

## 転写因子 Hes1 の発現振動による ES 細胞の分化調節機構

京都大学 ウイルス研究所 小林妙子 (Taeko Kobayashi)

影山龍一郎 (Ryoichiro Kageyama)

Institute for Virus Research, Kyoto University

### 1、背景

着床前初期胚の内部細胞塊(inner cell mass)から樹立された胚性幹(ES)細胞は、あらゆる細胞に分化する能力を持ち、個体発生や細胞分化を研究する重要なツールとして利用されている。また、試験管内で分化誘導した細胞を用いた再生医療への応用が期待されている。しかし、ES 細胞はそれぞれの細胞がばらばらの方向に分化する傾向があり、遺伝的背景が同じ細胞株であっても個々の細胞の挙動を制御しにくい。この様な ES 細胞の分化の不均一性がどのようなメカニズムで作られ、どのように維持されているのかは、ほとんど分かっていなかった。

### 2、マウス ES 細胞での Hes1 の発現振動

bHLH 転写因子ファミリーに属する抑制型の転写因子 Hes1 は、自らの発現を抑制する負のフィードバックループを形成している (図 1)。これまでに繊維芽細胞等において血清刺激により発現を誘導すると、自律的に二時間周期の発現振動を示すことが明らかになっていた (1)。

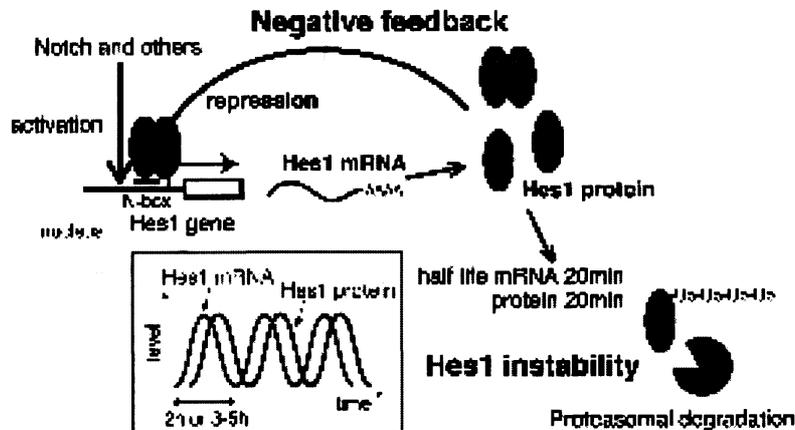


図 1 Hes1 遺伝子産物の発現振動のモデル

我々は、ES 細胞においても Hes1 の発現振動が見られるかどうかを検討した。Hes1 は ES 細胞において豊富に発現しており、ES 細胞の未分化性の維持に必須である Leukemia Inhibitory Factor(LIF), Bone morphogenetic protein(BMP)によって、誘導されていることがわかった。次に、発光タンパク質であるルシフェラーゼを使って Hes1 の発現動態を可視化した結果、Hes1 は、個々の ES 細胞内で 3-5 時間の周期で発現振動していることが分かった (図 2) (2)。

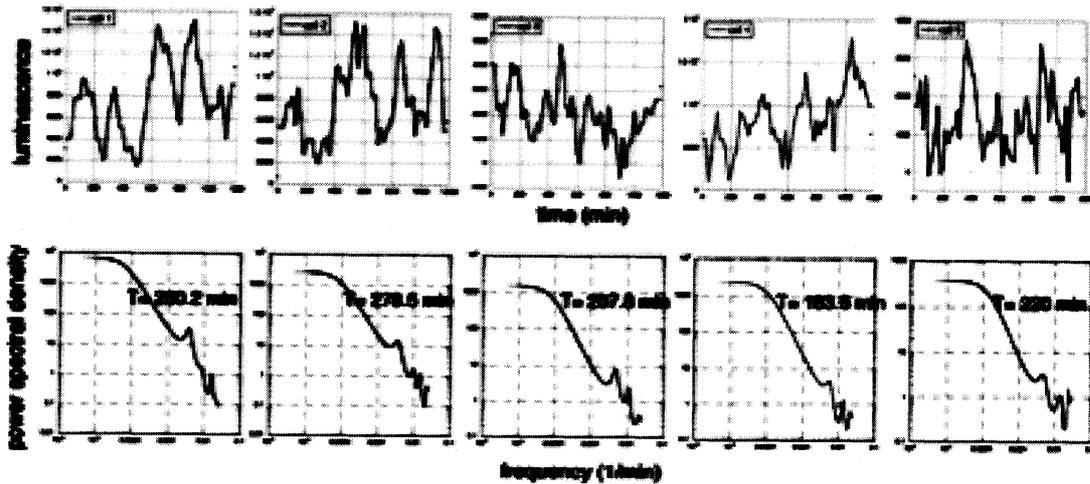


図 2 Hes1 の発現振動のプロット (上段) と周期解析結果 (下段)

### 3、ES 細胞での Hes1 発現振動の機能

Hes1 は転写因子であり、細胞内で下流遺伝子の発現を抑制している。ES 細胞において、Hes1 の発現振動がどのような機能を持つのかを明らかにするために、Hes1 の下流遺伝子を網羅的に調べた。その結果、Hes1 は、分化促進型の転写因子群、細胞周期の進行を抑制する因子、神経分化に機能する Notch シグナルのリガンド等の遺伝子の転写を抑制していることがわかった。これらの結果は Hes1 の発現振動が ES 細胞の分化能力を制御している可能性を示唆する。そこで、蛍光タンパク質である Venus を利用して、Hes1 の発現レベルを蛍光で追跡できる細胞株を作製した。セルソーターを用いて、Hes1 の発現レベルが高い細胞と低い細胞を分離して、それぞれの分化能力を比較した。その結果、Hes1 タンパク質の発現が高い細胞は初期中胚葉に、発現が低い細胞は神経に分化する傾向が明らかになった (図 3) (2)。

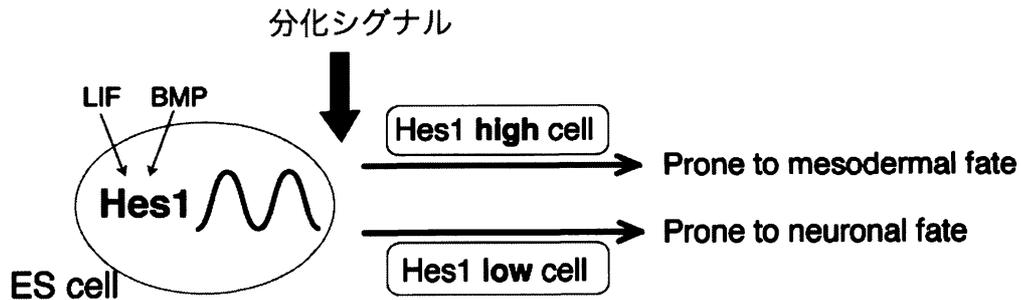


図3 Hes1 の発現振動と分化。分化誘導の開始時に、Hes1 レベルの高い細胞は初期中胚葉に、Hes1 レベルの低い細胞は神経系に分化しやすい。

次に、Hes1 の発現を失った Hes1 ノックアウト ES 細胞株、並びに Hes1 を常に高発現する ES 細胞株を作成し、神経系への分化誘導を行った。その結果、Hes1 ノックアウト細胞は非常に高い効率で、野生型よりも均一に神経系に分化した(2)。一方、Hes1 を常に高発現する ES 細胞株では、Notch シグナルが抑制されており、神経系への分化誘導条件でも神経へ分化せず、初期中胚葉へ分化した(3)。以上の結果から、ES 細胞内の Hes1 の発現レベルによって、Notch シグナルの ON/OFF が制御されていることが分かった。また、人為的に Hes1 の発現レベルを低レベルに調節しておくこと、より純粋な神経細胞を分化誘導できることも分かった。

#### 4、考察

Hes1 の発現のリズムは、様々な分化能力をもつ ES 細胞を作りだし、幹細胞の不均一な分化に寄与していた。同じ遺伝的背景を持つ細胞であっても、遺伝子発現のリズムを利用することによって、より多様でより多彩な成熟細胞へと分化することができるのかもしれない。

#### 参考文献

- 1) Hirata, H. et al. : *Science* **298** : 840-843, 2002.
- 2) Kobayashi, T. et al. : *Genes & Dev.* **23** : 1870-1875, 2009.
- 3) Kobayashi, T and Kageyama, R. : *Genes Cells* **15** : 689-698, 2010.