

自己評価報告書

平成 23 年 4 月 15 日現在

機関番号：14301

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2008～2012

課題番号：20114007

研究課題名（和文）発生・分化におけるクロマチン高次構造の解析

研究課題名（英文） Analysis of chromatin structure changes during cell differentiation.

研究代表者 末盛 博文 (SUEMORI HIROFUMI)
京都大学・再生医科学研究所・准教授

研究者番号：90261198

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・分子生物学

キーワード：細胞分化、クロマチン、遺伝子発現、ヒストン修飾、ES細胞

1. 研究計画の概要

発生分化における遺伝子発現の時空間的变化がゲノムのDNA塩基配列情報だけではなく、クロマチン構造や染色体の高次構造の変化によっても制御されると考え、このような核内高次構造が作り出す「場」とその変化が、哺乳動物の発生分化においてどのような機能を有するのかを、まず遺伝子発現制御機構としての観点から解析をすすめている。

本研究課題では、高精度の分化誘導技術を応用し、クロマチン高次構造とその機能が細胞分化過程でどのように変化しているのかを明らかにすることを目的とする。このような核内高次構造が形成する「場」が遺伝情報の機能発現にどのように関与しているのかは、これまでの研究でもほとんど解明されておらず、本研究領域に新たなパラダイムを形成しうるものである

2. 研究の進捗状況

クロマチン高次構造とその機能が細胞分化過程でどのように変化しているのかを明らかにするため、ヒストン修飾やクロマチン構造の構築などに関連する因子の発現変化をより鋭敏に検出することが必要である。このような分化過程での遺伝情報場の変化を解析するため、まず特定の種類の細胞を効率よく分化誘導する方法を確立した。これにより未分化ヒトES細胞から、中胚葉の特定領域を精度良く分化誘導することが可能になった。

さらに、このヒトES細胞から中胚葉性細胞への細胞分化を効率よく誘導するシステムを利用し、この過程でクロマチン高次構造の構築に関連していると考えられるクロマチンリモデリングやヒストン修飾に関わる

遺伝子の発現を詳細に解析した。マイクロアレイ解析とあわせて、約200のクロマチン高次構造の構築に関連する遺伝子についてリアルタイムPCRを行った。これにより精度良く関連する遺伝子の発現を解析することができた。解析した遺伝子の中から、その発現が分化誘導前後や分化時間の経過に伴い変化するものを抽出した。研究開始当初は相当数の遺伝子に発現変化が見られると見ていたが、実際には両方の解析で2倍以上の発現変動が認められた遺伝子は比較的少数であった。

現在、特異的分化誘導方を利用して単離したクロマチンリモデリング因子など核内構造の変化に関連すると考えられる遺伝子群について、その機能の解析をすすめている。また、特定のクロマチン構造に関連すると考えられるヒストンバリエーションについて、その局在を生細胞で観察するために、GFP等の蛍光蛋白質との融合蛋白質を発現するベクターを構築、ES細胞に導入しこのヒストンバリエーションの挙動をライブイメージングできると考えられる細胞系を確立した。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

ゲノムワイドでのクロマチン高次構造に関するデータは当初計画にほぼ沿って蓄積が進んでいるが、これらの情報から、機能解析への展開に、必要とされる人材の雇用に難しいなどから若干の遅れがある。また観察技術にも進展がみられ、本研究に適した方法の検討を行う必要があるなどしたが、おおむね計画にある成果はあげられている。

4. 今後の研究の推進方策

これまでの解析から、特定のヒストン修飾を細胞内で可視化するために適した抗体の選別はほぼ終了しており、今後は未分化細胞の核内での各種修飾ヒストンの局在と、細胞分化前後での挙動の変化を詳細に解析する。また核内でのゲノム構造を可視化するためのレポーター遺伝子を導入した細胞を用いて分化過程での挙動を解析する。一分子イメージング技術がこの解析に応用可能かどうかを検討する。また超解像観察装置を用いることで、従来にない解像度でより詳細な解析が可能になると考えられるため本解析に利用可能かどうか検討する。

これらの当初計画にある研究に加え、ヒストン修飾状態を初期胚発生過程でライブセル観察する。さらにヘテロクロマチン領域の可視化など遺伝子発現の活性化状態の観察を同時に行うなどにより、その機能について情報を収集する。

5. 代表的な研究成果

(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7件)

- ① Adachi K, Suemori H, Yasuda SY, Nakatsuji N, Kawase E. Role of SOX2 in maintaining pluripotency of human embryonic stem cells. *Genes Cells*, 15, 455-470. (2010) 査読有
- ② International Stem Cell Initiative Consortium, Akopian V, Andrews PW, Beil S, Benvenisty N, Brehm J, Christie M, Ford A, Fox V, Gokhale PJ, Healy L, Holm F, Hovatta O, Knowles BB, Ludwig TE, McKay RD, Miyazaki T, Nakatsuji N, Oh SK, Pera MF, Rossant J, Stacey GN, Suemori H. Comparison of defined culture systems for feeder cell free propagation of human embryonic stem cells. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.*, 46, 247-258. (2010) 査読有
- ③ Ishii T, Yasuchika K, Fukumitsu K, Kawamoto T, Kawamura-Saitoh M, Amagai Y, Ikai I, Uemoto S, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N. In vitro hepatic maturation of human embryonic stem cells by using a mesenchymal cell line derived from murine fetal livers. *Cell Tissue Res.*, 339, 505-512. (2010) 査読有
- ④ Mitsui K, Suzuki K, Aizawa E, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Mitani K. Gene targeting in human pluripotent stem cells with adeno-associated virus vectors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 388, 711-717. (2009) 査読有
- ⑤ Taura D, Noguchi M, Sone M, Hosoda K,

Mori E, Okada Y, Takahashi K, Homma K, Oyamada N, Inuzuka M, Sonoyama T, Ebihara K, Tamura N, Itoh H, Suemori H, Nakatsuji N, Okano H, Yamanaka S, Nakao K. Adipogenic differentiation of human induced pluripotent stem cells: comparison with that of human embryonic stem cells. *FEBS Lett.*, 583, 1029-33. (2009) 査読有

⑥ Yamauchi K, Hasegawa K, Chuma S, Nakatsuji N, Suemori H. In vitro germ cell differentiation from cynomolgus monkey embryonic stem cells. *PLoS ONE*. 4, e5338. (2009) 査読有

⑦ Fukumitsu K, Ishii T, Yasuchika K, Amagai Y, Saitoh M, Kawamoto T, Kawase E, Suemori H, Nakatsuji N, Ikai I, Uemoto S. Tissue Eng Part A. 15, 3847-56. (2009) 査読有

[学会発表] (計4件)

①末盛博文 ヒトES細胞からの原条形成過程におけるクロマチン修飾因子の発現解析. 第33回日本分子生物学会年会 (2010)

②末盛博文 ヒトES細胞から見た多能性幹細胞の特性. 第9回日本再生医療学会 (2010)

③Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Kaneda A, Suemori H, Kume S, Aburatani H. Tissue-specific promoter hypomethylation as a new aspect of tissue-specific differentially methylated regions, T-DMR. 第32回日本分子生物学会年会 (2009)

④末盛博文 初めてのヒトES細胞。培養と分化誘導. 第8回核ダイナミクス研究会 (2009)

[図書] (計1件)

高田圭、末盛博文 再生医療の最前線 2010 「再生医療に適したES細胞培養システム」 実験医学 28, 204-208. (2010)