

なわち、マウス ES 細胞から Flk1 陽性の中胚葉細胞を分化誘導し、そこから血管を分化させる新しい分化系を開発した (Nature, 2000)。また心筋分化 (FASEB J, 2005)、動静脈リンパ管内皮分化を含む新しい内皮細胞分化制御機構 (Blood, 2009, 2011; J Cell Biol, 2010) など種々の心血管分化機構を明らかにしている。さらにマウス iPS 細胞の心血管分化誘導にも世界に先駆けて成功しており (Circulation, 2008)、ES/iPS 細胞の分化研究において世界的にも先端的である。

2. 研究の目的

代表者らは、マウス ES 細胞の分化途上において、PKA を活性化することにより、「中胚葉および血管内皮細胞の分化を従来の約 2 倍早く誘導する」ことを見出した。すなわち、従来 ES 細胞から 3-4 日を要した中胚葉分化と 5 日かかっていた内皮細胞分化を、それぞれ 1.5-2 日、2.5 日で誘導することに成功している。これらの結果は、制御不能と思われた分化速度が、恣意的に制御が可能であるとともに、新しい分子機構により制御されていることを示唆する。代表者は同制御機構の解析を進め、PKA 活性化時にヒストン H3K9 メチル化が変化していることを突き止め「外的シグナル→エピジェネティック制御→遺伝子発現→分化速度制御」に至る一連の新しい分子連関を明らかにしてきた。

本研究は、代表者らが見出した新しい分化速度制御機構を明らかにし、細胞分化時間を恣意的に制御可能とすることを目的とする。研究期間内においては、1) 分化速度制御機構における PKA 及び G9a の意義の検討、2) PKA による G9a 制御機構の解明、3) G9a によるヒストン修飾の標的遺伝子の同定、4) PKA を活性化する内因性シグナルの探索、を行い、分化速度制御の分子実体をエピジェネティクスを含む新しい分子連関として明らかにする。

「分化速度」の制御、という新たな命題に取り組む中で、代表者はシグナルとエピジェネティクスの新しい連関がその中心的役割を果たしていることを見出している。細胞分化が、「細胞が外的シグナルに反応して遺伝子発現パターンなど細胞の内的状況を変化させ安定させる現象」であること、及びその制御にエピジェネティクスが深く関与していることは近年コンセンサスとなっていると思われる。しかし実際には、外的シグナルとエピジェネティクスを連関させる分子機構はほとんど全く明らかになっていない。本研究においては、外的シグナルから「分化速度の違い」という最終的な細胞のふるまいまでの連関を解析することが可能であり、外的シグナル→細胞内シグナル (PKA) →エピジェ

ネティック制御 (G9a) →遺伝子発現→細胞のふるまい (分化速度) という細胞分化における一連の細胞の反応をそのトリガーから最終的アウトプットまで包括的に解明することが期待され、細胞分化研究に全く新しい理解をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

代表者の開拓した独自の ES 細胞分化システムの有する

・2次元単一細胞から中胚葉及び種々の心血管細胞が誘導可能である

・テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現及びタモキシフェン誘導性 Cre-loxP 組み換えシステムにより分化途上における様々な遺伝子発現の恣意的操作が可能である。

という利点を生かして、以下の研究を行う。

(1) 分化速度制御機構における PKA 及び G9a の意義の検討

代表者は、テトラサイクリン誘導性 cDNA 発現 ES 細胞を用いて、分化途上の任意の段階において PKA シグナルを活性化するシステムを構築している (Blood, 2009)。ES 細胞分化時に PKA を活性化することにより、i) 中胚葉細胞及び内皮細胞の出現が従来の約 2 倍早くなること、ii) 他の胚葉の出現も同様に早くなること、iii) H3K9 ジメチル化が特異的に亢進することを見出した。分化速度を制御するシグナルはこれまで報告がなく、代表者らの発見が世界初である。H3K9 メチル化酵素である G9a の発現が PKA 活性化により亢進していること、及びタモキシフェン誘導性に Cre-loxP システムを用いて G9a 遺伝子をノックアウトできる ES 細胞システムを構築し、PKA 活性化時に G9a を欠失させると PKA による分化速度の亢進が認められなくなることから、分化速度制御において G9a は必須であると考えられる。In vitro における G9a の gain-of-function 実験、in vitro, in vivo における PKA 及び G9a の loss-of-function 実験を含め、分化速度制御における PKA 及び G9a の機能的意義を確認する。マウス胎仔 ex vivo culture における PKA 及び G9a 阻害剤の投与実験や G9a ノックアウトマウス (Tachibana, Genes Dev, 2002) の解析により、in vivo における PKA 及び G9a の意義を解析する。

(2) PKA による G9a 制御機構の解明

代表者はすでに、PKA 活性化早期に G9a の発現が増加することを見出しているが、これまで G9a の発現制御機構はほとんど明らかになっていない。遺伝子発現レベルとタンパクレベル (post-translational) の制御機構を想定し解析を進める。i) G9a 遺伝子の発現調節領域の解析、ii) PKA 活性化後の遺伝子発現

の網羅的解析 (DNA チップ)、iii) タンパクの安定化・分解機構の解析 (ユビキチンプロテアソーム、オートファージ、カルパイン経路等の関与) を検討し、PKA から G9a に至る経路を明らかにする。

(3) G9a によるヒストン修飾の標的遺伝子の同定

G9a は H3K9 のモノメチル化ジメチル化を誘導すること及び Dnmt (DNA メチル化酵素) を介して DNA メチル化を誘導することが知られている (Tachibana, Genes Dev, 2002; EMBO J, 2008)。また、未分化 ES 細胞マーカーである Oct4 がその標的遺伝子の一つとして報告されている (Feldman, Nat Cell Biol, 2006)。

① 未分化 ES 細胞から中胚葉・内皮分化に至る過程において遺伝子発現の ON/OFF が明確になっている遺伝子に関して、H3K9 メチル化及び DNA メチル化の変化を検討する。未分化 ES 細胞マーカー Oct4, Sox2, Nanog, Rex1、中胚葉系マーカー Brachyury, Flk1, PDGF- α 受容体などに関して、個別にヒストンメチル化及び DNA メチル化につき検討する。

② 分化速度制御時のエピジェネティクスの網羅的解析

ChIP-sequence アッセイによる網羅的ヒストン修飾解析 (分化の促進及び抑制に関与することが報告されている H3K4 及び K9, 27 のメチル化 (Pan, Cell Stem Cell, 2007) 等) に関して研究を進める。既報の修飾ターゲット以外を含めた網羅的なエピジェネティクス解析により、分化速度を制御している epigenetic landscape 全体の把握を試みる。東京大学先端科学技術研究センター油谷浩幸教授との共同研究により解析を行う予定である。

(4) PKA を活性化する内因性シグナルの探索

早期胚において PKA の活性化に関与している内因性シグナル (リガンド) の探索を行う。代表者は以前、Flk1 陽性細胞からの動脈内皮細胞分化を促進するリガンドとしてアドレノメデュリンを報告したが (Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2006)、未分化 ES 細胞からの分化など早期分化における内因性シグナルは不明である。PKA を活性化することが報告されている分子を用いた candidate assay 及び早期胚に発現している遺伝子データベースより、分化速度制御に関与している内因性シグナルを同定する。これにより、外的シグナル→細胞内シグナル (PKA) →エピジェネティック制御 (G9a) →遺伝子発現 (G9a 標的分子) →細胞のふるまい (分化速度) に至る新しい分子連関過程を完成する。

これらの解析により、新しい分化速度制御機構の分子的本体に迫る先端的研究を推進する。

4. 研究成果

H3K9 メチル化酵素である G9a の発現が PKA 活性化により亢進していること、及びタモキシフェン誘導性に Cre-loxP システムを用いて G9a 遺伝子をノックアウトできる ES 細胞システムを構築し、PKA 活性化時に G9a を欠失させると PKA による分化速度の亢進が認められなくなることから、分化速度制御において G9a は必須であると考えられる。In vitro における G9a の gain-of-function 実験、in vitro, in vivo における PKA 及び G9a の loss-of-function 実験を含め、分化速度制御における PKA 及び G9a の機能的意義を確認する。マウス胎仔 ex vivo culture における PKA 及び G9a 阻害剤の投与実験や G9a ノックアウトマウス (Tachibana, Genes Dev, 2002) の解析により、in vivo における PKA 及び G9a の意義を解析した。

その結果、PKA が G9a を分解する酵素 (ユビキチンリガーゼ) である APCC/Cdh1 の活性を阻害し、G9a の発現を維持することにより、G9a による Oct4 や Nanog といった未分化遺伝子への抑制性ヒストンメチル化 (H3K9me2) が早期に起こることにより、分化タイミングが促進されていることを明らかにした。G9a ノックアウトマウスでは逆に発生早期の細胞分化が遅延していることも見だし、本機構の生体における意義も明らかにした。本研究を Cell Stem Cell 誌に報告した (Yamamizu, Cell Stem Cell, 2012)。

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 1 件)

- ① Yamamizu K, Fujihara M, Tachibana M, Katayama S, Takahashi A, Hara E, Imai H, Shinkai Y, Yamashita JK. Protein kinase A determines timing of early differentiation through epigenetic regulation with G9a. **Cell Stem Cell** 2012 Jun 14 ; 10(6):759-770

[学会発表] (計 1 件)

- ② 山下 潤. A novel signaling-epigenetic linkage regulating stem cell "differentiation timing" from pluripotent state to ectoderm, endoderm, and mesoderm lineages (poster). 新学術領域 Neuro-Vascular

Wiring Symposium 2012. 2012. 11. 12.
奈良

[図書] (計 0 件)

[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

山下研究室ホームページ

<http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/es02/index.htm>

6. 研究組織

(1) 研究代表者 山下 潤 (JUN YAMASHITA)

京都大学・iPS 細胞研究所・教授

研究者番号：50335288

研究者番号：

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：