様式C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成　20年　5月　29日現在

研究種目：基盤研究　(C)
研究期間：2007～2008
課題番号：19591120
研究課題名（和文）
多分化細胞における遺伝子発現の不均一性と分化能力との関連
研究課題名（英文）
Relationship between heterogenity of gene expression and differentiation.

研究代表者
坂本　比呂志（SAKAMOTO　HIROSHI）
熊本大学・発生医学研究センター・助教
研究者番号：00347014

研究成果の概要：c-mybは血液細胞の増殖だけでなく分化にも影響する転写因子である。そこで、本研究では、その発現をモニターし分化への影響を詳細に検討する為に　遺伝子改変マウスの樹立を試みた。最初の方法論ではc-mybモニターES細胞は完成しなかった。しかし、技術的改良により、目的のES細胞は樹立でき、現在このES細胞を用いた遺伝子改変マウスの作成を始めている。この結果は、世界初のc-mybモニターマウス誕生へと繋がり、このマウスを用いての血液細胞分化研究へ貢献出来ると考える。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
２００７年度	2,200,000	660,000	2,860,000
２００８年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
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：内科系臨床医学・血液内科学
キーワード：細胞分化、転写因子、c-myb、

１．研究開始当初の背景

転写因子c-mybは、幼弱な血液細胞においての重要性が古くから知られており、遺伝子破壊マウスは、幼弱な赤芽球の発育不良による貧血で胎生致死となることが1991年には報告されている。近年ES細胞のキメラや臓器特異的遺伝子破壊マウスの作製などにより、成体における細胞系譜ごとのc-mybの機能が明らかとなった。我々もc-myb遺伝子破壊ES細胞において、Tetracycline Promoterによるc-myb遺伝子の完全なる人為的発現により、その詳細な機能解析を行った。赤血球の分化にc-mybは抑制的な作用を示すとされていたが、一様にc-mybが抑制するのではなく ある成熟段階（$CD71^{high}Ter119^{-}$）までは十分な発現量が必

要である。しかし、その後の成熟には c-myb 発現量減少が必須であった。一方、巨核球からの血小板の産生には c-myb は抑制的であった。リンパ球発生において、c-myb の発現によっても B 細胞は発生せず、未熟なリンパ球に広く発現している IL7R も発現していなかった。このように c-myb は様々な血液細胞系譜で機能しており、その発現量は単純な ON/OFF といったものではなく、発生段階に応じた量的な制御が重要である点も我々は明らかとした。

多分化能を有する細胞からの分化では、細胞系譜ごとの転写因子にそれぞれ閾値があり、それを超えた細胞が分化する。そこで、c-myb の発現は、様々な lineage-affiliated な初期遺伝子群の変動に影響しているのではないかと予想していた。それは、我々の c-myb 研究における $CD71^{high}Ter119^{-}$での現象からである。赤血球の経路において、細胞集団内の平均としての c-myb 発現量は、$CD71^{high}Ter119^{-}$まで一旦上昇し、その後下降するとの単純な変化を示す。しかし、$CD71^{high}Ter119^{-}$は、赤血球だけに運命決定された細胞が含まれている訳ではなく、その後の c-myb 発現持続は GATA2 の異常発現となった。他の細胞系譜との関連を考えると $CD71^{high}Ter119^{-}$から c-myb 発現量が下降しない細胞の存在確率も重要であると考えられる。また、c-myb 自身は lineage-affiliated な転写因子ではない。そこで本研究においては、「細胞分化の分岐点となる細胞集団内での c-myb 発現のばらつき」および「個々の細胞でのその発現量」を「細胞分化能の変化」と比較することを計画した。これは、「細胞集団内における不均一性は多分化能獲得に重要である」との仮説からの分化機構を、様々な血液細胞で機能している c-myb を用いて具体的に検証する事を試みた。
そこで、本研究では、最初にマウス個体における内因性の c-myb 遺伝子の発現を、詳細にモニターし、次にこの発現量的差異が細胞分化能にどのように影響しているのかを検討する事を試みた。

２．研究の目的

本研究では「細胞集団内における不均一性は多分化能獲得に重要である」との仮説を「様々な血球細胞分化における転写因子 c-myb の関与の解明」を手掛りとして検証することが目的である。転写因子は、細胞分化の運命決定に　大きく関わっている。多分化能を有する血液幹細胞は、null の状態ではなく lineage-affiliated な遺伝子群が弱く共発現しており、“ lineage priming. ” な状態である。この血液幹細胞においての分化機構は、古くより研究の対象である。近年、二方向性分化能をもつ細胞の詳細な分化機構が報告されている。二方向性分化能を有する Unstable Steady-state な細胞は、細胞系譜が決定される際に、初期遺伝子群の中の一つ(例、a)が転写や分子の「ゆらぎ」により僅かに活性が増加する。この僅かな増加は、その下流の遺伝子(b)の発現を誘発し、この誘導された遺伝子(b)が初期遺伝子(a)の発現をさらに上昇させる。同時に、初期遺伝子(a)や誘導された遺伝子(b)は、もう一方向への分化を誘導する初期遺伝子(c)の発現を抑制する。この初期遺伝子(c)は初期遺伝子(a)の発現を抑制しており、初期遺伝子(c)の減少により初期遺伝子(a)への発現抑制が解除され、初期遺伝子(a)の活性をさらに強める。このような Positive Feedback loops 機構により、Unstable Steady-state は、Stable Steady-state となり分化は進行する。このような Positive Feedback Loops による数理学的モデルの遺伝子発現機構は、大腸菌、酵母などですでに証明されていたが、近年 CMPs(common myeloid progenitors)においても報告された。ここで「ゆらぎ」と称した現象は、細胞分化において従来より述べられている Stochastic Events でもある。この細胞運命決定における Stochasticity は、血球細胞以外の細胞分化の過程でも現在は広く論じられている。Stochasticity という言葉からは、無作為に様々な条件が選ばれるとの誤解があるが、lineage priming の中での Stochasticity と考えることで全くのランダムな現象ではなくなる。実際、lineage priming な転写因子の発現の順序（時間）や量がその後の細胞運命の決定に重要であると報告されている。

また、血液幹細胞の放射線照射マウスへの移植は、一つの幹細胞が「自己増殖能」と「多分化能」を同時に示すことを明確に示した。しかし、血液幹細胞の lineage priming を示す報告は、細胞機能において同一な細胞集団内の発現遺伝子は、細胞ごとに異なることも示している。また、放射線照射マウスの長期再構築能を示す集団は、分化能において 3 種類に分かれ、再移植を行ってもその特徴は固定されたまま維持されているとの報告もある。このような「細胞集団内における heterogenity (不均一性)の意義」は、生活サイクルの短い下等生物でよく検討されている。遺伝的に同一のバクテリアの集団には細胞周期が異なるものが不均一に存在し、中には冬眠状態なものまである。これらは、環境変化による大多数の死滅の後でも、ランダムに冬眠状態から抜け出し増殖する。そして、このような不均一性は Stochastic Events によって生じていると考えられ、生物の多分化能や多様化の一般的法則性を Stochastic Gene Expression から考察することは、改め

て重要であると考える。

３．研究の方法

c-myb は、すでに 1990 年代初頭に遺伝子破壊マウスが作製され、臓器特異的欠損マウスおよび内因性プロモーターによる弱発現マウスも近年報告された。そこで本研究では、内因性プロモーターによる c-myb 発現を正確にモニターし、その発現により特定の細胞集団の分化能力がどのように変化しているのかを単一細胞レベルで観察し、その細胞集団の能力変化を明らかとすることであった。

(1) 導入予定蛍光タンパク質の有用性の検討

c-myb 遺伝子座に導入する蛍光タンパク質の特性は、最も重要であった。蛍光タンパク質 Venus は、タンパク質としての成熟も早く蛍光も強いが、YFP の変異体であることにより FACS では、2 つのチャンネルに同程度の蛍光を発し、細胞表面マーカーの使用が制限されることより断念した。そこで、従来型の EGFP ではなく ZsGreen（新規蛍光タンパク質）を用いた。ZsGreen は、EGFP と同様な蛍光特性を有しているため現有の機器での解析が可能であり、EGFP よりも非常に明るい蛍光を発する。この ZsGreen の C 末端にタンパク質分解シグナルを融合させることで短寿命型の緑蛍光タンパク質 ZsGreenDR となる。そこで、この ZsGreenDR のタンパク質としての半減期をノックインマウス作製の前に検討し、その有用性を検討した。

(2) 蛍光タンパク質導入マウス作製

遺伝子改変マウス作成の前にその有用性を明らかにするために　先の ZsGreenDR を ES 細胞の c-myb 遺伝子座にノックインした ES 細胞を作成し、ES 細胞 in vitro 系にて検討を行った。

４．研究成果

(1) ZsGreeDR 有用性の検討

NIH3T3 における一時的な発現により、ZsGreeDR の蛍光強度は　タンパク質分解シグナルを有さない ZsGreen1 よりは弱いが、十分な強度を示した。

(2) c-myb レポーターマウス作成

ZsGreeDR により c-myb の発現変化をモニター出来るのかを明らかにする目的で、マウス作成に先立ち ES 細胞にて確認を行った。ZsGreenDR を c-myb 遺伝子座にノックインした ES 細胞の樹立を行った。方法論として c-myb 遺伝子 3'-UTR 領域への ires と ZsGreenER の挿入を試みた。しかし、正確に標的遺伝子座にレポーター遺伝子が挿入された ES 細胞からは、緑色蛍光を発する細胞は得られなかった。さらに、この ES 細胞を血管内皮細胞や血液細胞に分化させても FACS を用いた解析においても緑色蛍光は観察されなかった。そこで、このアレルからの発現を検討したが、ZsGreenER mRNA の発現は観察されなかった。現在、その理由として 3'-UTR 近傍に ires 配列による mRNA の 2 次構造が発現制御に影響を与えた可能性を考えている。現にこの 3' 領域には shRNA などの結合による翻訳調節などが報告されており、高次構造の変化が発現や翻訳へ影響したと考えている。この結果から、c-myb のモニターの方法論を多少変えノックイン ES 細胞の樹立を行った。この新しい方法論により、このノックイン ES 細胞から分化した細胞において緑色蛍光タンパク質の発現が FACS を用いて行えた。この ES 細胞では、c-myb の発現モニターを in vivo で行える事を示しており、この結果は、世界初の c-myb モニター細胞である。この事を確認する実験を現在行っている。また、この ES 細胞からの遺伝子改変マウスの樹立を始めている。

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 3 件）

① Huang X, <u>Sakamoto H</u>, and Ogawa M Thrombopoietin controls proliferation of embryonic multipotent hematopoietic progenitors. Genes to Cells (in press)

②Guo R, <u>Sakamoto H</u>, Sugiura S, Ogawa M. Endothelial cell motility is compatible with junctional integrity. *J Cell Physiol.* **211** 327-35 (2007)

③ Hashimoto K, Fujimoto T, Shimoda Y, Huang X, <u>Sakamoto H</u>, Ogawa M. Distinct hemogenic potential of endothelial cells and CD41+ cells in mouse embryos. *Dev Growth Differ.* **49** 287-300 (2007)

〔学会発表〕（計 5 件）

①<u>坂本比呂志</u>、黄昕、小川峰太郎　トロンボポエチンによるJAK2-STAT5を介した胎児型の多分化血液細胞の増殖
第五回　宮崎サイエンスキャンプ 2009 年 2 月 20 日-2 月 22 日　宮崎

②黄昕、<u>坂本比呂志</u>、小川峰太郎
Thrombopoietin regulates the proliferation of embryonic hematopoietic progenitors
第31回　日本分子生物学会年会・第81回　日本生化学会大会　合同大会
2008 年 12 月 10 日神戸ポートアイランド

③坂本比呂志、松川舞、郭　仁勇、小川峰太郎　Notchシグナルの下流因子によるES細胞由来内皮細胞の反応
第31回　日本分子生物学会年会・第81回　日本生化学会大会　合同大会
2008年12月9日神戸ポートアイランド

④黄　昕、坂本比呂志、小川峰太郎
Thrombopoietin receptor, c-mpl, is a marker of early hematopoietic progenitors in mouse embryo.
第30回日本分子生物学会・第80回日本生化学会　合同大会　2007年12月12日　横浜

〔図書〕（計１件）
①坂本　比呂志、小川峰太郎; 造血発生の発生分化におけるc-Myb発現レベルの意義　血液・腫瘍科　Vol.55(1) 70-75　(2007)　科学評論社

〔その他〕
ホームページ等
http://www.imeg.kumamoto-u.ac.jp/divisions/cell_differentiation/

６．研究組織
(1)研究代表者
坂本　比呂志（SAKAMOTO　HIROSHI）
熊本大学・発生医学研究センター・助教
研究者番号：00347014

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし