

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：14603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25460368

研究課題名(和文)メチル化DNA結合タンパク質CIBZが心筋分化を制御するメカニズムの解析

研究課題名(英文)Functional analysis of a methyl-CpG binding protein CIBZ in the regulation of cardiogenesis

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：転写因子TとMesp1はES細胞から中胚葉、中胚葉から心血管系譜細胞へのそれぞれの分化決定をつかさどるマスター遺伝子である。TとMesp1は転写因子として下流の遺伝子群を制御するカスケードが解明される一方で、ES細胞における転写制御機構が明らかにされていない。我々は、BTBジンクフィンガー型転写因子であるCIBZは、TとMesp1の転写を直接に抑制することでES細胞の中胚葉と心筋細胞への分化のを「負」に制御することを明らかにした。CIBZはTとMesp1の転写を制御する新たな転写因子として、ES細胞の中胚葉と心筋細胞への分化の運命決定に重要な役割を果たすことを示した。

研究成果の概要(英文)：The transcription factors T and Mesp1 play key roles in guiding embryonic stem cells (ESCs) toward mesodermal and cardiac lineages, respectively. Although a growing body of evidence indicates that T and Mesp1 regulate downstream target genes, the molecular mechanisms behind maintenance of their silencing state in the undifferentiated ESCs remain poorly understood. Here we show that CIBZ, a BTB domain zinc finger transcriptional factor, is a novel negative regulator of mesodermal and cardiac differentiation of ESCs. We also show the direct inhibitory binding of CIBZ to T and Mesp1 promoters. These data provide new insights into the role of CIBZ in the regulation of cardiac specification of ESCs and show that CIBZ is critical for maintaining the silenced state of T and Mesp1 in ESCs.

研究分野：分子生物学

キーワード：ES細胞 細胞分化 心筋細胞 CIBZ (ZBTB38) Brachyury (T) Mesp1 転写抑制 中胚葉

1. 研究開始当初の背景

(1) ES 細胞を用いた分化誘導の研究は、哺乳類の胚発生や分化に関わる遺伝子発現制御機構の解明や再生医療の実現に向けた医学への応用が重要である。ES 細胞から中胚葉と心血管系譜の細胞への分化の全容解明に向けて、分化運命を決定する遺伝子の転写制御機構の解明が特に重要である。転写因子 Brachyury (T) と Mesp1 は ES 細胞から中胚葉、中胚葉から心血管系譜細胞へのそれぞれの分化決定をつかさどるマスター遺伝子である。T と Mesp1 は転写因子として下流の遺伝子群を制御するカスケードが解明される一方で、自分自身の発現を制御する転写因子の報告が少ないため、新規転写因子の同定及び機能解析が必要である。

(2) 我々は BTB ドメインを有するジンクフィンガー型の新規の転写因子 CIBZ を同定した。CIBZ は N 末端側に BTB という転写抑制ドメインと中央部に DNA と結合するジンクフィンガードメインがあり、マウス ES 細胞を含む様々な細胞に発現する (Matsuda et al., 2004; Sasai et al., 2005)。これまでに我々は細胞内において CIBZ は、<sup>1</sup> 細胞死を抑制すること (Oikawa et al., 2008)、<sup>2</sup> 筋芽細胞の骨格筋への分化を抑制すること (Oikawa et al., 2011)、<sup>3</sup> CIBZ の欠損は ES 細胞の未分化性の維持に必須ではないが、CIBZ が欠損した ES 細胞は細胞の増殖が低下していることを明らかにした (Nishii et al., 2012)。ES 細胞の増殖低下が ES 細胞の未分化性を不安定な状態へと遷移させることで分化しやすいということが知られていることから、CIBZ の発現が ES 細胞の分化に与える影響が示唆された。

2. 研究の目的

(1) CIBZ が ES 細胞の分化にどのような影響を与えるかを明らかにした上で、その機能を明らかにする。

(2) CIBZ が T と Mesp1 を制御するかどうかを明らかにした上で、その制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) マウス ES 細胞を胚葉体と呼ばれる三胚葉への分化誘導実験 (浮遊培養法)。ES 細胞を低速 (40 回転/分) 水平回転振動させることで二日目から均一なスフェア (胚様体) が形成され、5 日間の継続培養による大きいサイズの胚葉体になる (図 1 A)。

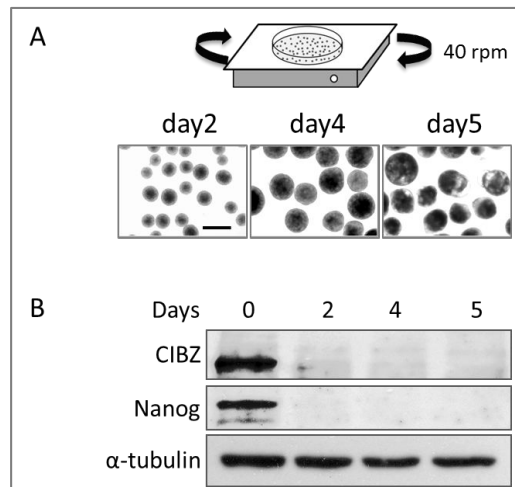
(2) マウス ES 細胞を用いた心筋細胞への分化誘導法。5 日間培養した個々の胚様体を接着培養させることで、7 日目から自発的に拍動する心筋細胞が光学顕微鏡で観察される (図 3 A)。

(3) CIBZ の発現変化 (欠損或いは過剰発現) が ES 細胞の心筋細胞系譜への分化に影響を与えるかどうかを検証するため、CIBZ を欠損させた ES 細胞株と CIBZ が安定的に過剰発現する ES 細胞株を樹立する。

(4) CIBZ が標的遺伝子のプロモーター領域への結合と抑制を検証するため、それぞれをクロマチン免疫沈降法とレポーター法を用いる。

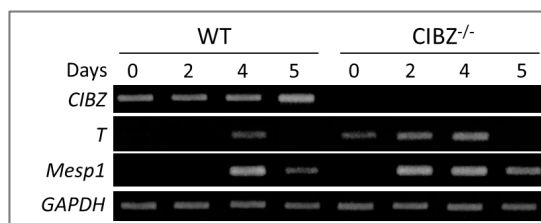
4. 研究成果

(1) CIBZ の発現低下は ES 細胞の心筋細胞への分化に必須であることが示唆される。CIBZ が ES 細胞の分化に与える影響を調べるため、マウス ES 細胞を胚葉体への分化誘導を行った (図 1 A)。その結果、ES 細胞の分化に伴って CIBZ タンパク質の発現が分化誘導後 2 日目から顕著に低下した (図 1 B)。CIBZ が欠損した ES 細胞株による胚様体形成においては、T と Mesp1 の mRNA レベルが野生型の ES 細胞より上昇することを確認した (図 2)。以上のことから、CIBZ の発現低下が ES 細胞の中胚葉と心筋細胞への分化に必要なことが示唆された。



(図 1) ES 細胞の分化誘導に伴って CIBZ タンパク質の発現の減少

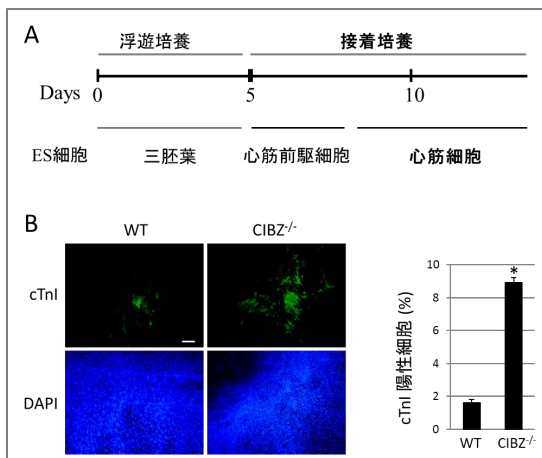
A、ES 細胞を浮遊培養させることによる胚様体の形成 (上) と胚様体の経時的な顕微鏡写真 (下)。B、胚様体形成過程における CIBZ タンパク質の発現。Nanog は陽性コントロールとして、 $\alpha$ -tubulin は内部標準とした。



(図 2) CIBZ が欠損した ES 細胞による T と Mesp1 の発現の上昇

野生型 (WT) と CIBZ が欠損した ES 細胞 (CIBZ<sup>-/-</sup>) を用いて、三胚葉への分化誘導実験を行った。図に示した時間に細胞を回収し、半定量 RT-PCR で T と Mesp1 の発現を解析した。GAPDH は内部標準とした。

(2) CIBZ が ES 細胞から心筋細胞への分化を抑制する。CIBZ の発現が ES 細胞の心筋細胞への分化に与える影響を調べるため、CIBZ が欠損した ES 細胞株及び CIBZ を ES 細胞に安定的に過剰発現させた細胞株を用いて、心筋細胞への分化誘導実験を行った (図 3A)。その結果、CIBZ の欠損は自発的に拍動する心筋細胞の割合が増加することに対して、CIBZ の過剰発現は逆の表現型を示した。また、心筋細胞に特異的に発現する cTnI の陽性細胞数が CIBZ の欠損 ES 細胞では上昇したこと (図 3B) に対して、CIBZ の過剰発現 ES 細胞では減少した。さらに、ES 細胞の心筋細胞への分化において、CIBZ の欠損は心筋分化促進遺伝子の発現を上昇させ、過剰発現ではそれらを減少させた。これらの結果より、CIBZ が ES 細胞から心筋細胞への分化を抑制することが明らかとなった。

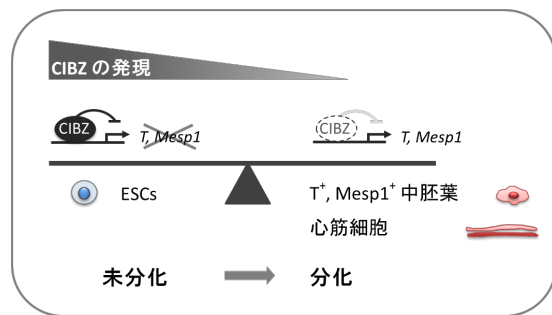


(図 3) CIBZ が欠損した ES 細胞による心筋細胞への分化促進

A、ES 細胞から胚様体形成を経て心筋細胞に分化する模式図である。ES 細胞を浮遊培養から接着培養に切り替えることで自発的に拍動する心筋細胞 (cTnI 陽性細胞) が形成される。B、浮遊培養した胚様体を接着培養してから 10 日目の胚様体を抗 cTnI 抗体 (緑) と DAPI (細胞核、青) で免疫染色した写真 (左)。免疫染色した胚様体より cTnI 陽性細胞の割合 (cTnI/DAPI) を定量したグラフ (右)。WT: 野生型 ES 細胞; CIBZ<sup>-/-</sup>: CIBZ が欠損した ES 細胞。

(3) CIBZ は T と Mesp1 の転写を直接的に抑制することで ES 細胞の心筋細胞への分化を調節する。ES 細胞において、CIBZ の発現変化は T と Mesp1 の mRNA レベルと逆の相関を示したことから、CIBZ が直接的にこの 2 つ遺伝子の転写を制御することが示唆され

た。クロマチン免疫沈降法を用いて解析した結果、CIBZ が T と Mesp1 のプロモーター領域に結合することが分かった。レポーターアッセイを用いた結果、CIBZ が T と Mesp1 のプロモーターを抑制することが分かった。さらに、この抑制効果には CIBZ のジンクフィンガードメインが必要であることが判明した。以上の結果より、CIBZ は T と Mesp1 の転写を抑制することで ES 細胞の心筋細胞系譜への分化を「負」に制御することが明らかになった (Kotoku et al., 2016) (図 4)。



(図 4) CIBZ が ES 細胞から中胚葉と心筋細胞への分化を制御するモデル

未分化 ES 細胞において、CIBZ は T と Mesp1 のプロモーターに結合することでこの 2 つ遺伝子の転写を抑制する。ES 細胞の分化に伴って、CIBZ タンパク質の発現低下による T と Mesp1 への抑制が弱くなることでこの 2 つ遺伝子の発現が上昇して、中胚葉と心筋細胞への分化に寄与する。

< 引用文献 >

Matsuda, E., Shigeoka, T., Iida, R., Yamanaka, S., Kawaishi, M., and Ishida, Y. (2004). Expression profiling with arrays of randomly disrupted genes in mouse embryonic stem cells leads to in vivo functional analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. 101, 4170-4174.

Sasai, N., Matsuda, E., Sarashina, E., Ishida, Y., and Kawaichi, M. (2005). Identification of a novel BTB-zinc finger transcriptional repressor, CIBZ, that interacts with CtBP corepressor. Genes Cells. 10, 871-885.

Oikawa, Y., Matsuda, E., Nishii, T., Ishida, Y., and Kawaichi, M. (2008). Down-regulated of CIBZ, a Novel Substrate of Caspase-3, Induces Apoptosis. J. Biol. Chem. 283, 14242-14247.

Oikawa, Y., Omori, R., Nishii, T., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E. (2011).

The methyl-CpG-binding protein CIBZ suppresses myogenic differentiation by directly inhibiting myogenin expression. Cell Res. 21, 1578-1590.

Kotoku T, Kosaka K, Nishio M, Ishida Y,

Kawaichi M, Matsuda E. (2016). CIBZ regulates mesodermal and cardiac differentiation of by suppressing T and Mesp1 expression in mouse embryonic stem cells. Scientific Reports. 6:34188.

#### 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 幸得 友美、小坂 幸二、西尾 美紀、石田 靖雅、川市 正史、松田 永照、CIBZ regulates mesodermal and cardiac differentiation of by suppressing T and Mesp1 expression in mouse embryonic stem cells、Scientific Reports、査読有、2016、6:34188  
DOI: 10.1038/srep34188

2 松田 永照、西尾 美紀、石田 靖雅、哺乳類の発生や分化におけるメチル化 DNA 結合タンパク質の役割、Bio Clinica、査読なし、Vol 31, No5, 2016、pp.79-84  
URL:[http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/01bio/bio2016\\_05.html](http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazines/01bio/bio2016_05.html)

〔学会発表〕(計2件)

1 第38回日本分子生物学会年会  
西尾 美紀、幸得 友美、松田 永照、石田 靖雅、川市 正史、マウス ES 細胞の心筋分化における BTB ジンクフィンガータンパク質 CIBZ の機能解析、2015年12月2日、神戸ポートアイランド(兵庫県神戸市中央区港島中町6丁目)

2 International Conference on Molecular Biology and Biotechnology  
松田 永照、及川 優、幸得 友美、川市正史、Functional analysis of a BTB domain-containing zinc finger protein CIBZ in mammalian cells、2016年3月10日、クアラルンプール(マレーシア)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

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〕  
ホームページ等

#### 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

(2)研究分担者 該当なし  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者 該当なし  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者 該当なし  
( )