は正常に起こることがわかった。これらにより、Zfp521 が未分化外胚葉から神経前駆細胞への分化を推進するのに必須の制御因子であることが明らかとなった。このように、これまで不明であった未分化外胚葉から神経前駆細胞への分化を制御するスイッチ遺伝子の1つが初めて同定された（上谷ら、Nature 2011）。

3) Zfp521 は神経特異的な Sox3 プロモーターを直接的に活性化することがわかり、Sox3 は下流遺伝子の一つであることが示唆された。ChIP 解析により、Sox3 以外にも Pax6 などの初期神経遺伝子をも直接活性化することも明らかになった。Zfp521 による発現誘導には p300/CBP 活性が必要であり、実際に p300/CBP と結合することも判明した。これらにより、Zfp521 は未分化外胚葉から神経前駆細胞へ分化する

際に働く転写活性因子であり、神経外胚葉への初発分化段階の制御を p300 などとともにこなう役割を持つことが明らかになった (上谷ら、Nature 2011)。

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 9 件)

- ① Eiraku, M. and Sasai, Y., Mouse ES cell culture for generation of three-dimensional retinal and cortical tissues.、Nature Protocols、7、69-79、2012、査読有
- ② Eiraku, M., Takata, N., Ishibashi, H., Kawada, M., Sakakura, E., Okuda, S., Sekiguchi, K., Adachi, T. and Sasai, Y., Self-organizing optic-cup morphogenesis in three-dimensional culture.、Nature、472、51-56、2011、査読有
- ③ Ohgushi, M. and Sasai, Y.、Lonely death dance of human pluripotent stem cells: ROCKing between metastable cell states. Trends in Cell Biology、21、274-282、2011、査読有
- ④ Kamiya, D., Banno, S., Sasai, N., Ohgushi, M., Watanabe, K., Kawada, M., Yakura, R., Jakt, L.M., Nishikawa, S. and Sasai, Y., Intrinsic transition of ES cell differentiation into neural progenitors.、Nature、470、503-509、2011、査読有
- ⑤ Aramaki, T., Sasai, N., Yakura, R. and Sasai, Y., Jiraiya Attenuates BMP Signaling by Interfering with Type-II BMP Receptors in Neuroectodermal Patterning.、Developmental Cell、19、547-561、2010、査読有
- ⑥ Takai, A., Inomata, H., Arakawa, A., Matsuo-Takasaki, M. and Sasai, Y., Anterior neural development requires Dell, a matrix-associated protein that attenuates canonical Wnt signaling via the Ror2 pathway、

Development、137、3293-3302、2010、査読有

- ⑦ Eri Mizuhara, Yasuko Minaki, Tomoya Nakatani, Minoru Kumai, Takeshi Inoue, Keiko Muguruma, Yoshiki Sasai, and Yuichi Ono.、Purkinje cells originate from cerebellar ventricular zone progenitors positive for Neph3 and E-cadherin.、Developmental Biology、338、202-214、2010、査読有
- ⑧ Nagase T, Ueno M, Matsumura M, Muguruma K, Ohgushi M, Kondo N, Kanematsu D, Kanemura Y, Sasai Y.、Pericellular matrix of decidual-derived mesenchymal cells: a potent human-derived substrate for the maintenance culture of human ES cells.、Developmental Dynamics、238、1118-1130、2009、査読有
- ⑨ Osakada, F., Jin, ZB., Hiram, Y., Ikeda, H., Danjyo, T., Watanabe, K., Sasai, Y., Takahashi, M.、In vitro differentiation of retinal cells from human pluripotent stem cells by small-molecule induction. Journal of Cell Science、122、3169-79、2009、査読有

[学会発表] (計 3 件)

- ① 笹井芳樹、Self-organization of neural structures in 3D ES cell culture、The Cambridge Neural Stem Cell Symposium、2011、2011年9月5日、ケンブリッジ
- ② 笹井芳樹、Induction and self-organization in neural development、SFB488 Symposium、2011年2月24日、ハイデルベルク
- ③ 笹井芳樹、Molecular and cellular control of neuroectodermal development、UCSF international symposium of neural stem cells、2009年10月1日、サンフランシスコ

[その他]

ホームページ等

<http://www.cdb.riken.jp/sasai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 芳樹 (SASAI YOSHIKI)

独立行政法人理化学研究所・器官発生研究グループ・グループディレクター

研究者番号：20283616

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし