

胚性幹 (ES) 細胞の自己複製と分化における転写因子ネットワーク解析

●山中 伸弥

京都大学再生医科学研究所 再生誘導研究分野

〈研究の目的と進め方〉

胚性幹 (ES) 細胞は哺乳類の早期胚に由来し、すべての細胞へ分化する能力のある幹細胞である。ES細胞は1980年にマウスで樹立され、ノックアウトマウス作製の材料として使われている。さらに1998年にヒトにおいてもES細胞の樹立が報告され、細胞移植療法への応用が期待されている。ES細胞は完全に未分化のまま増殖のみを繰り返す。したがってES細胞においては哺乳類細胞が生命を維持するための最少限の遺伝子セットが発現していると考えられる。さらにES細胞においては未分化状態と分化全能性を維持するための遺伝子セットも発現しているはずである。前者のセットはいわゆるハウスキーピング遺伝子であり、ES細胞だけではなく分化細胞にも存在しているであろう。一方、後者の遺伝子セットの多くはES細胞で特異的に発現していると予想される。本研究の目的は、マウスES細胞において発現している遺伝子を網羅的に収集し、動物細胞増殖のために必要な最少限の遺伝子セットや、ES細胞の未分化状態および分化全能性維持に必要な遺伝子セットを明らかにするための基礎を築くことである。

〈研究開始時の研究計画〉

1 ES細胞由来のEST収集

ES細胞にて発現している遺伝子群のカタログ化を行うために、ESTの収集を行う。ES細胞より均一化したcDNAライブラリーを作成し、無作為に抽出したクローンの塩基配列を現有する96本キャピラリーシークエンサーにて決定する。本研究では1万クローンのEST収集を目標とする。得られた配列の比較により重複を除去し、発現している遺伝子のカタログ化をはかる。

2 ES細胞特異的なDNAチップの作成

1で得られるESTクローンを用い、ES細胞で発現している遺伝子群のDNAチップを作成する。各クローンをベクターに含まれる共通のプライマーを用いたPCRで増幅する。DNAのチップへの打ち込みは受託にて行う。

3 既知分化必須遺伝子の相同組換えによる破壊

ES細胞の分化に必須であることが報告されているp300、CBP、Grb2、SRFの各遺伝子を相同組み換えにより破壊したES細胞を作成する。まず、各遺伝子をネオマイシン耐性遺伝子に置換するターゲティングベクターを用い、ヘテロ変異のES細胞を樹立する。ついで、ヘテロ変異細胞を高濃度のG418により選択することにより、ホモ変異細胞を樹立する。

4 RNAiのES細胞における評価

RNAiを評価するためのモデルとして、Green Fluorescent Protein (GFP)を恒常的に発現するES細胞を作成する。GFPのcDNAに対応するdsRNAを発現するための様々なベクターを構築し、これをGFP発現ES細胞へ導入する。各細胞の蛍光強度を測定し、GFPの発現を最も効率よく抑制するベクターを選択する。このベクターを用いp300やGrb2などに対応するdsRNAを発現させ、相同組み換えによる遺伝子破壊と同様にES細胞分化を抑制するかどうかを検討する。

5 DNAチップによる分化必須遺伝子の相互関係の解明。

平成12年度に作成する変異ES細胞の遺伝子発現プロファイルをDNAチップにより解析する。各遺伝子のプロファイルを比較することにより、遺伝子ネットワークにおける相互関係を明らかにする。

6 RNAiの応用

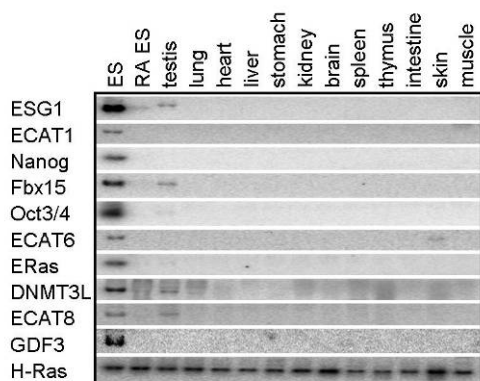
平成12年度の研究で、RNAiの有用性が確立されたなら、ES細胞の増殖、多分化能の維持、そして分化へ関与している遺伝子の機能を破壊し、DNAチップによる解析を行う。また、同法を応用し、新規遺伝子の単離も試みる。

〈研究期間の成果〉

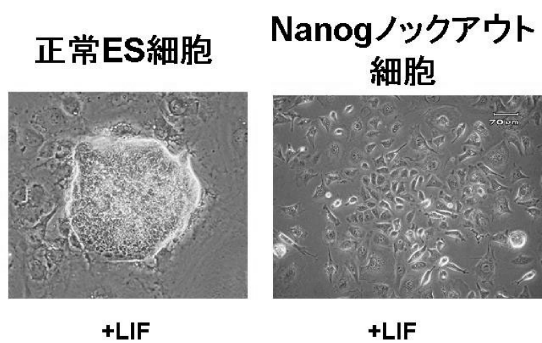
ES細胞からのEST収集を計画している間に、理研からES細胞を含むマウス各種細胞、組織由来のESTクローンが大量に登録された。またNCBIによりdigital differential display法が公開され、ESTデータベースの解析から、各種細胞や組織で特異的に発現する遺伝子を予測することができるようになった。この2つの要因により、研究の経過は、当初計画と大きく異なることとなった。またES細胞で発現する遺伝子を搭載したDNAアレーは、100遺伝子程度のものを試作し、ノザンプロットの結果と良好な相関関係を示すことを明らかにした(業績4)。しかし、その2万以上のマウス遺伝子を搭載したマイクロアレーが各社より比較的安価で提供されるようになり、自作する意味がなくなってしまった。

マウスES細胞由来のExpressed sequence tag (EST) ライブラリーと他の臓器や細胞に由来するライブラリーを比較した結果、前者でのみ存在している遺伝子を複数同定した。これらには実験的にES細胞特異的な発現が確認されているOct4、UTF1およびRex1も含まれていたことから、スクリーニング法として有効あると考えられた。ノザンプロットにより特異的な発現が確認された新規遺

伝子をES cell associated transcripts (ECAT) と命名した (業績3)、遺伝子ノックアウトや過剰発現系による機能解析を行った。その結果、Nanog (業績1) およびERas (業績2) という2つの重要遺伝子を報告した。

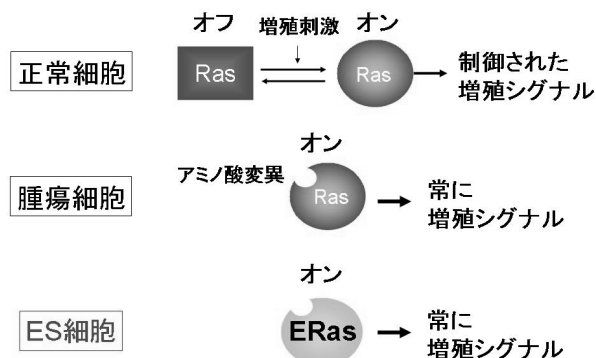


Nanogはホメオボックス転写因子であり、遺伝子をノックアウトするとES細胞は分化多能性を失い原始内胚葉系の細胞へと分化してしまった。ホモ変異の胎児は着床後にエピプラストが形成されず致死となった。またNanog遺伝子を正常の数倍発現させると、マウスES細胞はLIF/STAT3シグナル非存在下で分化多能性を維持することができた。したがって、NanogはES細胞の分化多能性にとって必要かつ十分な因子であると考えられた(業績1)。



ERasはHRasと約40%程度の相同性を有する新しいRasファミリー蛋白質である。HRasはいくつかのアミノ酸の点変異で恒常活性型となるが、ERasは最初から恒常活性型と考えられるアミノ酸配列を有しており、実際に大部分がGTP結合型であった。ERasをNIH3T3に導入すると形質転換を誘導した。一方、ES細胞においてERas遺伝子を欠損させると、分化多能性は維持されるが、増殖能は低下し、腫瘍形成能がほぼ消失した。したがってERasはES細胞における高い増殖能や腫瘍形成能の鍵を握る遺伝子であると考えられた(業績2)。

ERasはやはりRafファミリーに属するRas homolog enriched in brain (Rheb) といくつかの共通点を有している。ERasとRhebは共に高いGTP親和性を持ち、PI3 kinase経路において機能している。また、Rasタンパク質



が細胞膜に局在するために必要であるCAAXモチーフがコンセンサス配列と異なる点でも類似している。共焦点顕微鏡を用いた観察から、ERasは細胞膜に、Rhebは細胞内膜に局在していることがわかった。また、これらの局在はCAAXモチーフにおけるシステイン残基への変異導入やファルネシル基転移酵素阻害剤処理によって阻害された。Rasタンパク質の翻訳後修飾に関するRas-converting enzyme 1 (Rce1) またはIsoprenylcysteine carboxyl methyltransferase (Icmt) 欠損細胞において、ERasは主にゴルジ体に局在し、Rhebは細胞質へ拡散した。さらに、ERasはCAAXモチーフの上流に2つのシステイン残基を有しており、これらがパルミチン酸を付加されることが細胞膜局在に必須であることを変異体や阻害剤を用いた実験により明らかにした。RhebのC末端領域をHRasのC末端領域配列に置換したキメラタンパク質は細胞膜に局在したことから、Rhebが細胞膜に局在しない原因はCAAXモチーフの上流にシステイン残基が存在したためであると考えられた。以上の結果より、ERasは典型的なCAAXモチーフを持つHRas, NRasなどと同様の翻訳後修飾を受けて細胞膜に局在することがわかった。さらに、Rhebも同様の修飾を受けるがCAAXモチーフの上流にシステイン残基や塩基性残基を持たないために細胞膜に局在しないと結論付けた。

一方、Sox(SRY関連HMGボックス)ファミリー転写因子群は性決定遺伝子であるSryで最初に同定されたHMG(High mobility group)ドメインを有するタンパク質であり、細胞分化や形態形成に関与していることが知られている。マウス胚性幹(ES)細胞においてこれまでSox2が唯一発現しているSox遺伝子であると考えられていたが、私たちはECATの一つがSox15遺伝子であることを見出した。そこでSox15の機能解析およびSox2との機能比較を行った。In vitroの実験から、Sox15はSox2と同じDNA配列を認識するが結合能が低いことがわかった(図1)。また、Sox15はSox2のパートナー因子であるOct3/4と協調してSox2の標的遺伝子であるFgf4やFbx15などの遺伝子転写を活性化することも明らかにした。しかし、In vivoの実験ではSox2欠損胚が着床前後に致死となるのに対して、Sox15欠損胚は正常に発生し妊娠も有していた。またSox2欠損ES細胞は樹立できないが、Sox15欠損ES細胞は形態、増殖、分化能ともに正常であった。

さらにDNAマイクロアレーの結果、Sox15欠損細胞においてはNanog、Fgf4、Utf1などのSox2標的遺伝子は正常に発現していた。しかし、HrcやOtx2などの発現は有意に変化が認められた。Sox15はHrc遺伝子に結合するが、NanogなどのSox2標的遺伝子には結合しないことがわかった。また、Sox2はin vitroではHrc遺伝子に強く結合するが、in vivoでは結合していなかった。これらの結果から、Sox15はES細胞内においてはSox2とは異なる標的遺伝子群の発現調節を行っていると思われる。

〈国内外での成果の位置づけ〉

ES細胞での遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析し、特異的に発現する遺伝子を同定した研究を複数のグループが最近報告した (Science 298: 597-600, 2002, Science 298: 601-4, Genome Res. 12: 1921-8, 2002)。これらはDNAアレーやESTの大量収集の成果である。しかし彼らが報告した遺伝子の大部分を、私たちは3年前に公的データベースの解析により同定していた。そして直ちに遺伝子ノックアウトと過剰発現を中心とした機能解析を開始した。したがって私たちは他のグループより機能解析においてかなり先行していると考えられ、実際、NanogやERasといった極めて重要な遺伝子を世界に先駆けて発表することができた。

NanogはAffymetrixのDNAチップに含まれていたこともあり、私たち以外にも複数の研究室がその存在を把握していた。論文の報告後はさらに多くのグループが興味を持ち、Nanogの上流で作用する因子がいくつか同定されている。しかし、Nanogのパートナー蛋白質や下流因子(標的遺伝子)に関してはほとんどわかっていない。今後、これらを明らかにすることにより分化多能性の本質に迫ることができると期待できる。

一方、ERasはAffymetrixチップには含まれていなかったこともあり、Nanogのような競合はなかった。ERasはこれまでに調べたすべてのマウスES細胞で発現しているが、その由来であるブラストシストの内部細胞塊では発現が認められない。Nanogをはじめとする大部分のECAT遺伝子がES細胞と内部細胞塊の両方で発現するのと対照的である。ERasの発現調節機構を解析することにより、「ES細胞とは何か?」という根本的な問題に迫ることができると期待されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

同定したECAT遺伝子すべてのノックアウトを行う予定であったが、計画の半分程度しか達成することができなかった。遺伝子によって、ES細胞における相同組み換えの頻度がきわめて低かったことが一因である。また特異的に発現しているのにもかかわらず、ノックアウトしてもES細胞、初期発生ともに異常の観察されない遺伝子が複数あった。通常のノックアウトではクローンを選択するために長期にわたる薬剤選択を行い、本来その遺伝子が必須であっても、それを補充するメカニズムを獲得した細胞集団のみを選択している可能性がある。これを克服する一つの方法がRNAiにより急速な遺伝子機能抑制であるが、これまでのところES細胞におけるRNAiの効

果は、遺伝子発現の抑制率、特異性の両者ともに満足できるものではない。

〈今後の課題〉

大腸菌人工染色体(BAC)などの巨大DNAを改変し、ターゲティングベクターとして用いることにより、ES細胞における相同組換えの頻度を改善する必要がある。またES細胞における有効なRNAi法を確立する必要がある。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

1. Mitsui K., Tokuzawa Y., Itoh H., Segawa K., Murakami M., Takahashi K., Maruyama M., Maeda M. and Yamanaka S. The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. Cell 113: 631-642, 2003 論文データベース0601201039
2. Takahashi K., Mitsui K. and Yamanaka S. Role of ERas in promoting tumor-like properties in mouse embryonic stem cells. Nature 423: 541-545, 2003 論文データベース0601201046
3. Tokuzawa Y., Kaiho E., Maruyama M., Takahashi K., Mitsui K., Maeda M., Niwa H., and Yamanaka S. Fbx15 is a novel target of Oct3/4 but is dispensable for ES cell self-renewal and mouse development. Mol. Cell. Biol. 23: 2699-2708, 2003 論文データベース 0601201048
4. Taniguchi, M., Miura, K., Iwao, H., and Yamanaka S. Quantitative Assessment of DNA Microarrays - Comparison with Northern Blot Analyses. Genomics 71: 34-39, 2001 論文データベース 0202121514
5. 出願番号 02733265.9 PCT/JP02/05350
発明者：山中伸弥、海保英子
発明の名称：ES細胞特異的発現遺伝子
出願人：山中伸弥、住友製薬 出願日 2002年5月31日
6. 出願番号 PCT/JP2004/000790 発明者：山中伸弥
発明の名称：胚性幹細胞の自己複製決定因子
出願人：山中伸弥、住友製薬 出願日 2004年1月28日
7. 出願番号 533752 発明者：山中伸弥
発明の名称：新規な細胞増殖促進剤
出願人：山中伸弥、住友製薬 出願日 2004年10月4日