

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460364

研究課題名(和文) マウスES細胞の未分化状態維持に関与する新規遺伝子の機能解析

研究課題名(英文) Analysis of a novel gene that affects the pluripotency of embryonic stem cells

研究代表者

宮崎 純一 (Miyazaki, Jun-ichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：10200156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：Ces1ノックアウトES細胞を用いてCes1遺伝子の未分化性維持に係わる機構を解析した。ノックアウト細胞はキメラ形成能を維持していたが、テラトーマ形成能を喪失していた。ノックアウト細胞から胚様体を形成しin vitro分化能を検討したところ、野生型ES細胞と違いは見られなかった。Zinc finger蛋白であるCES1は転写因子として機能していると考えられ、ChIP sequence法により解析した結果、特に遺伝子の転写開始点近傍に多くの結合が確認された。Ces1蛋白により発現抑制される遺伝子の転写開始点近傍に結合が多く見出され、CES1はrepressorとして機能していると推定された。

研究成果の概要(英文)：The Ces1 gene encodes a Zinc finger-type transcription factor. Its expression is high in mouse embryonic stem (ES) cells, but rapidly decreases following differentiation. To assess its roles in ES cells, we generated Ces1-deficient and -overexpressing ES cell lines. We found that Ces1-deficient ES cells grow as flat colonies, which are clearly distinct from rounded colonies commonly formed by undifferentiated ES cells. The differentiation potency of Ces1-deficient ES cells was not considerably different from wild-type ES cells in vitro and in vivo. DNA microarray analysis revealed that the Ces1 knockout downregulated a distinct group of genes, including Dppa3. To identify the CES1-binding loci in the genome, chromatin immunoprecipitation sequencing was performed. The result showed that CES1 binding was often seen in the genes activated by Ces1 deficiency, suggesting the repressive role of Ces1.

研究分野：再生医学、糖尿病学

キーワード：ES細胞 未分化状態 エピジェネティック制御 転写制御 クロマチン免疫沈降 テラトーマ

1. 研究開始当初の背景

(1) 様々な細胞に分化する多分化能を有する胚性幹 (ES) 細胞は、マウスやヒトなどの胚盤胞より単離され、未分化状態のまま分裂増殖する自己複製能を保持している。その多分化能を利用し、特定の系列の細胞へと分化誘導し再生医療への利用を目指す研究や、リプログラミングとの関連を含め細胞の未分化状態の解明を目指す研究において広く使用されている。申請者の研究室においては独自の解析プログラムを開発し、ES 細胞に特異的に発現するが体細胞ではほとんど発現が認められない遺伝子の *in silico* スクリーニングを行い、それらの解析を行ってきた。このうち 3 つの遺伝子 *Cue318/Sohlh2*、*Cue110/Gtsf1*、*Ces5/Ooep* については、生殖細胞系列でも発現が認められ、それらのノックアウトマウスは不妊を示し、その解析結果は既に報告してきた (Toyoda et al, *Dev Biol* 325:238-248, 2009; Yoshimura et al, *Dev Biol* 335:216-227, 2009; Tashiro et al, *Genes Cells* 15:813-828, 2010)。これらの遺伝子は生殖細胞系列の発生・分化において重要な役割を持つことが明らかとなり、現在他の因子との関係などさらに詳細な解析を行っている。

(2) 同様な方法で同定された遺伝子の 1 つに *Ces1* がある。この遺伝子は未分化なマウス ES 細胞で特異的に発現し、ES 細胞を分化させることにより急速に発現が失われる。この遺伝子は生殖細胞系列でも発現することから、細胞の未分化状態制御との関連が示唆される。*Ces1* 遺伝子にコードされるアミノ酸配列には Zinc finger motif が存在し、転写因子として働くと考えられる。これまでの研究で、gene targeting 法により *Ces1* ノックアウト ES 細胞 (*Ces1^{-/-}*) を作製している。興味深いことに、ノックアウト ES 細胞は親株の ES 細胞とは異なり扁平なコロニー形態を示し、alkaline phosphatase 染色で弱い染色を示した。このノックアウト細胞に *Ces1* を導入し強制発現した rescue 細胞を解析した結果、親株と同様な凝集したコロニー (いわゆる stem cell colony) を形成し、alkaline phosphatase 染色で強く染色された。ノックアウト細胞のコロニー形態から、epiblast stem (EpiS) cells に似た性質を持つ可能性が考えられ、EpiS cells で発現が低下する *Dppa3/Stella* 遺伝子の発現を調べたところ、発現がほとんど消失していた。興味深いことに、*Ces1*-rescue 細胞においては *Dppa3/Stella* 遺伝子の発現が回復していた。初期胚から作成される幹細胞 (stem cell) としては、ES (embryonic stem) 細胞の他にも、TS (trophoblast stem), XEN (extraembryonic stem), EpiS 細胞などが知られている。特に EpiS 細胞は、blastocyst より分化の進んだ胚の epiblast から作成される。epiblast が胎仔を形成することから、

EpiS 細胞は全能性を維持していると考えられるが、その維持・培養のために LIF (leukemia inhibitory factor) ではなく、bFGF (basic fibroblast growth factor) を必要とすることや、遺伝子発現パターンにおいて ES 細胞と違いがある。以上の結果から、*Ces1* は ES 細胞の未分化性状態維持に特別な役割を有すると推定された。この遺伝子機能を明らかにすることにより、生命科学の重要な課題の 1 つとなっている細胞の未分化状態維持機構の解明に有用な情報をもたらすと期待される。特に、再生医療への応用が期待されるヒト iPS 細胞や ES 細胞は、マウスの iPS 細胞や ES 細胞とは未分化状態が異なり、より発生が進んだ胚である epiblast の性質を有していると考えられている。この違いを分子レベルで解明することに関しても、本研究の知見は重要と考えられる。本研究に基づき、ヒト iPS 細胞における *Ces1* 遺伝子の機能についても検討を進める予定である。

2. 研究の目的

これまでの検討により、*Ces1* が ES 細胞の未分化性状態維持に重要な役割を持つと考えられた。本研究は、*Ces1* 遺伝子の機能を明らかにすることで ES 細胞・多能性幹細胞の未分化状態の維持機構の解明につながる知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

ES 細胞の未分化状態維持における *Ces1* 遺伝子の機能を明らかにするために、マウス ES 細胞について以下の方法により解析を行う。

(1) CES1 に対する特異的抗体をウサギで作製し、細胞内での局在を免疫染色法により確認する。対象として ES 細胞のみならず、生体の精巣・卵巣においても検討する。さらに、初期胚における *Ces1* 遺伝子の発現を調べる。

(2) *Ces1* 遺伝子欠損 ES 細胞の分化能を *in vitro*, *in vivo* で検討する。特に、*in vivo* では、テラトーマの形成能、キメラマウス形成能を中心に検討する。

(3) 転写因子として他の遺伝子発現への影響を検討するため、*Ces1* 遺伝子の欠損による ES 細胞の遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析する。さらに、大きく発現の変化した遺伝子については real-time PCR 法を用いて、それぞれの遺伝子の発現レベルの詳細な比較を行い、*Ces1* の未分化状態制御における役割を解析する。特に ES 細胞の未分化性維持に関与する遺伝子の発現に着目して解析する。さらに標的候補遺伝子の制御領域への CES1 蛋白の結合に関して ChiP assay により解析する。

(4) *Ces1* 遺伝子欠損 ES 細胞で発現が抑制される *Dppa3/Stella* 遺伝子の発現制御領域について、CG のメチル化を bisulfite sequencing により検討する。

(5) 転写因子として CES1 が染色体上に結合する部位を明らかにするために、Ty1-Tag を結合した CES1 を *Ces1* ノックアウト ES 細胞 (*Ces1*^{-/-}) に発現させ、Ty1 に対する抗体を用いて、ChIP-sequence を行い、解析する。

4. 研究成果

本研究では、*Ces1* ノックアウト ES 細胞を用いて *Ces1* 遺伝子の未分化性維持に係わる機構を詳細に解析した。

(1) キメラ形成能の検討。

EpiS 細胞はテラトーマ形成能を有するが、キメラ形成はないとされている。CAG-EGFP 遺伝子を導入した *Ces1* ノックアウト ES 細胞を胚盤胞に注入し、キメラ胚の作製を行った。発生途中で胚を取り出し、ラベルされた細胞の分布を詳細に解析したところ、胎仔全体にラベルが見られた。さらに、キメラマウスが誕生することと生殖系列への伝達を確認した。これにより、ノックアウト ES 細胞は *in vivo* において全能性を維持していることが確認された。一方、*Ces1* ノックアウト ES 細胞をヌードマウスに移植したところ、テラトーマの形成はほぼ認められなかった。*Ces1* 遺伝子を *Ces1* ノックアウト ES 細胞に導入した rescue 細胞では、テラトーマ形成能が回復していた。このように、*Ces1* ノックアウト ES 細胞はキメラ形成能を維持しているにもかかわらず、テラトーマ形成能を喪失しており、特異な未分化状態にあると考えられた。

(2) *in vitro* における分化能

Ces1 ノックアウト ES 細胞から胚様体を形成して *in vitro* における分化能を検討したところ、主要な分化マーカーを real-time PCR で見る限り、wild-type ES 細胞と大きな違いは見られなかった。

(3) *Ces1* ノックアウト ES 細胞の増殖能の検討。

MTT アッセイにより、野生型 ES 細胞、ノックアウト ES 細胞、rescue ES 細胞の間で、増殖能を検討したところ、ノックアウト ES 細胞の増殖能が高く、apoptosis も低いことが示された。

(4) *Dppa3/Stella* 遺伝子の発現制御領域における CG のメチル化の解析。

EpiS cells での *Dppa3/Stella* 遺伝子の発現低下は、その発現制御領域の CG のメチル化を伴うとされる。*Dppa3/Stella* 遺伝子の発現制御領域について、CG のメチル化をノックアウト ES 細胞、野生型 ES 細胞、rescue ES 細胞の間で bisulfite sequencing により検討

した。その結果、*Ces1* ノックアウト ES 細胞では、*Dppa3/Stella* 遺伝子の発現制御領域が高度にメチル化されており、rescue ES 細胞ではメチル化が除去されていることが明らかとなった。

(5) ChIP sequence による CES1 結合領域の同定。

Zinc finger motif を有する蛋白質である CES1 は転写因子として機能していると考えられる。実際に遺伝子の調節領域に直接結合し、発現制御しているかを ChIP sequence 法により解析した。その結果、染色体上の約 4000 か所への結合が見出され、特に遺伝子の転写開始点近傍に多くの結合が確認された。*Ces1* 発現により発現が抑制される遺伝子の転写開始点近傍に結合が見出されるが、*Ces1* 発現により発現が活性化される遺伝子の転写開始点近傍にはほとんど結合が見出されなかったことから、CES1 は repressor として機能していると推定された。

以上の検討を元に、CES1 がターゲット遺伝子に対し repressor として機能している可能性を追求している。これまでの解析から、ヒストン H3 のメチル化等を介して制御している可能性が推定されている。今後、この機構をさらに詳しく解明することにより、ES 細胞の未分化状態維持機構の 1 つの経路を明らかにできるものと期待される。

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4件)

Takemoto N, Yoshimura T, Miyazaki S, Tashiro F, Miyazaki J: *Gtsf11* and *Gtsf2* are specifically expressed in gonocytes and spermatids but are not essential for spermatogenesis. PLoS One 11(3):e0150390, 2016. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0150390.

Toyoda S, Yoshimura T, Mizuta J, Miyazaki J: Auto-regulation of the *Sohlh1* gene by the SOHLH2/SOHLH1/SP1 complex: Implications for early spermatogenesis and oogenesis. PLoS One 9(7):e101681, 2014. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0101681.

Miyazaki T, Miyazaki S, Ashida M, Tanaka T, Tashiro F, Miyazaki J: Functional analysis of *Tc11* using *Tc11*-deficient mouse embryonic stem cells. PLoS One 8(8):e71645, 2013. 査読有
doi: 10.1371/journal.pone.0071645.

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. 査読有
doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.106.

〔学会発表〕(計3件)

松浦 巧、宮崎竜志、宮崎早月、田代 文、宮崎純一: Znフィンガータンパク質 Ces1 は、Suv39h に結合してヒストン H3K9 メチル化を抑制し、胎仔成長や生殖細胞の分化を制御する。日本分子生物学会、2015年12月1日~4日、神戸。

松浦 巧、宮崎竜志、宮崎早月、田代 文、宮崎純一: Ces1 遺伝子欠損マウス胎仔におけるヒストン H3K9 及び DNA メチル化レベルの亢進と胎性致死・成長遅延および始原生殖細胞の分化異常。日本分子生物学会、2014年11月25日~27日、横浜。

松浦 巧、宮崎竜志、宮崎早月、田代 文、宮崎純一: Ces1 遺伝子欠損マウスにみられる始原生殖細胞の生存・増殖・分化の異常。日本分子生物学会、2013年12月3日~6日、神戸。

〔図書〕(計1件)

宮崎早月、宮崎純一: 南山堂「プログレッション生命科学(第10章 再生)2014、312

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/nutri/ww/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 純一 (MIYAZAKI, Jun-ichi)
大阪大学大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 10200156

(2) 研究協力者

宮崎 早月 (MIYAZAKI, Satsuki)

田代 文 (TASHIRO, Fumi)