

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 25 年 06 月 03 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究（C）（一般）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590272

研究課題名（和文）マウス ES 細胞の分化に必須であるメチル化 DNA 結合タンパク質 CIBZ の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of CIBZ, a methyl-CpG binding protein which is essential for the ES cell differentiation

研究代表者

松田 永照 (MATSUDA EISHOU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：00335481

研究成果の概要（和文）：G1/S 期の移行は胚性幹（ES）細胞の増殖に重要であることが知られているが、そのメカニズムはよく分かっていない。我々は、新規同定した転写因子 CIBZ が ES 細胞の増殖と G1 期から S 期へ移行を調節することを確認した。詳細な解析を行った結果、CIBZ が ES 細胞の増殖と G1/S 期の移行を制御するメカニズムは Nanog タンパク質の発現に依存することを判明した。

研究成果の概要（英文）：G1/S transition is important for embryonic stem cell (ESC) proliferation; however, the transcriptional factor that regulates this remains largely unknown. We present data showing that CIBZ, a transcription factor, regulates ESC proliferation and G1/S transition. Our results indicate that CIBZ-associated ESC proliferation and G1/S transition is dependent on Nanog expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：ES 細胞、細胞増殖、細胞分化、細胞周期、DNA メチル化、筋芽細胞分化

1. 研究開始当初の背景

(1) ES 細胞の分化や細胞増殖の制御機構を解明することが再生治療への理解や応用に重要である。申請者らは、新規メチル化 DNA 結合タンパク質をコードする CIBZ 遺伝子を欠損した胚性幹細胞株を作製した。興味深いことに、CIBZ を欠損した ES 細胞は野生型の ES 細胞と培養した場合、細胞数の減少が観察された。

(2) 筋芽細胞を DNA 脱メチル化剤で処理すると、骨格筋への分化促進と筋分化決定遺伝子である myogenin の発現上昇が報告された。つまり、DNA メチル化は myogenin の発現を制御することで筋芽細胞の骨格筋への分化に関与することが考えられる。しかし、DNA メチル化 myogenin の発現をどう制御するかがほとんど解明されていない。筋芽細胞を用いて CIBZ をノックダウンさせた場合、こ

の細胞の骨格筋への分化が顕著に誘導されていることが観察された。

2. 研究の目的

- (1) CIBZ が ES 細胞の増殖に関わる分子メカニズムを明らかにする。
- (2) 筋芽細胞の骨格筋への分化において、CIBZ の役割分担とメカニズムの解析も明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) CIBZ をノックダウン及びノックアウトした ES 細胞の作製と CIBZ を安定的に発現した ES 細胞の作製。Nanog を安定的に発現した ES 細胞の作製。BrdU を用いた細胞増殖の定量化、フローサイトメトリーによる細胞周期の解析。
- (2) 低血清による筋芽細胞の分化誘導、レポーターアッセイによる転写活性の定量、ゲルシフトアッセイによる DNA-タンパク質間の相互作用、バイサルファイトシーケンス法による DNA メチル化の解析。

4. 研究成果

- (1) 我々は同定した CIBZ が ES 細胞の未分化性に影響を与えるかどうかを調べた。その結果、野生型の ES 細胞と比較した場合、CIBZ の発現変化（欠損と過剰発現）が ES 細胞の未分化状態の維持に必須でないことを、ES 細胞の形態観察及び未分化状態の維持に必須である Oct3/4 と Sox2 の発現に変化が見られないことで確認した（図 1）。

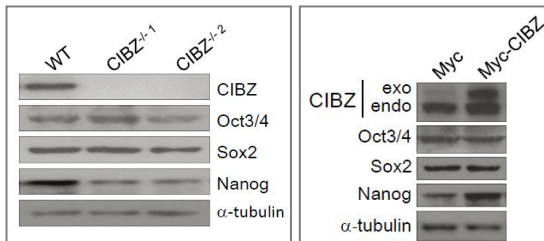


図 1 CIBZ が欠損した ES 細胞（左）と CIBZ を過剰発現した ES 細胞（右）の未分化マーカーのタンパク質の発現（WT：野生型、CIBZ^{+/-} と CIBZ⁺²：CIBZ が欠損した二種類の ES 細胞株、Myc-CIBZ: Myc タグを付加した CIBZ）

- (2) CIBZ が欠損した ES 細胞は未分化状態を維持しているが、細胞数の減少が観察された。CIBZ の欠損は ES 細胞の細胞死を誘導しないことが確認された（図 2）から、細胞数の減少は ES 細胞増殖の遅延であることが示唆された。野生型 ES 細胞と比較して、CIBZ が欠損した ES 細胞は BrdU の陽性細胞数の顕著な減少が観察された（図 2）。以上の結果より、CIBZ の欠損による細胞数の減少は細胞増殖の抑制に起因すると考えられる。

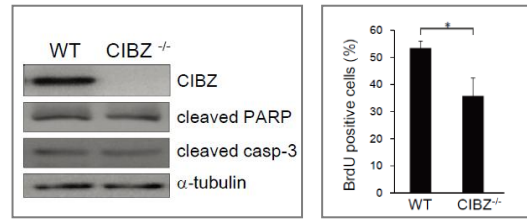


図 2 CIBZ の欠損による ES 細胞の細胞死マーカータンパク質（cleaved PARP と cleaved casp-3）の発現（左）と BrdU の陽性細胞数の割合（右、*：統計的有意差があり）

- (3) ES 細胞の増殖は、様々なシグナル経路と関連する転写因子により厳密に制御され、その中核を成すのが細胞周期制御（特に G1/S 期）である。CIBZ による細胞周期に及ぼす影響をフローサイトメーターで検証した。その結果、野生型の ES 細胞と比較して、CIBZ が欠損した ES 細胞は G1 期に占める細胞数の割合が増加し、S 期に占める細胞数の割合が減少していた。その一方で、ES 細胞に CIBZ を過剰発現させた場合、ES 細胞の増殖が亢進し、G1 期から S 期へ移行の細胞数の割合が増加していることが分かった（図 3）。

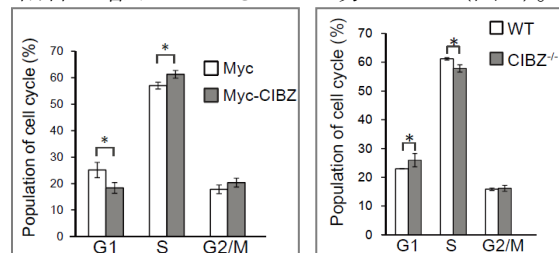


図 3 CIBZ が欠損した ES 細胞（左）と CIBZ を過剰発現した ES 細胞（右）の細胞周期の変化（*：統計的有意差があり）

- (4) ES 細胞の G1 期から S 期への移行の制御に CyclinE と Cdk2 が重要であることが報告されている。野生型の ES 細胞と比較して、CIBZ が欠損した ES 細胞において、CyclinE と Cdk2 タンパク質の発現が減少していることが分かった（図 4）。その一方で、ES 細胞に CIBZ を過剰発現させた場合、この 2 つタンパク質の発現が増加していることが確認された（図 4）。

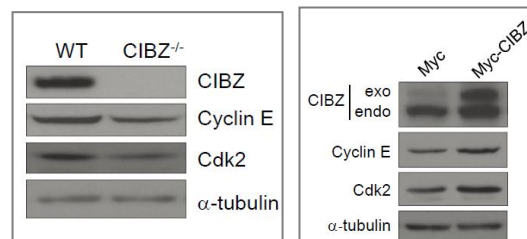


図 4 CIBZ が欠損した ES 細胞（左）と CIBZ を過剰発現した ES 細胞（右）において、CyclinE と Cdk2 タンパク質の発現変化

(5) Nanog は G1 期から S 期への移行を制御することで細胞増殖を促進することが報告されている。ES 細胞において、CIBZ の発現変化 (欠損と過剰発現) は Nanog のタンパク質の発現を ‘正’ に制御することが分かった (図 1)。さらに、CIBZ の欠損による ES 細胞増殖の遅延が Nanog の過剰発現によって救済されたことから、CIBZ が Nanog タンパク質を介して ES 細胞の増殖を制御することが考えられる (図 5)。

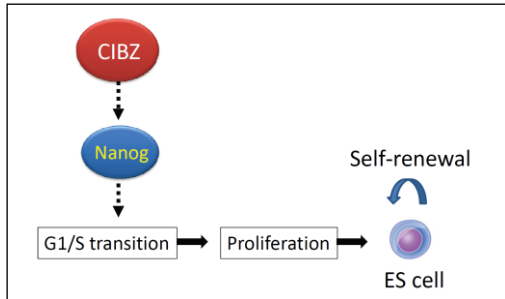


図 5 CIBZ が ES 細胞の増殖を制御する機構

(6) CIBZ が筋芽細胞から骨格筋への分化に関与するかを検証した。筋芽細胞株である C2C12 細胞を低血清で筋分化を誘導した場合、筋分化の決定因子である myogenin の発現が経時的に上昇するとは逆に、CIBZ タンパク質の発現が経時的に低下していることが分かった (図 6)。

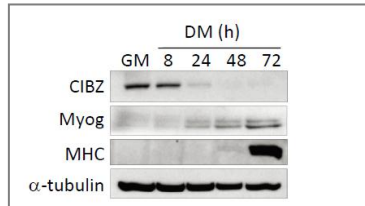


図 6 C2C12 細胞を低血清 (DM) で誘導した場合、筋分化マーカータンパク質 (Mog: 早期マーカー、MHC: 晩期マーカー) と CIBZ タンパク質の発現変化 (Mog: myogenin の略語)

(7) C2C12 細胞において、siRNA で CIBZ を特異的にノックダウンした結果、Myog の発現が上昇して筋分化への促進が確認された (図 7)。

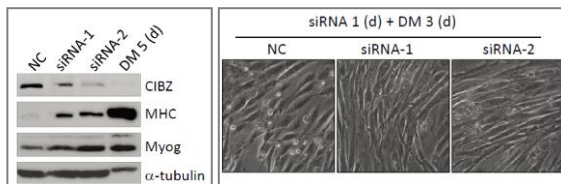


図 7 C2C12 細胞において、2 つの siRNA (siRNA-1 と siRNA-2) による CIBZ をノックダウンした時の Myog と MHC タンパク質の発現変化 (左)。CIBZ のノックダウンによる筋分化への促進現象の顕微鏡写真 (右)

(8) 詳細に解析した結果、メチル化 DNA 結合タ

ンパク質群の中で初めて、CIBZ は筋芽細胞において、myogenin の転写をメチル化依存的に抑制することで筋分化を制御することが明らかにされた (図 8)。

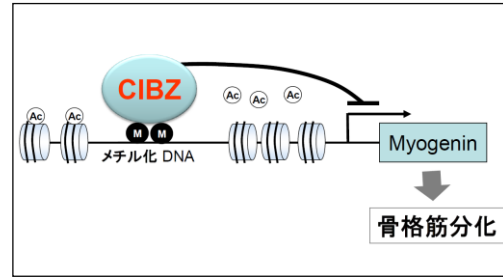


図 8 CIBZ が筋芽細胞の骨格筋への分化を制御する分子メカニズム

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 2 件)

① Tomonori Nishii, Yu Oikawa, Yasumasa Ishida, Masashi Kawaichi and Eishou Matsuda, CtBP-interacting BTB zinc finger protein (CIBZ) promotes proliferation and G1/S transition in embryonic stem cells via Nanog, *The Journal of Biological Chemistry*, 査読あり、287 巻、2012、12417-12424
DOI: 10.1074/jbc.M111.333856

② Yu Oikawa, Reiko Omori, Tomonori Nishii, Yasumasa Ishida, Masashi Kawaichi and Eishou Matsuda, The methyl-CpG-binding protein CIBZ suppresses myogenic differentiation by directly inhibiting myogenin expression, *Cell Research*, 査読あり、21 巻、2011、1578-1590
DOI: 10.1038/cr.2011.90

[学会発表] (計 1 件)

松田永照, DNA methylation and myoblast differentiation: role of a new methyl-binding protein, BIT's 1st Annual World Congress of Molecular & Cell Biology, 平成 23 年 08 月 07 日、中国北京市北京国際会議中心

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田永照 (MATSUDA EISHOU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイ
エンス研究科・助教

研究者番号：00335481