

マウス ES 細胞の心筋分化における  
BTB ジンクフィンガータンパク質 CIBZ  
の機能解析

幸得 友美  
奈良先端科学技術大学院大学  
バイオサイエンス研究科 機能ゲノム医学研究室  
(石田 靖雅 准教授)

平成 29 年 1 月 10 日提出

# 目次

	ページ番号
1. 略語表.....	3
2. 序論.....	4
3. 材料と方法.....	8
4. 結果.....	16
4.1 マウス ES 細胞の分化誘導に伴って CIBZ タンパク質の発現が減少する	
4.2 CIBZ が欠損した ES 細胞の分化では中胚葉と前心臓中胚葉マーカーの発現 が上昇する	
4.3 CIBZ の欠損は ES 細胞から心筋細胞への分化を促進する	
4.4 CIBZ の欠損により ES 細胞の心筋細胞分化を促進する転写因子群の発現が 上昇する	
4.5 CIBZ の過剰発現により ES 細胞の心筋細胞分化を促進する転写因子群の発 現が低下する	
4.6 CIBZ の過剰発現が ES 細胞の心筋細胞へ分化を抑制する	
4.7 CIBZ は <i>T</i> と <i>Mesp1</i> のプロモーター領域に結合する	
4.8 CIBZ による <i>T</i> と <i>Mesp1</i> プロモーター領域への結合は DNA メチル化非依存 的であることが示唆される	
4.9 CIBZ は <i>T</i> と <i>Mesp1</i> のプロモーターを抑制する	
4.10 CIBZ による <i>T</i> と <i>Mesp1</i> の抑制には zinc finger (ZF) 1-5 が必要である	
5. 考察.....	22
5.1 ES 細胞から心筋細胞へ分化における CIBZ の役割	
5.2 CIBZ による <i>T</i> と <i>Mesp1</i> の転写制御	
5.3 CIBZ の ES 細胞から心筋細胞への分化に関わるシグナリング	
5.4 ES 細胞の分化に伴う CIBZ タンパク質の発現低下	
6. 図表.....	25
7. 謝辞.....	48
8. 参考文献.....	49

## 1. 略語表

5-azacytidine (5-aza-dC)

Brachyury (T)

Cardiac crescent (CC) : 心臓原基

Cardiac Troponin (cTnI)

CtBP-interacting BTB zinc finger protein (CIBZ)

Definitive endoderm (DE) : 原始内胚葉

Embryonic stem cells (ES 細胞)

Embryoid body (EB) : 胚葉体

First heart field (FHF) : 第一心臓予定領域

Goosecoid (Gsc)

Leukemia inhibitory factor (LIF)

Myosin heavy chain (MHC)

Primitive streak (PS) : 原始線条

Second heart field (SHF) : 第二心臓予定領域

Transcript start site (TSS) : 転写開始点

Visceral endoderm (VE) : 蔵側内胚葉

## 2. 序論

### マウス ES 細胞の未分化性維持における転写因子の機能

マウス胚性幹細胞 (Embryonic stem cell, 以下は ES 細胞と記す) は初期胚の内部細胞塊から樹立された多能性の幹細胞であり、その未分化性の維持には白血病阻害因子である LIF (leukemia inhibitory factor) シグナルによる Stat3 の活性化が必要である (Niwa et al, 1998)。主に 3 つの転写因子 Oct3/4、Sox2、Nanog が協調的に働くことで ES 細胞の多能性を維持している (Loh et al., 2011) (図 1)。

1) POU ドメインを有する Oct3/4 は ES 細胞や始原生殖細胞などの未分化な細胞に特異的に発現している。Oct3/4 を欠損させた ES 細胞では未分化性を維持できず、栄養外胚葉へと分化し、逆に過剰発現させると原始内胚葉や中胚葉へと分化する (Niwa et al., 2000)。従って、未分化な状態を維持するためには、Oct3/4 の厳密な発現調節が必須である。

2) Sry ボックスドメイン有する Sox2 は ES 細胞以外に、発生段階のエピブラストや胚体外胚葉において発現している。Sox2 変異マウスはエピブラストの形成不全が見られることから、エピブラストの形成・維持に Oct3/4 と協調して機能していることが知られている (Avilion et al., 2003)。

3) ホメオボックスを有する Nanog は内部細胞塊で特異的に発現しており、Nanog を欠損させた ES 細胞では原始内胚葉へと分化する。逆に ES 細胞で Nanog を過剰発現させると LIF 非存在下でも多能性を維持できることが報告されている (Chambers and Smith., 2004)。

### マウス ES 細胞の分化誘導研究

ES 細胞は外胚葉、中胚葉、内胚葉由来のすべての細胞系列へ分化することが可能である。1998 年に James A. Thomson らにより、ヒト ES 細胞が樹立されて以来、再生医療や新薬開発の応用に向けて、ヒトやマウス ES 細胞を用いた分化誘導研究が盛んに行われてきた。マウス ES 細胞はヒト ES 細胞と比べ使用面での障壁 (倫理面の問題や継代維持、入手が容易であることなど) が少ないため分化誘導研究が進んでおり、ヒト ES 細胞での分化誘導研究はマウスで開発された分化誘導法を参考にすることが多くある。これまでに ES 細胞から心筋細胞、神経細胞、色素や血球系細胞などへ分化誘導した研究が多数報告されている (Fischbach et al., 2004)。また、ES 細胞からの様々な細胞への分化誘導過程において、マウス胚発生過程と同様の遺伝子シグナル伝達系を用いていることが明らかとなっている (Cyganek et al., 2013)。そのため、細胞運命決定に関わる遺伝子の発現制御機構を解析する上でも非常に強力なツールの一つである。今後、ES 細胞の分化誘導における遺伝子発現ネットワークを研究することは、将来的な再生医療での応用という観点のみならず、胚発生機構の解明という学

術的な観点からも重要と考えられる。

## 心臓の初期発生

心筋は一度傷害をうけると新たに再生しにくい細胞であるため、心筋梗塞や心筋症などによる心機能の低下に対する根本的な治療法は心臓移植に頼るのが現状である。近年、iPS 細胞の作製により再生医療実現に向けた心筋再生研究が脚光を浴び始めてきた。

心臓は胚発生過程で特定のシグナルを受けて中胚葉から分化誘導される、最初に形成される臓器である。これまでにマウス胚やマウス ES 細胞を用いた細胞運命決定の研究から、徐々にその複雑な発生過程の様子が明らかにされてきた。心臓構成細胞は、原腸陥入の過程で形成される原始線条 (primitive streak; PS) の領域で、その存在が最初に確認されている。エピブラストの一部の細胞集団が PS 領域を胚の内側から外側方向へと移動し、最終的に中胚葉へと分化しながら臓側内胚葉 (visceral endoderm; VE) と原始内胚葉 (definitive endoderm; DE) の間を伸展していく。このとき、最も腹側の中胚葉細胞集団である側板中胚葉 (lateral mesoderm) が将来、心臓・血管・血液細胞へと分化する心臓構成細胞である (Vliet et al., 2012)。側板中胚葉の集団は、胚性 7 日目に頭側心臓中胚葉 (cranial cardiac mesoderm) と前側方中胚葉 (anterior mesoderm) へと派生し、胚性 8 日目には心臓構成細胞の集団である馬蹄形の心臓原基 (cardiac crescent) を形成する (図 2)。この移動の際に Nodal、BMP2/4 と Wnt の 3 つのシグナルがそれぞれ時空間特異的にシグナル伝達を行うことが正常な心臓発生に重要である。心臓原基は 2 種類の細胞集団: Tbx5 陽性の細胞集団である第一心臓予定領域 (First heart field; FHF) と、Islet1 陽性の細胞集団である第二心臓予定領域 (Second heart field; SHF) から構成される。FHF は将来的に左心室と心房を形成し、SHF は右心室や流出路を形成することが明らかとなっている (Srivastava et al., 2006)。

## ES 細胞からの心筋細胞分化の過程で機能する転写因子

ES 細胞から心筋細胞への分化誘導方法として、最も一般的な方法は LIF 非存在下での浮遊培養による胚葉体の形成である。胚葉体は外胚葉、中胚葉、内胚葉の分化した細胞集団からなる球状の細胞塊である。心筋細胞の分化には外胚葉・内胚葉から分泌される BMP2/4 や Nodal、Wnt などのシグナル因子が必須であるため、胚葉体の形成は心筋細胞分化において必要なステップとされる。Wnt シグナルにより中胚葉遺伝子の Brachyury (T) や Eomes の発現が誘導され、次にこれらの転写因子が初期心臓中胚葉遺伝子である Mesp1 や Flk1 を直接誘導する (Costello, et al., 2011, and Lindsley et al., 2006)。これまでにマウス遺伝学を用いた細胞系譜追跡や ES 細胞の分化誘導系より、Mesp1 陽性細胞は心筋、心内膜、心外膜、内皮などほぼ全ての心臓を構成する細胞へと分化することが明らかとなっている (Saga et al., 1999) (図 3A)。また、Mesp1 を過剰発現させた ES 細胞の実験では、Wnt シグナルがなくても心筋への誘導が引き起こされるため、Mesp1 は心血管細胞系譜のマスター遺伝子と考えられている

(Blanpain et al., 2010)。Mesp1 により直接的に制御される遺伝子群は Nkx2-5、Gata4、Mef2c などがあり、いずれも心筋分化に必須とされる転写因子である (図 3B)。

### 心臓再生とリプログラミング因子の同定

近年、マウス新生仔では高い心筋再生能力があることが放射性同位体 N15 で標識されたチミジンの核内取り込みにより証明された (Senyo et al., 2013)。さらに、ヒトにおいても冷戦時の核実験試験から放射性同位体 C14 を指標にして、標準的なヒトの生涯において平均 50%程度の心筋細胞が新陳代謝により新たに生み出されることが報告されている (Bergmann et al., 2009)。このことから、限定的ではあるが哺乳類の心臓においても再生能力があることが示された。一方で、心筋梗塞などによる急激な心筋細胞の減少は、本来の心筋再生能で十分な心筋細胞が補えず、結果として心機能の低下が引き起こされる。この際、心筋細胞は壊死し線維芽細胞の増殖により場所を取って替わられる。このため、線維芽細胞を心筋細胞へリプログラミングさせる研究が近年盛んに行われている。2009 年には竹内らにより 2 つの心臓転写因子 Gata4 と Tbx5、さらに SWI/SNF クロマチンリモデリング複合体の一因子 Baf60c を心臓形成予定領域外であるマウス胚外中胚葉細胞へ強制発現させることで、自発的に拍動する心筋細胞への分化転換が成功している (Takeuchi et al., 2009)。また、*in vitro* の研究より 3 つの心臓転写因子 Gata4、Mef2c、Tbx5 を線維芽細胞中に発現させることで、線維芽細胞を心筋細胞へリプログラムできることが報告されている (Ieda et al., 2010)。これらの報告は、心臓・心筋再生には心臓形成過程で働く転写因子群やエピジェネティックな制御因子であるクロマチンリモデリング複合体が非常に重要な役割を担っていることを示している。そのため今後、心臓・心筋が誘導される際に機能する心臓転写因子のさらなる詳細な解析が必要とされる。

### 発生・分化における BTB zinc finger 型転写因子の機能

個体の発生や分化、増殖など生物機能を維持する上で、転写因子による遺伝子発現の制御は重要な機能の一つである。転写抑制の機能を有する BTB zinc finger 型転写因子 (Bcl-6、PLZF、Kaiso など) は現在までに 200 以上ものファミリータンパク質が知られている。この転写因子に特徴的な BTB ドメインは酵母からヒトまで進化的に高く保存されており、二量体形成やコリプレッサーとの結合などタンパク質間相互作用を調節する機能を有する (Collins et al., 2001)。BTB zinc finger 型転写因子の機能としては、細胞周期調節や DNA ダメージ応答、細胞運命決定などが報告されている (Yeyati et al., 1999, and Cho et al., 2011)。その中で、個体の発生や分化では Bcl-6 と PLZF の研究が進んでいる。

Bcl-6 はメモリーB細胞が形成される胚中心において、ヒトBリンパ腫の染色体転座部位から単離されたがん遺伝子であり、標的遺伝子の転写抑制活性を有している (Shaffer et al., 2000)。メモリーB細胞の分化において、胚中心のB細胞がBcl-6を発現することにより、形質細胞分化に必須であるBlimp-1の発現を負に制御し、メモリ

一細胞への分化を促進する。PLZF は急性前骨髄球性白血病患者の染色体転座 t(11;17) より同定された転写抑制因子である (Chen S.J. et al., 1993)。HL60 細胞を用いた血球分化過程において、PLZF の発現レベルが下方制御を受けることから、PLZF の発現が造血幹細胞の維持や生存に重要であると考えられている (Chen Z. et al., 1993)。これらの知見は、BTB zinc finger 型転写因子が個体発生・細胞分化過程において重要な機能を果たしていることを示唆するものである。

### 転写因子 CIBZ (CtBP-interacting BTB zinc finger protein) の機能

当研究グループはマウス ES 細胞を用いた改良型 polyA トラップ法より、新規の BTB zinc finger タンパク質をコードする遺伝子 *CIBZ* を同定した (Matsuda et al., 2004)。*CIBZ* はマウス ES 細胞や成体マウス組織においてユビキタスに発現することが確認された。先行研究から、*CIBZ* は N 末端側に 2 つの転写抑制ドメイン (BTB ドメインと Repression Domain2; RD2) を持つこと、RD2 は PLDLR というモチーフを介してヒストン修飾酵素のリクルータータンパク質であるコリプレッサーの CtBP と相互作用することが分かっている (Sasai et al., 2005)。*CIBZ* の中央部と C 末端側には 2 つのジンクフィンガークラスター (ZF1-5 と ZF6-10) があり、そのうち中央部の ZF3-5 ではメチル化 CpG と結合できることが明らかにされた (Oikawa et al., 2011) (図 4)。これまでに *CIBZ* は、①アポトーシスを負に制御する機能 (Oikawa et al., 2008)、②骨格筋分化決定因子である *myogenin* のプロモーターをメチル化依存的に抑制することで、骨格筋分化を負に制御する機能が明らかにされた (Oikawa et al., 2011)。興味深いことに、ES 細胞で高発現している *CIBZ* は、ES 細胞の自己複製能を '正' に制御する *Nanog* タンパク質を介して細胞増殖を促進することが明らかとなった (Nishii et al., 2012) (図 5)。以上ことから、*CIBZ* は細胞のアポトーシス、分化と増殖という生命現象の中で重要な役割を担っていることが分かってきた。一方で、ES 細胞分化における *CIBZ* の機能は不明である。

### 本研究の目的

先行の研究より、*CIBZ* の発現変化 (欠損、発現低下、過剰発現) は ES 細胞の未分化性維持に必須ではないが、*CIBZ* が欠損した ES 細胞は細胞の増殖が低下していることが分かった (Nishii et al., 2012)。ES 細胞の増殖低下が ES 細胞の未分化性を不安定な状態へと遷移させることで分化しやすいということが知られている (Chambers et al., 2007)。本研究の目的は、*CIBZ* が ES 細胞の分化にどのような影響を与えるかを明らかにした上で、その制御のメカニズムの解明を目指す。

### 3. 材料と方法

#### プラスミド

pcDNA3-2xFlag-CIBZ と pBSKS-2xFlag は前任者によりすでに作製されたベクターを用いた。EF1 $\alpha$ -2xFlag-CIBZ-IRES-AcGFP1 を作製するため、プライマー F (CIBZ-F1-SalI) 5'-ACGCGTCGACATGACAGTCATGTCCCTCTCCAG-3' とプライマー R (CIBZ-R3594-BamHI) 5'-CGCGGATCCTCAAAGGACGTTTTTCAGCAAAGGC-3' を用いて pcDNA3-2xFlag-CIBZ を鋳型として増幅した。この PCR 断片を SalI と BamHI で消化し、同じく SalI/BamHI で消化した EF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP1 (Clontech) ベクターに組み込んだ。コントロールとなる EF1 $\alpha$ -2xFlag -IRES-AcGFP1 は pBSKS-2xFlag を SalI と BamHI で消化し、上記と同様に EF1 $\alpha$ -IRES-AcGFP1 ベクターに組み込み作製した。レポーターベクターとして用いた pGL3-*Brachyury(T)* promoter と pGL3-*Mesp1* promoter 挿入ベクターは、プライマー F (T) 5'-AGACGACGCGTCAAAGTCGCAGGCGCCGGTGTG-3' とプライマー R (T) 5'-GTCCCAAGCTTCCACCCTCTCCACCCTTCCAG-3'、とプライマー F (Mesp1) 5'-AGACGACGCGTCAAAGGCTCTGGTATGTGAAGTAAGG-3'、プライマー R (Mesp1) 5'-GTCCCAAGCTTGGCAGCGGAGGCCTGACCATTG-3' を用いて、マウス ES 細胞のゲノム DNA から各遺伝子のプロモーター領域を増幅した。この PCR 断片を pGEM-basic に組み込み、MluI/HindIII で消化し、切り出した各遺伝子プロモーターを pGL3-basic ベクターに組み込み作製した。CIBZ 各種欠失変異体はすでに前任者により作製されたベクターを用いた (Sasai, Matsuda *et al.* 2005)。全てのプラスミドシーケンス配列は BigDye terminator v3.1 と ABI PRISM3100 によって確認した。

#### ES 細胞の培養

ES 細胞は RF8 (129SV/ Jae マウスに由来する) 細胞を用いた。ES 細胞の継代維持にはサイトカイン LIF を産生する SNL 細胞をフィーダー細胞として使用した。SNL 細胞はマウス胎児繊維芽細胞由来の株化細胞である STO 細胞に、ネオマイシン耐性遺伝子と LIF 遺伝子発現ベクターを組み込んだ細胞である。SNL 細胞の培養には、あらかじめディッシュを 0.1% ゼラチン (porcine skin 由来: Sigma) 溶液でコーティングしたものを用いた。また、フィーダー細胞として用いる際は、SNL 細胞を 11  $\mu$ g/ml のマイトマイシン C (協和発酵キリン) を含む培地で 2 時間 30 分処理することで、細胞増殖を不活性化した。このフィーダー細胞上で ES 細胞は 5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C の条件の下、培養を行った。



#### [ES 細胞の培地組成]

Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nacalai tesque)	最終濃度
Fetal Bovine Serum (Thermo scientific)	15%
Penicillin-Streptomycin (Nacalai tesque)	50 units/ml
100x MEM Nonessential amino acids solution (Nacalai tesque)	1x
L-Glutamine stock solution (Nacalai tesque)	2 mM
2-mercaptoethanol (Nacalai tesque)	100 $\mu$ M

#### [SNL 細胞の培地組成]

Dulbecco's Modified Eagle Medium (Nacalai tesque)	
Fetal Bovine Serum (Thermo scientific)	10%
Penicillin-Streptomycin (Nacalai tesque)	50 units/ml
L-Glutamine stock solution (Nacalai tesque)	2mM

#### 胚葉体 (EB) 形成アッセイと心筋細胞への分化

胚葉体 (EB: Embryoid Body) 形成アッセイでは、まず 0.1% ゼラチンコーティングディッシュでフィーダー細胞を取り除いた後、 $2 \times 10^6$  cells/ml の ES 細胞懸濁液を調整した。この懸濁液 10ml を低吸着性のペトリディッシュに添加し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、37°C の条件の下にて、40 rpm 回転速度のロータリーシェーカー (NS-LR, AS ONE) 上で培養した (Rotary 細胞培養法)。5 日間浮遊培養を行った後、0.1% ゼラチンでコーティングした 24 ウェルプレートへ EB を接着させることで、自発的に拍動する心筋細胞が得られた。ES 細胞から EB を形成させて、心筋細胞へ分化誘導する各分化段階の EB を回収し、遺伝子発現・タンパク質発現解析用のサンプルとした。EB 形成アッセイで用いた培地は ES 細胞培地と同じものを用いた。EB を接着培養に切り替えた後は、2-mercaptoethanol を除いた ES 細胞培地を用いた。

#### CIBZ が安定的に過剰発現した ES 細胞株の作製

EF1 $\alpha$ -2xFlag-IRES-AcGFP1 (コントロール) と EF1 $\alpha$ -2xFlag-CIBZ-IRES-AcGFP1 を AseI で切断し、線状化したプラスミドを作製した。ES 細胞を  $2.5 \times 10^7$  cells/ml になるように ES 細胞培地を加えて懸濁し、0.8 ml を電ポレーション用キュベットに移し、250 V、500 mF で線状化した上記の各々のプラスミド (15  $\mu$ g) を ES 細胞に導入した。ベクター導入後、室温で 15 分間 ES 細胞を静置し、10 cm dish のフィーダー細胞上で 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。24 時間後、0.4 mg/ml G418 (InvivoGen) で薬剤選択を 9 日間行い、GFP の蛍光が観察された G418 耐性コロニーを単離、継代して細胞数を増やし、CIBZ 過剰発現細胞株を樹立した。

## siRNA により CIBZ をノックダウンした ES 細胞の作製

CIBZ に特異的な Dicer substrate siRNA (Integrated DNA Technologies) を野生型 ES 細胞に INTERFERin™ (Polyplus Transfection™) を用いて添付のマニュアルに従ってトランスフェクションし、一過性に CIBZ の発現をノックダウンした。トランスフェクションの 72 時間後に ES 細胞を回収して EB 形成アッセイに用いた。siRNA の配列を以下に示す。

### CIBZ siRNA

sense sequence            5'-phospho-GCGGACCACAUGGUGAAAUUUGUdGdA-3'  
antisense sequence        5'-UCACAAAUUUCACCAUGUGGCCGCGU-3'

## 半定量 RT-PCR とリアルタイム PCR (qPCR) による mRNA の発現解析

### 1) サンプルの回収

ES 細胞の分化誘導過程で回収した EB サンプルをコラゲナーゼ Type II (Worthington 社) 溶液で 37°C、20 分間反応し、細胞を分散させて回収した。

[Low Ca <sup>2+</sup> Solution の組成]	最終濃度	[コラゲナーゼ Type II 溶液の組成]	最終濃度
5M NaCl	120 mM	Low Ca <sup>2+</sup> Solution	
1M KCl	5.4 mM	25000U/ml collagenase type II	500 U/ml
1M MgSO <sub>4</sub>	5 mM	1 mM CaCl <sub>2</sub>	30 μM
100 mM Sodium pyruvate	5 mM		
1M Glucose	20 mM		
200 mM Taurine	20 mM		
1M HEPES (pH 6.9)	10 mM		

### 2) RNA 回収、cDNA 合成、PCR 反応

Total RNA の抽出は ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega) を使用した。cDNA の合成は ReverTra Ace® qPCR RT Kit (Toyobo) を使用した。qRT-PCR のサンプル調整は Thunderbird qPCR Mix (Toyobo) を用いて行った。これらすべての手順は付属のプロトコールに従った。qRT-PCR は LightCycler 96 System (Roche) を使用し、反応条件は (i) 95°C, 60 sec、(ii) 40× (95°C, 15 sec; 55°C, 30 sec; 72°C, 30 sec) で行った。内在性コントロールとして GAPDH を用い、標的遺伝子の転写レベルの補正を行った。

[使用したプライマー]

Semi-quantitative RT-PCR 用プライマー

CIBZ

5' - GCACAGACAGTTCTATCCCA-3' (Forward)

5' - GCTCTGACATAGCATCATCC-3' (Reverse)

GAPDH

5' - CCATCACCATCTTCCAGGAG-3' (Forward)

5' - CCTGCTTACCACCTTCTTG-3' (Reverse)

Oct3/4

5' - TCACTCACATCGCCAATCAG-3' (Forward)

5' - CCTGTAGCCTCATACTCTTCTC-3' (Reverse)

Sox2

5' - CTACAGCATGTCCTACTCGC-3' (Forward)

5' - CCTCCCAATTCCCTTGTATCTC-3' (Reverse)

Nanog

5' - TTCAGAAATCCCTTCCCTCG-3' (Forward)

5' - AGTAGCAGACCCTTGTAAGC-3' (Reverse)

Sox1

5' - ATACCGCAATCCCCTCTCAG-3' (Forward)

5' - ACAACATCCGACTCCTCTTCC-3' (Reverse)

Nestin

5' - CTGGAAGTGGCTACATACAGGAC-3' (Forward)

5' - AGTCTCAAGGGTATTAGGCAAGG-3' (Reverse)

T

5' - GAAGTGAAGGTGGCTGTTGG-3' (Forward)

5' - ATTTACCTTCAGCACCGGGA-3' (Reverse)

Tbx2

5' - GACATCTTGAAGCTCCCATACAG-3' (Forward)

5' - GCTCCTCATACAAACGGAGAGT-3' (Reverse)

Mesp1

5' - GTCTGCAGCGGGGTGTCGTG-3' (Forward)

5' - CGGCGGCGTCCAGGTTTCTA-3' (Reverse)

Gata6

5' - GGGAGAACTGTGACAATGAC-3' (Forward)

5' - ACGAACGCTTGTGAAATGTG-3' (Reverse)

Sox17

5'- CGAGCCAAAGCGGAGTCTC-3' (Forward)

5'- TGCCAAGGTCAACGCCTTC-3' (Reverse)

Flk1

5'- TCGAGCCCTCATGTCTGAAC-3' (Forward)

5' - CACTGAGCGATTTCTCCTCAAC-3' (Reverse)

Gata4

5'- GTGAGCCTGTATGTAATGCC-3' (Forward)

5'- CTGTGCCCATAGTGAGATGAC-3' (Reverse)

cTnI

5'- TGCCAACTACCGAGCCTATG-3' (Forward)

5'- TGGCAACGAGTCCTCAGAAC-3' (Reverse)

Quantitative PCR 用プライマー

GAPDH

5'- CAATGTGTCCGTCGTGGATCT-3' (Forward)

5'- GTCCTCAGTGTAGCCCAAGATG-3' (Reverse)

I

5'- GCTTCAAGGAGCTAACTAACGAG-3' (Forward)

5'- CCAGCAAGAAAGAGTACATGGC-3' (Reverse)

Flk1

5' - CTGGAGCCTACAAGTGCTCG-3' (Forward)

5' - GAGGTTTGAAATCGACCCTCG-3' (Reverse)

Mesp1

5' - GTCTGCAGCGGGGTGTCGTG-3' (Forward)

5' - CGGCGGCGTCCAGGTTTCTA-3' (Reverse)

Nkx2.5

5' - GGTCTCAATGCCTATGGCTAC-3' (Forward)

5' - GCCAAAGTTCACGAAGTTGCT-3' (Reverse)

Gata4

5' - AACGGAAGCCCAAGAACCTG-3' (Forward)

5' - AGTGGCATTGCTGGAGTTACC-3' (Reverse)

Tbx5

5' - AATGGTCCGTAAGTGGCAAAG-3' (Forward)

5' - GGATAATGTGTCCAAACGGGTC-3' (Reverse)

### Isl1

5' - ATGATGGTGGTTTACAGGCTAAC-3' (Forward)

5' - TCGATGCTACTTCACTGCCAG-3' (Reverse)

### Mef2C

5' - AGGATAATGGATGAGCGTAACAG-3' (Forward)

5' - GTTCAATGCCTCCACAATGTC-3' (Reverse)

### cTnI

5' - TGCCAACTACCGAGCCTATG-3' (Forward)

5' - TGGCAACGAGTCCTCAGAAC-3' (Reverse)

### MHC

5' - CAGAGGAGAAGGCTGGTGTC-3' (Forward)

5' - TTGTCAGCATCTTCTGTGCC-3' (Reverse)

## ウェスタンブロッティング

回収した細胞に RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH7.4, 150 mM NaCl, 1% NP-40, 0.1% Sodium dodecyl sulphate, 0.5% Sodium deoxycholate, protease inhibitor cocktail (Roche)) を加え、超音波処理により溶解させた。氷上で 20 分間インキュベーションさせてから、4°C、15000 回転、20 分間の遠心分離により不溶性画分を取り除いた。得られた可溶性画分に 5×SDS sample buffer を加え、95°C、5 分間のインキュベーションによりタンパク質を変性させて、SDS-PAGE のサンプル溶液とした。SDS-PAGE 後に、ゲルと 6 枚のろ紙 (No.590, Advantec) を 1×Transfer buffer (25 mM Tris, 192 mM Glycine) に浸した。PVDF メンブレン (Millipore) は 100% メタノールに浸したのち、1×Transfer buffer に浸した。セミドライタイプの転写装置 (日本エイドー) に、下からろ紙 3 枚、PVDF メンブレン、ゲル、ろ紙 3 枚の順に重ね、12 V、1 時間ブロッティングを行った。5% skim milk でメンブレンをブロッキングした後、0.05% Tween20 を含む 1×PBS (PBST) で洗浄し、一次抗体で室温の下、1 時間インキュベーションした。PBST で洗浄後、二次抗体で同じく 1 時間インキュベーションした後、ECL<sup>TM</sup> prime western blotting detection reagent (GE Healthcare) を用いてタンパク質の検出を行った。

## 抗体

抗 CIBZ ラビットポリクローナル抗体 (C2) はマウス CIBZ のアミノ酸配列 1184-1197 (EQKDDIKAFAENVL) に対応する KLH が付加されたペプチドを抗原として作製された (JBios)。ウェスタンブロッティングと免疫染色には一次抗体として、抗 CIBZ 抗体 (C2)、抗 FLAG 抗体 M2 (Sigma-Aldrich)、抗  $\alpha$ -Tubulin 抗体 (Sigma)、抗 Oct3/4 抗体 (R&D Systems)、抗 Sox2 抗体 (Sigma-Aldrich)、抗 Nanog 抗体 (Millipore)、抗 Brachyury 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Nkx-2.5 (Santa Cruz Biotechnology)、抗 Islet1 抗体 (Abcam)、抗 MHC 抗体 (Development Studies Hybridoma Bank)、抗 Cardiac Troponin I 抗体 (Abcam) を用いた。二次抗体として、HRP を付加した抗マウス IgG

抗体 (GE Healthcare)、抗ラビット IgG 抗体 (GE Healthcare)、Alexa488 抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen) を用いた。

### 免疫蛍光染色

0.1 % ゼラチンでコーティングしたカバーガラス上に EB を接着させ、心筋細胞への分化誘導を行った。自発的な拍動が観察された EB のカバーガラスを 24 ウェルプレートに移し、4% PFA/PBS で 15 分間固定した。0.2% TritonX-100/PBS を用いて透過処理をした後、一次抗体および二次抗体、及び DAPI (Sigma-Aldrich) による核染色を行った。封入剤で封入した後、共焦点レーザー顕微鏡 (Zeiss LSM510) で観察した。

### クロマチン免疫沈降法

フィーダー細胞を取り除いた ES 細胞にホルムアルデヒドを 1 % になるように加えて、30 分間室温でインキュベーションし、DNA とタンパク質の架橋を行った。その後、グリシンを最終濃度 125 mM になるように加えて架橋反応を止め、PBS で 2 回洗浄して細胞を回収した。核画分を抽出するため、Swelling buffer (25 mM HEPES、1.5 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM KCl、0.1 % NP-40、1 mM dithiothreitol、1 mM PMSF、pH 7.8、protease inhibitor cocktail (Roche)) で溶解し、遠心分離により核画分を沈殿させ、Nuclei lysis buffer (50 mM Tris-HCl、10 mM EDTA、1 % SDS、1 mM PMSF、pH 8.0、protease inhibitor cocktail) に溶解し、氷上で 10 分間インキュベーションした。ソニケーション処理後、4°C、15000 回転、15 分間、遠心分離を行い、回収した上清を再度 38 μm のナイロンフィルターネットで濾過することで不溶性画分を取り除いた。ChIP Dilution buffer (10 mM Tris-HCl、300 mM NaCl、0.5 % SDS、5 mM EDTA、1 mM PMSF、pH 8.0、protease inhibitor cocktail) で 10 倍希釈し、Protein G Sepharose 4 (GE Healthcare) と 10 mg/ml salmon sperm DNA (終濃度 100 μg/ml)、2% BSA (終濃度 100 μg/ml) を加えて 4°C で 1 時間ローテーションした。上清を新しいチューブに移し、一部を Input として保存し、残りの上清を各々分配し、抗体を分配した上清サンプルへ 2 μg 加えて、4°C で一晩ローテーションした。再び Protein G Sepharose 4 を加えて 4°C で一時間ローテーションした後、Low salt buffer (20 mM Tris-HCl、150 mM NaCl、0.1 % SDS、1 % TritonX-100、2 mM EDTA、pH 8.0)、High salt buffer (20 mM Tris-HCl、500 mM NaCl、0.1 % SDS、1 % TritonX-100、2 mM EDTA、pH 8.0)、LiCl buffer (20 mM Tris-HCl、250 mM LiCl、1 % NP-40、1 % Sodium deoxycholic acid、1 mM EDTA、pH 8.0)、TE buffer (1 mM EDTA、10 mM Tris-HCl、pH 8.0) でそれぞれ 2 回ずつ合計 8 回洗浄した。回収サンプルを Direct elution buffer (10 mM Tris-HCl、300 mM NaCl、0.5 % SDS、5 mM EDTA、pH 8.0) で希釈し、Input と免疫沈降サンプルを 65°C で一晩インキュベーションし、脱架橋とビーズからの溶出を行った。RNase 及び Proteinase K 処理後、Wizard SV Gel and PCR clean-up System kit (Promega) を用いて DNA の精製・回収を行った。得られた DNA 断片を鋳型として、KOD FX neo polymerase (TOYOBO) による PCR を行った。プライマーの配列は以下に示す (F: forward primer, R: reverse primer)。

Promoter region ( <i>T</i> )	F	5'-GCTGCTCGGTACTTCAAAGGG-3'
(-203/-81)	R	5'-GCGCGACAAGAGTAAGTCTCTG-3'
Distal region ( <i>T</i> )	F	5'-TCCTGCTCTTTGTCACCTTC-3'
(-972/-844)	R	5'-GATTGTTGGAACGCATGCTG-3'
Promoter region ( <i>Mesp1</i> )	F	5'-GTGGAGCAGACTGGACTAAG-3'
(-114/35)	R	5'-TTATCCTGAGCCCTAGGTGTG-3'
Distal region ( <i>Mesp1</i> )	F	5'-ACTCTAGCTGCCTGTCTTGG-3'
(-4714/-4582)	R	5'-CCTTACTTCACATACCAGAGCCTT-3'

### レポーターアッセイ

293T 細胞を  $1 \times 10^5$  cells/ well の密度で 24 well プレートに撒き、ポリエチレンジアミン(PEI)を用いてトランスフェクションを行った。レポーターアッセイには、0-200 ng の Flag 融合タンパク質発現プラスミド (Flag と Flag-CIBZ) と 100 ng のレポータープラスミド (pGL3-*T*または pGL3-*Mesp1*)、5 ng のコントロールベクター (pRL-TK) を用いた。トランスフェクションの 48 時間後に細胞を PBS で洗浄し、Passive lysis buffer で溶解した。実験手法は Dual-Luciferase<sup>®</sup> Reporter Assay System (Promega) のマニュアルに従い、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性の値を測定した。得られたの値はコントロールプラスミドのルシフェラーゼ活性の値で補正した。それぞれの実験は最低 3 回以上行い、平均値と標準偏差で表した。

## 4. 結果

### 4.1 マウス ES 細胞の分化誘導に伴って CIBZ タンパク質の発現が減少する

CIBZ の発現がマウス ES 細胞の分化に関与するかどうかを調べるため、ES 細胞の分化過程における CIBZ の発現を調べることにした。マウス ES 細胞を LIF 非存在下で浮遊培養を行うと胚葉体 (EB) が形成されて、三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) へと分化することが知られている。EB 形成実験において、EB が比較的均一な球状の細胞塊 (スフェア) を形成できる hanging drop 法が広く用いられている。しかしこの手法は、培養中に培養液の交換ができないため制限された培養日数によりスフェアのサイズが小さく、また煩雑な作業のためスケールアップが難しいことから、タンパク質の解析に必要な大量の EB を作製することは困難である。Rotary 細胞培養法 (Lei, X et al., 2014) は、ES 細胞を低速水平回転振動させることで均一なスフェアが形成でき、培養中に培養液の交換ができるため 5 日間の継続培養による大きいサイズの EB 作製が可能である。さらに、簡単な作業によるスケールアップも容易である (図 7B)。

ES 細胞の分化過程での CIBZ の発現変動を調べるため、Rotary 法による分化した EB を経時的に回収してウェスタンブロッティングを行った。ES 細胞の分化に伴ってタンパク質の発現が低下することが知られている ES 細胞の未分化マーカー (Nanog、Oct3/4 と Sox2) をコントロールとして用いた。分化誘導 2 日目において、CIBZ の発現は未分化マーカーの発現と同様に顕著に低下し、4~5 日ではそれらの発現が更に低下していた (図 7C)。一方で半定量 RT-PCR の結果より、CIBZ と未分化マーカーの発現は分化誘導 5 日目までに顕著な変化がなかった (図 7D)。これらの結果から、CIBZ タンパク質の減少は、Nanog などのタンパク質と同様に転写後の翻訳により調節されていると考えられる。従って、ES 細胞の分化誘導における CIBZ タンパク質の発現減少は ES 細胞の分化に何らかの影響を与えることが示唆された。

### 4.2 CIBZ が欠損した ES 細胞の分化では中胚葉と前心臓中胚葉マーカーの発現が上昇する

CIBZ の発現低下が ES 細胞の三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) 分化の中でどの細胞系譜に寄与するかを調べるため、WT と CIBZ<sup>-/-</sup> ES 細胞を用いて EB 形成実験を行った。今回使用した CIBZ<sup>-/-</sup> ES 細胞は WT ES 細胞と比較しても、未分化性状態 (細胞形態、アルカリフォスファターゼ活性、Oct3/4 と Sox2 の発現) に大きな変化がないことが確かめられている (Nishii et al., 2012)。分化誘導 2~5 日まで、WT EB と CIBZ<sup>-/-</sup> EB より三胚葉マーカーの発現を半定量 RT-PCR を用いて調べた。その結果、CIBZ の欠損は外胚葉マーカー (Sox1、Nestin) の



発現に大きな変化が見られず、内胚葉マーカー (*Gata6*、*Sox17*) と中胚葉・前心臓中胚葉マーカー (*T* と *Mesp1*) の発現が上昇していることが分かった (図 8A)。*Sox17* は内胚葉以外に心臓原基 (cardiac crescent) の一部の細胞においても、その発現が確認されている (Kanai et al., 2002)。qPCR を行った結果、CIBZ の欠損による *T* (分化誘導 2~5 日目) と *Mesp1* (分化誘導 4~5 日目) の有意な発現上昇が確認された (図 8B)。

CIBZ の発現を一過性に抑制することで *T* や *Mesp1* の発現が誘導されるかどうかを調べるため、siRNA を用いて ES 細胞内の CIBZ を特異的にノックダウンして、72 時間後に EB 形成実験を行った。Scrambled negative control (Control) と比較して、siRNA により CIBZ の mRNA の発現が抑制されていることが分かった。分化誘導 3~5 日目の Control EB と比較して、CIBZ をノックダウンした EB では *T* と *Mesp1* 共に 3 日目から発現が上昇していることが明らかとなった (図 9)。以上の結果より、CIBZ の発現低下は中胚葉と前心臓中胚葉への分化を促進することが示唆された。

#### 4.3 CIBZ の欠損は ES 細胞から心筋細胞への分化を促進する

CIBZ の欠損が ES 細胞から心筋細胞への分化を促進するかどうかを調べるため、ES 細胞から心筋細胞への分化誘導実験を行った。この誘導手法は、Rotary 法により 5 日間培養した個々の EB を 24 ウェルプレートへ接着培養させることで、自発的に拍動する心筋細胞が顕微鏡で観察できる (図 10A)。分化誘導 7~20 日目まで 25 ウェル分の EB を顕微鏡下で観察して、心筋細胞の拍動が確認できるウェルの数をカウントした。その結果、WT EB では分化誘導 7 日目において約 10% の割合で自発的に拍動する心筋細胞が確認され、7 日目以降はその割合が徐々に増加し、14 日目までに 60-80% 程度まで上昇した (図 10B)。一方で、*CIBZ*<sup>-/-</sup> EB では分化誘導 7 日目において既に 90% の割合で自発的に拍動する心筋細胞が確認され、14 日目までにその割合が WT EB より有意に増加していることが分かった (図 10B)。顕微鏡下での写真やビデオ撮影より比較した結果、*CIBZ*<sup>-/-</sup> EB の拍動領域が WT EB より約 2 倍以上拡大していることが確認された。

ES 細胞から分化誘導した成熟心筋細胞は、心筋収縮タンパク質である cTnI の発現がみられる (Minami et al., 2012)。分化誘導 10 日目において、WT EB と *CIBZ*<sup>-/-</sup> EB を抗 cTnI 抗体による免疫蛍光染色法を行った。その結果、WT EB と比較して、*CIBZ*<sup>-/-</sup> EB では cTnI 陽性の細胞数が顕著に増加していることが確認された (図 10C)。

以上の結果より、CIBZ の欠損は ES 細胞の心筋細胞への分化を促進することが明らかとなった。

#### 4.4 CIBZ の欠損により ES 細胞の心筋細胞分化を促進する転写因子群の発現

が上昇する

これまでの結果より、CIBZ の欠損は ES 細胞の心筋細胞への分化を促進する転写因子群の発現が上昇することが予想される。その可能性を検証するため、WT EB と *CIBZ*<sup>-/-</sup> EB を用いた分化誘導の過程において、関連遺伝子の発現を qPCR により調べた。その結果、WT EB より CIBZ を欠損した EB では、心筋前駆細胞マーカー (*Flk1*, *Gata4*, *Mef2c* と *Nkx2.5*)、第一心臓予定領域と第二心臓予定領域のマーカー (*Tbx5* と *Islet1*)、成熟心筋細胞マーカー (*cTnI* と *myosin heavy chain:MHC*) の発現が上昇していることが分かった (図 11A)。ウェスタンブロッティングの結果より、WT EB より CIBZ を欠損した EB では、T、*Nkx2.5*、*Islet1*、MHC と *cTnI* の発現上昇も確認された (図 11B)。

*Mesp1* は下流の標的遺伝子群 (*Nkx2-5*, *Gata4*, *Mef2c*, *Tbx5* と *Islet1* など) のプロモーターを直接活性化することで中胚葉から心血管系への分化を制御するマスター遺伝子であることが知られている (Bondue et al., 2008)。ES 細胞での CIBZ の欠損による、分化誘導過程での *Mesp1* 及びその標的遺伝子群の発現上昇は *CIBZ*<sup>-/-</sup> ES 細胞の心筋への分化亢進という現象と一致している。

#### 4.5 CIBZ の過剰発現により ES 細胞の心筋細胞分化を促進する転写因子群の発現が低下する

CIBZ の過剰発現が ES 細胞の心筋細胞系譜への分化に影響を与えるかどうかを検証するため、CIBZ が安定的に過剰発現する ES 細胞株の樹立を試みた。最初に、EF1 $\alpha$  プロモーターでドライブする Flag タグと Flag タグ付きの CIBZ 全長 (Flag-CIBZ) のコンストラクトを作成した。これらのコンストラクトを WT の ES 細胞に導入し、G418 の選択より G418 耐性のコロニーを複数ピックアップした。これらのコロニーに対して抗 CIBZ 抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。その結果、Flag 由来のクローン (#1 と #2) と比較して、CIBZ タンパク質の発現が高い 3 つのクローン (#1~#3) が得られた (図 12)。半定量 RT-PCR の結果より、この 3 つのクローン由来の *CIBZ* の mRNA の発現も上昇していることが分かった (図 12)。WT ES 細胞と比較して、Flag 由来のクローンと Flag-CIBZ 由来のクローンが未分化性状態 (顕微鏡下による未分化のコロニーの特徴、*Nanog* と *Oct3/4* 等の発現) を維持していることが分かった。

次に、CIBZ の過剰発現が ES 細胞の心筋への分化に与える影響を調べるため、Flag 由来のクローン #1 (Control) と Flag-CIBZ 由来のクローン #3 (CIBZ OE) を用いて心筋細胞への分化誘導実験を行った (図 13)。分化誘導の過程における半定量 RT-PCR と qPCR を行った結果、CIBZ OE は Control より中胚葉と心筋分化マーカー (*T*, *Mesp1*, *Flk1*, *Gata4*, *MHC*, *cTnI*) の発現が低下していることが分かった (図 13A, 13B)。ウェスタンブロッティングを行った結果、CIBZ OE は Control より、T、*Islet1* と MHC の発現が低下していることが確認された (図 13C)。これらの結果より、CIBZ の過剰発現は ES 細胞から心筋細

胞分化に関わる重要な遺伝子を抑制することが明らかとなった。

#### 4.6 CIBZ の過剰発現が ES 細胞の心筋細胞へ分化を抑制する

CIBZ の過剰発現が ES 細胞の心筋細胞分化を抑制するかどうかを調べるため、心筋への分化誘導実験を行った (図 14)。その結果、Control EB では分化誘導 7 日目において約 40 %の割合で自発的に拍動する心筋細胞が観察され、8 日にはその割合が 60%に上昇し、9 日目以降は 80-100%程度まで増加した (図 14)。一方で CIBZ OE の EB では、分化誘導 7 日目に約 10%の割合で自発的に拍動する心筋細胞が観察されて、7~14 日目までに CIBZ OE の EB で拍動する心筋細胞の割合 (25%~60%) が有意に減少していることが分かった (図 14)。以上の結果より、CIBZ の過剰発現は ES 細胞の心筋細胞への分化を抑制することが明らかとなった。

#### 4.7 CIBZ は *T* と *Mesp1* のプロモーター領域に結合する

CIBZ の欠損及び過剰発現は *T* と *Mesp1* の mRNA レベルに影響を及ぼすことから、CIBZ がこの 2 つ遺伝子のプロモーターに結合することで転写を抑制する可能性が考えられる。未分化の ES 細胞において、CIBZ が *T* と *Mesp1* のプロモーター領域に結合するかどうかを検証するため、クロマチン免疫沈降法 (ChIP) を行った。*T* のプロモーター領域は、転写開始点 (Transcriptional start site: TSS) から 5'側上流の約 500 bp であることが報告されている (図 15A、Arnold et al., 2000)。*Mesp1* のプロモーター領域は、TSS より 5'側上流の約 4.6 kb に存在することが知られている (図 15B、Haraguchi et al., 2001)。CIBZ が *T* と *Mesp1* のプロモーター領域に特異的に結合するかどうかを検証するため、この 2 つ遺伝子のプロモーター領域とプロモーター領域より 5'側上流の脊椎動物間でよく保存された領域 (Distal region) にプライマーを設計した (図 15A、15B、16B)。ホルムアルデヒドの処理により DNA とタンパク質を架橋した ES 細胞の核抽出溶液を、抗 CIBZ 抗体とネガティブコントロールである Rabbit IgG により免疫沈降した後、上記のプライマーペアを用いて沈降物に対する PCR を行った。その結果、CIBZ が *T* と *Mesp1* のプロモーター領域に結合するが、Distal region への結合はなかった (図 15A、15B)。これらの結果より、CIBZ は *T* と *Mesp1* のプロモーター領域に特異的に結合することが明らかとなった。

#### 4.8 CIBZ による *T* と *Mesp1* プロモーター領域への結合は DNA メチル化非依存的であることが示唆される

CIBZ はメチル化 DNA 結合タンパク質であるため、CIBZ による *T* と *Mesp1* のプロモーター領域への結合が DNA のメチル化に依存する可能性が考えられる。CIBZ による結合が *T* と *Mesp1* 遺伝子のプロモーター上の DNA メチル化に依存した場合、脱メチル化されたプロモーターでは CIBZ の結合が顕著に低下

すること (Oikawa et al., 2011) が予想される。脱メチル化剤である 5-azacytidine(5-aza-dC) の処理により、グローバルな遺伝子の脱メチル化が知られている。この薬剤で ES 細胞を処理した後、DNA メチル化の制御が知られている *T* (Berdasco et al., 2011) と *CIBZ* (先行研究より) の mRNA の発現を半定量 RT-PCR により調べた。その結果、ES 細胞における *T* と *CIBZ* の発現が 5-aza-dC の処理によって上昇していること (図 16A) から、*T* と *CIBZ* のプロモーター領域が DNA メチル化を受けている可能性が強く示唆された。5-aza-dC で ES 細胞を処理した後、ChIP アッセイを行った。その結果、5-aza-dC 処理の有無に関わらず、*CIBZ* は *T* と *Mesp1* のプロモーター領域への結合が同等に見られたが、両遺伝子の Distal region への結合は確認できなかった (図 16B)。以上の結果より、ES 細胞における *CIBZ* の *T* と *Mesp1* のプロモーター領域への結合は DNA のメチル化に依存しないことが強く示唆された。

#### 4.9 *CIBZ* は *T* と *Mesp1* のプロモーターを抑制する

*CIBZ* は転写抑制活性を有する BTB 型の zinc finger (ZF) タンパク質であるため、*T* と *Mesp1* の転写を直接的に抑制することが考えられる。その可能性を検証するため、まず *T* のプロモーター領域を pGL3 basic レポーターベクターに組み込んだコンストラクトを作製した (pGL3-*T*、図 17A)。Flag と pGL3-basic 及び pGL3-*T*、Flag-*CIBZ* と pGL3-basic 及び pGL3-*T* をそれぞれ HEK 293T 細胞へ共発現させ、ルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、Flag-*CIBZ* は Flag より pGL3-*T* へのルシフェラーゼ活性を 2 倍以上抑制していることが分かった (図 17B)。さらに、Flag-*CIBZ* による pGL3-*T* への抑制効果は Flag-*CIBZ* の濃度に依存していることも判明した (図 17C)。

次に、*CIBZ* が *Mesp1* のプロモーターを抑制するかどうかを調べるため、pGL3-*Mesp1* を作製した (図 18A)。ルシフェラーゼアッセイを行った結果、Flag-*CIBZ* は Flag より pGL3-*Mesp1* へのルシフェラーゼ活性を 2 倍以上抑制していることが分かった (図 18B)。

以上の結果より、*CIBZ* は *T* と *Mesp1* のプロモーターを直接的に抑制することが明らかとなった。

#### 4.10 *CIBZ* による *T* と *Mesp1* の抑制には zinc finger (ZF) 1-5 が必要である

*T* と *Mesp1* のプロモーター抑制に *CIBZ* のどのドメインが必要なのかを調べるため、*CIBZ* の各種欠失変異体を用いて HEK 293T 細胞にトランスフェクションしてレポーターアッセイを行った。その結果、*CIBZ* 全長 (*CIBZ* FL) は pGL3-*T* と pGL3-*Mesp1* を強く抑制することに対し、ZF1-5 を欠失した変異体 ( $\Delta$  ZF1-5、BTB-RD2 と SP-ZF6-10) では抑制効果が見られなかった (図 19)。このことから、*CIBZ* の ZF1-5 は *T* と *Mesp1* のプロモーターへ抑制に必要であることが分かった。

ZF1-5 と N 末端ドメインを融合した変異体 (BTB-RD2-ZF1-5) は pGL3-*T* と pGL3-*Mesp1* への抑制効果が見られていないことに対して、ZF1-5 と C 末端ドメインを融合した変異体 ( $\Delta$ BTB-RD2) は最も強い抑制効果を示した (図 19)。この結果より、*T* と *Mesp1* のプロモーター抑制に CIBZ の ZF1-5 と C 末端ドメインが十分であることが明らかとなった。

## 5. 考察

### 5.1 ES 細胞から心筋細胞へ分化における CIBZ の役割

今回の実験の結果により、CIBZ の発現低下は ES 細胞の心筋への分化に必須であることが明らかとなった (図 20)。ES 細胞の分化 (EB 形成) の過程において、(1) CIBZ タンパク質の発現は *T* と *Mesp1* の発現上昇より先に低下していること (図 7C、図 8) ; (2) *T* と *Mesp1* の発現 (mRNA とタンパク質) は、CIBZ を過剰発現した EB では減少していること (図 13) に対して、CIBZ をノックアウトした EB では増加していること (図 8、図 9) (3) *Mesp1* の標的遺伝子群の発現は、過剰発現の CIBZ EB では抑制されていること (図 13) に対して、ノックアウトの CIBZ EB では促進されていること (図 11) ; (3) CIBZ の過剰発現は ES 細胞の心筋細胞への分化を抑制すること (図 14) に対して、CIBZ の欠損は ES 細胞の心筋細胞への分化を促進すること (図 10) が明らかとなった。また、CIBZ は(1) 未分化の ES 細胞において、*T* と *Mesp1* のプロモーター領域に結合すること (ChIP アッセイの結果より、図 15) ; (2) 293T 細胞において、*T* と *Mesp1* のプロモーターを抑制すること (レポーターの結果より、図 17~19) が明らかとなった。これらのことから、CIBZ は *T* と *Mesp1* の転写を抑制することで ES 細胞の心筋細胞への分化を‘負’に制御することが明らかになった。

### 5.2 CIBZ による *T* と *Mesp1* の転写制御

*T* と *Mesp1* は ES 細胞から中胚葉と心血管系譜への分化をそれぞれ促進するマスター遺伝子であり、この 2 つの遺伝子がそれぞれの標的転写因子を制御するメカニズムの研究が進んでいる。例えば、*T* が *Mesp1* プロモーターに直接結合することでその転写を活性化し (David et al., 2011)、*Mesp1* が下流の転写因子群 (*Nkx2-5*、*Gata4*、*Mef2c*、*Tbx5* と *Islet1* など) のプロモーターに直接的に結合して活性化する。一方で、*T* と *Mesp1* の発現を制御するメカニズムに多くの謎が残っており、特に未分化の ES 細胞における *T* と *Mesp1* のサイレンシング機構は未解明である。ES 細胞の分化において、*Nanog* と *Oct3/4* はそれぞれ内胚葉と中胚葉への分化に重要であることが知られている (Niwa et al., 2000、図 1)。*Oct3/4* は Wnt シグナルに依存して *Mesp1* 遺伝子のプロモーターを活性化する (Li et al., 2013) が、*T* への制御は不明である。そこで我々は ES 細胞分化での CIBZ による *T* と *Mesp1* の発現制御機構に着目した。未分化な ES 細胞において、高発現している CIBZ が *T* と *Mesp1* のプロモーターを抑制することでこの 2 つ遺伝子の転写を‘off’にする。ES 細胞の分化に伴う CIBZ タンパク質の減少は *T* と *Mesp1* への抑制が解除され、*T* の発現が上昇する。分化の進行につれて、さらなる CIBZ の発現減少と *T* と *Oct3/4* の発現上昇による総合的な効果によって *Mesp1* のプロモーターが活性化される (図 20)。ES 細胞の分化誘導に

において、CIBZ、T と Oct3/4 による *Mesp1* プロモーターを活性化する詳細なメカニズムの解析は今後の課題である。

レポーターアッセイの結果より、CIBZ のジンクフィンガードメイン (ZF1-5) が T と *Mesp1* の転写抑制に必要であることが分かった (図 19)。CIBZ はメチル化 DNA 結合タンパク質であり、ZF1-5 を介してメチル化された CpG に結合すること (Oikawa et al; 2011) から、CIBZ の T と *Mesp1* プロモーターへの結合に DNA メチル化が必要であることが示唆された。また幹細胞内において、T のプロモーター上のメチル化状態はこの遺伝子の発現と相関していることが報告されている (Dansranjavin et al; 2009)。しかし今回の結果より、脱メチル化の有無に関わらず CIBZ の T と *Mesp1* プロモーター上への結合が低下していないこと (図 16) から、この結合は DNA のメチル化に依存しない可能性が示唆された。CIBZ のヒトのオーソログである ZBTB38 はメチル化された特異的な配列 (CGCCAT/GCGGTA) に結合することが報告されている (Sasai et al; 2010)。先行研究より、CIBZ が DNA メチル化依存的に結合する Myogenin のプロモーター領域にはこの配列が存在する (Oikawa et al; 2011) が、T と *Mesp1* プロモーター領域にはこの配列が存在しないことが分かった (未発表データ)。以上のことから、CIBZ による T と *Mesp1* プロモーターの制御に DNA のメチル化が関与しないことが強く示唆された。

CIBZ のラットオーソログである ZENON は、ZF1-5 を介してチロシンヒドロキシラーゼのプロモーターに存在する E-box に結合することが報告されている (Kiefer et al., 2005)。今後、T と *Mesp1* のプロモーター領域に存在する E-box が CIBZ による結合及び抑制に必要かどうかを明らかにする必要がある。

### 5.3 CIBZ の ES 細胞から心筋細胞への分化に関わるシグナリング

マウス ES 細胞の分化において、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが T の発現を誘導することで中胚葉へと分化 (Yamaguchi et al., 1999, Arnold et al., 2000, Lindsley et al., 2006) し、T と BMP シグナルが *Mesp1* の発現を誘導して心臓・血管系譜細胞へと分化する (Costello, et al., 2011)。Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが CIBZ の T と *Mesp1* のプロモーターへの転写抑制に必要かどうかを調べるため、HEK 293T 細胞を用いて各々 Wnt と LiCl (両因子ともに Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルを活性化する) の存在下によるルシフェラーゼアッセイを行った。その結果、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルは T と *Mesp1* のプロモーターを活性化したことから、このシグナルが T と *Mesp1* のプロモーターの活性化に重要であることが分かった (未発表データ)。しかし、このシグナルは CIBZ による T と *Mesp1* のプロモーターへの抑制の促進効果が見られなかったことから、CIBZ による T と *Mesp1* のプロモーターへの抑制にはこのシグナルが必要ないということが示唆された。但し、Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルが CIBZ タンパク質の分解を促進することで抑制の相加効果が見られていなかった可能性が考えられ、今後、このシグナルが CIBZ タ

ンパク質の発現低下に影響を与えるかどうかを検証する必要がある。また、BMP や Activin などのシグナルが中胚葉から心臓中胚葉への分化に重要であることが知られていることから (Vliet et al., 2012)、これらのシグナルが CIBZ タンパク質の発現及び CIBZ による *T* と *Mesp1* のプロモーターへの抑制に影響を与えるかどうかを調べる必要がある。

#### 5.4 ES 細胞の分化に伴う CIBZ タンパク質の発現低下

ES 細胞の分化過程において、CIBZ タンパク質の発現が低下したにも関わらず mRNA の発現が安定していること (図 7) から、CIBZ タンパク質の減少は転写後の翻訳後修飾が関与することが考えられる。多能性転写因子である Nanog などにおいても同様な現象が見られ、ユビキチン・プロテアソーム系がそれらのタンパク質の分解に関与することが知られている (Ramakrishna et al; 2011)。また、ZBTB38 はユビキチン・プロテアソーム系の制御を受けていること (Miotto et al., 2014) から、この分解系が CIBZ タンパク質の発現低下を制御することが示唆された。しかし今回の結果より、ユビキチンの阻害剤である MG132 が ES 細胞分化における Nanog タンパク質の発現低下をレスキューする一方で、CIBZ タンパク質の発現減少にはレスキューの効果が見られなかった (未発表データ)。今後、MG132 の濃度と処理時間などの条件を検討した上で、この修飾が CIBZ タンパク質の発現減少に関与するかどうかを明らかにしたい。

先行研究より、CIBZ が SUMO (small ubiquitin-like modifier) 化修飾を受けることが分かった。また近年、miRNA が Nanog タンパク質などの転写後の翻訳後修飾に関与することが報告されている (Tay et al; 2008)。今後、ES 細胞の分化による CIBZ タンパク質の発現低下において、これらの修飾が関与するかどうかを検証する必要がある。



## 6. 図表

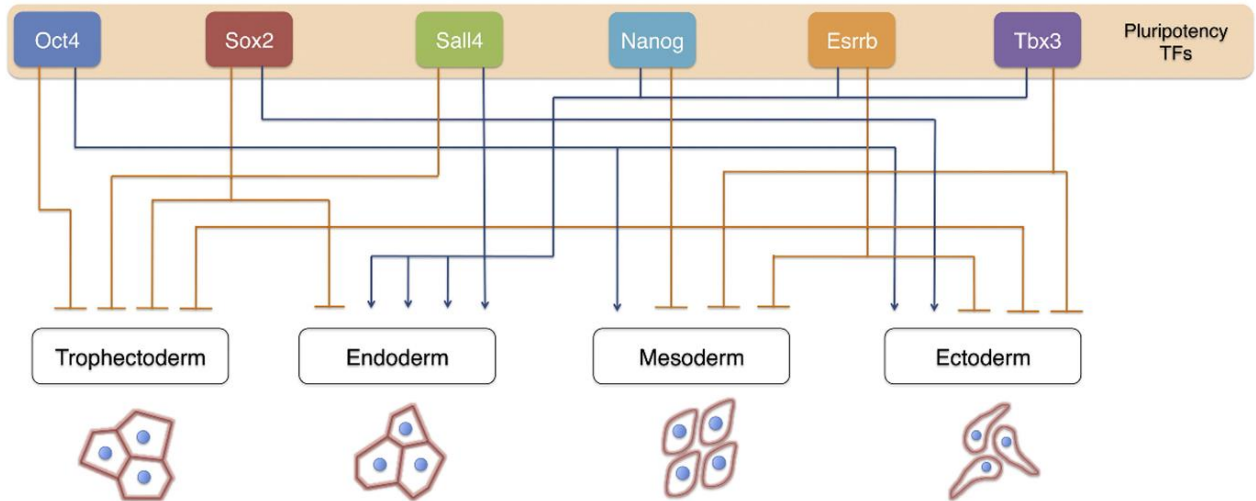


図1 多能性を維持する転写制御機構

ES細胞における多能性因子（Pluripotency Transcription factors; TFs）が各胚葉への分化を協調的に調節することで多能性を維持している。逆にこれら転写ネットワークのバランスが崩れることで、ある特定の胚葉への分化が促進される。転写因子は特定の系譜への誘導を抑制（薄茶色線）或いは促進（青の線）する。

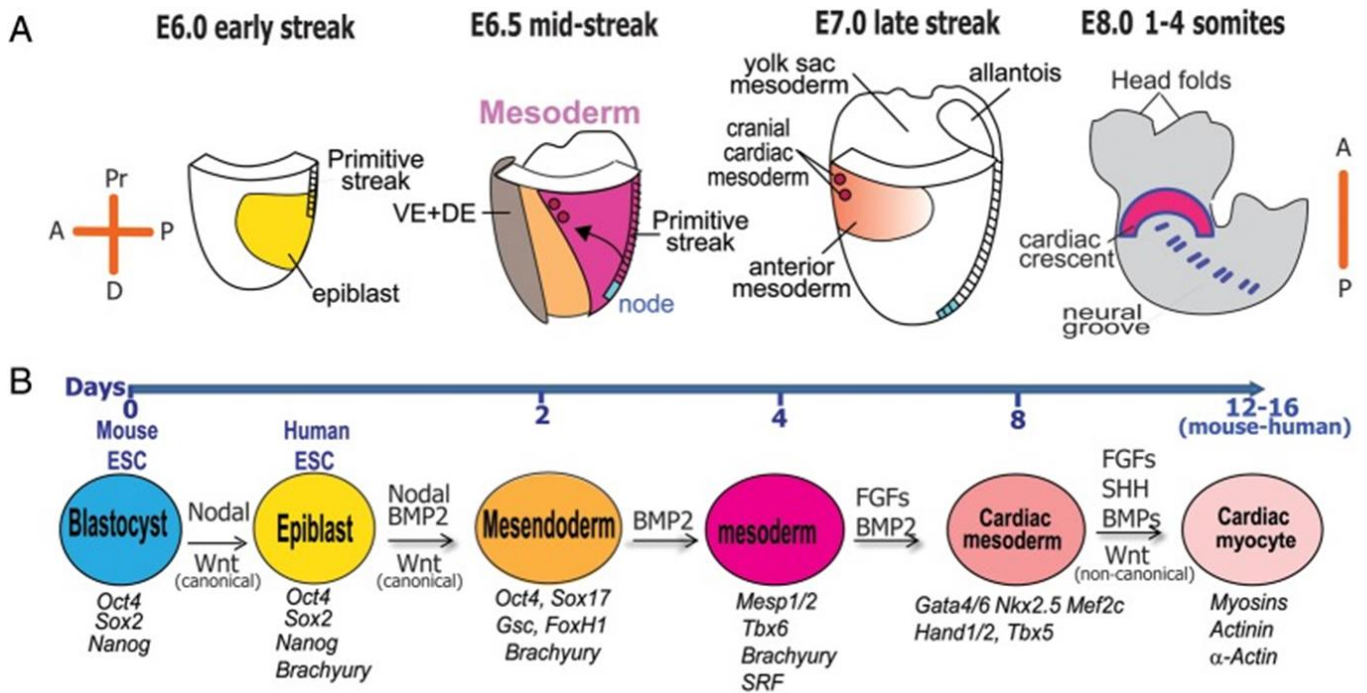
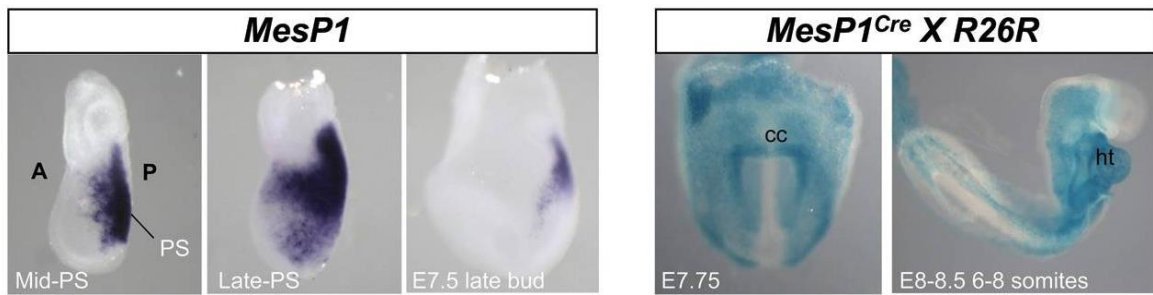


図2 マウス ES 細胞からの心筋細胞分化とマウス初期心臓発生の比較

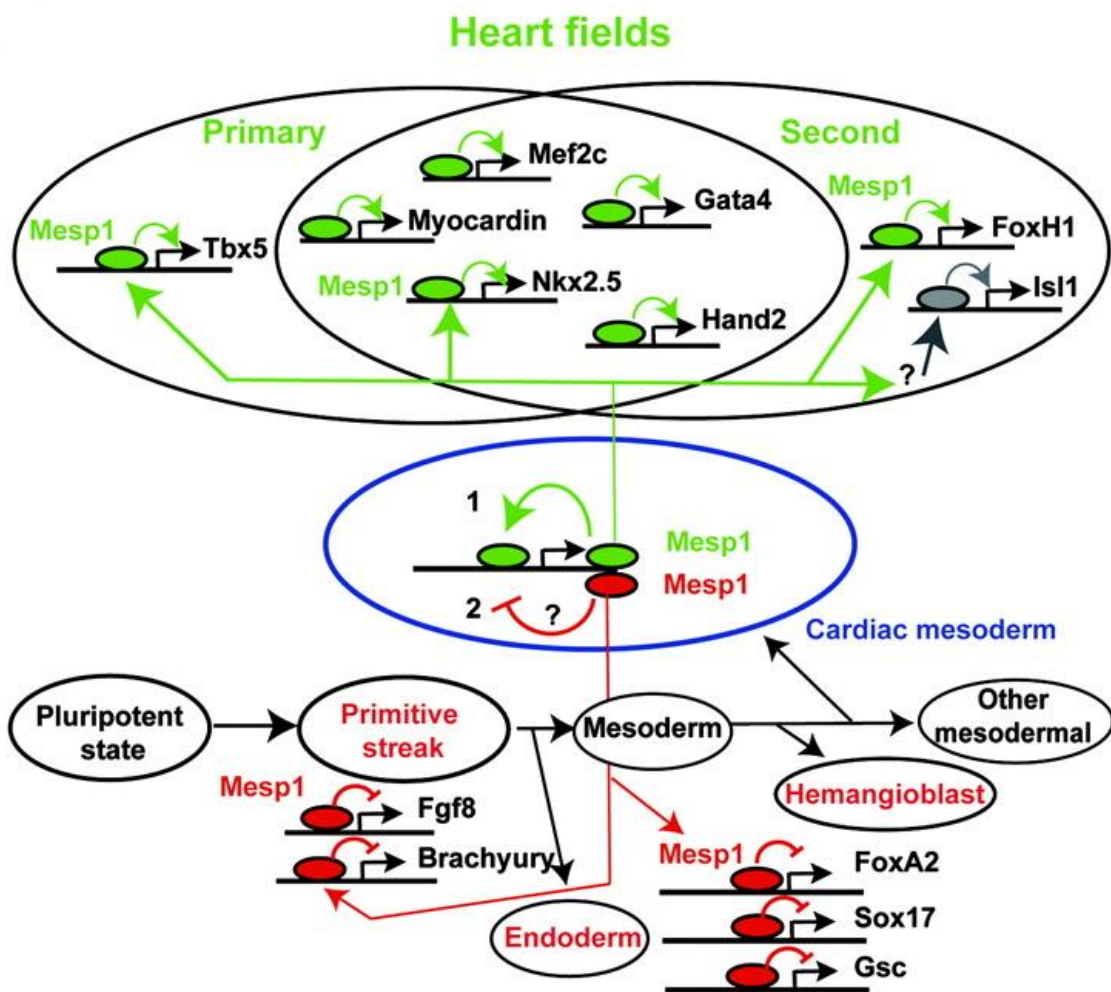
A、初期胚における心臓発生ステージを経時的に示した。略語は、A: anterior region、P: posterior region、Pr: proximal region、D: distal region、VE: visceral endoderm、DE: definitive endoderm を表した。

B、ES 細胞からの心筋細胞分化を経時的に示した。ES 細胞からの心筋細胞分化は初期心臓発生ステージを模倣する。

A



B



### 図3 Mesp1による心臓発生の制御

A、*in situ* hybridizationの結果 (Vliet, P.V et al., 2012) より、マウス初期胚での *Mesp1* 発現パターンが経時的に解析された (左パネル)。 *Mesp1* 遺伝子座に *Cre* リコンビナーゼが挿入された *Mesp1-Cre* マウスと *ROSA* 遺伝子座に *lacZ* 遺伝子をノックインした *R26R-lacZ* マウスとの交配で、*Mesp1* の細胞系譜が追跡調査された (右パネル) ( )。 *Mesp1* 陽性細胞はほぼ全ての心臓を構成する細胞に派生することが示された。また、頭部・尾部の筋肉へも派生していた。略語は、A: anterior region、P: posterior region、PS: primitive streak、Mid-PS: mid-primitive streak、cc: cardiac crescent、ht: heart を表している。

B、心血管系譜のマスター因子 *Mesp1* による下流の標的遺伝子の発現制御を示した (Bondue, A et al., 2008)。 *Mesp1* は前心臓中胚葉で発現する転写因子であり、下流の制御遺伝子として心臓形成に寄与する *Gata4*、*Nkx2-5*、*Mef2c* や *Myocardin* などが挙げられる。 *Mesp1* はこれらの遺伝子発現を正に制御する一方で、中・内胚葉で発現している *Brachyury* (*T*)、*Gsc* (*Gooseoid*)、*FoxA2* などの遺伝子発現を負に制御する。

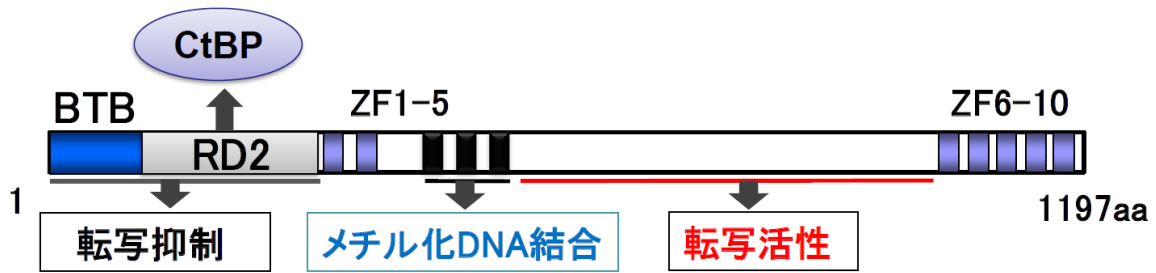


図4 CIBZ の構造と各ドメインの機能

CIBZ (CtBP-interacting BTB-zinc finger protein) は、BTB ドメインをもつ zinc finger 型転写因子である。酵母からヒトまで進化的に高く保存されている BTB ドメインは、ショウジョウバエの 3 つの発生関連遺伝子の broad-complex、tramtrack、bric a brac に共通して見出されたドメインであり、タンパク質間相互作用を介して機能する。CIBZ は、全長 1197 個のアミノ酸からなるタンパク質で N 末端領域に BTB ドメイン、中央と C 末端領域にそれぞれ zinc finger クラスターを有している。GAL4-DNA 結合ドメインと CIBZ 各種欠失変異体の融合タンパク質を用いたルシフェラーゼアッセイより、BTB ドメインは転写抑制機能を有し、SP(spacer)領域には転写活性機能があることが確認された。3~5 番目の zinc finger を用いてメチル化された CpG 配列に結合する。RD2 ドメイン内の PLDXL 配列を介して、N 末端領域でコリプレッサー CtBP(C-terminal binding protein)と結合する。

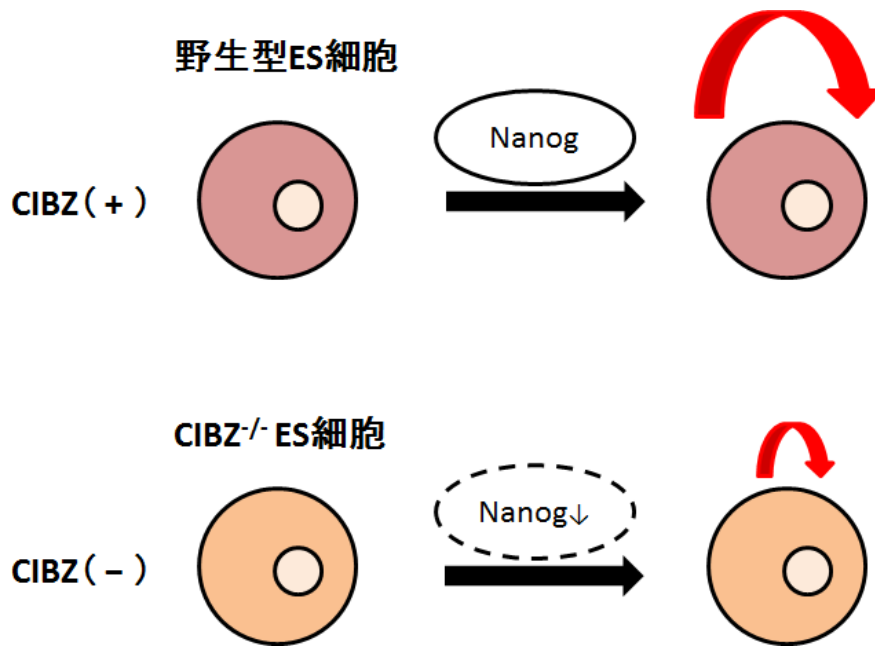
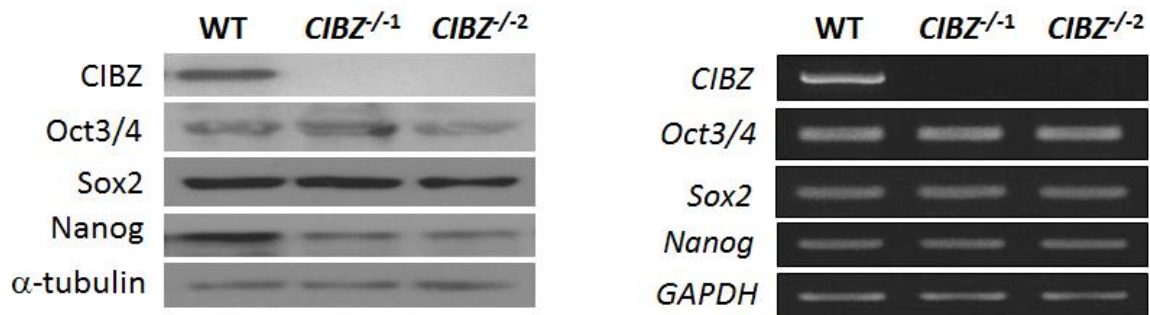


図5 ES細胞におけるCIBZの発現変化は細胞増殖に影響を与える

ES細胞の未分化性維持に重要な転写因子の一つ、NanogはES細胞の増殖を正に制御する。CIBZが欠損したES細胞(CIBZ<sup>-/-</sup>ES細胞)では、Nanogタンパク質の発現量が減少し、ES細胞の増殖低下を引き起こす。

A



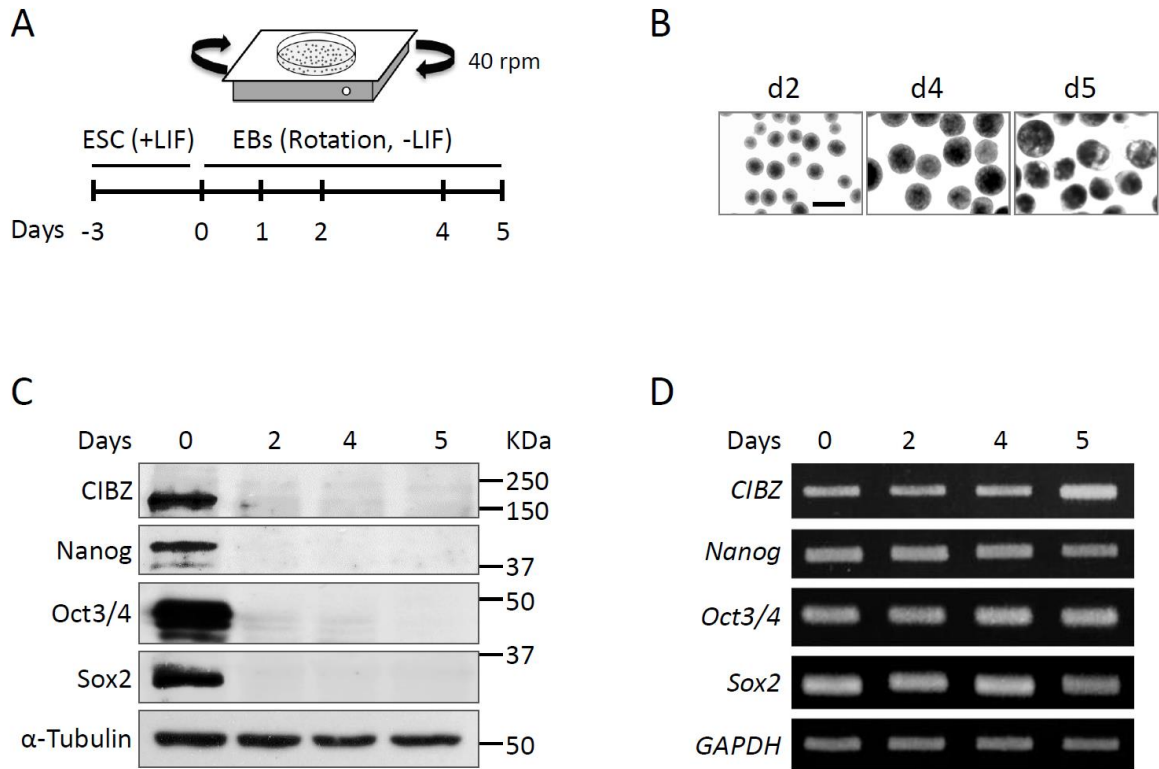
B



図6 CIBZが欠損したES細胞の未分化マーカーと分化マーカーの発現

A、CIBZが欠損したES細胞(*CIBZ*<sup>-/-1</sup>、*CIBZ*<sup>-/-2</sup>)における、未分化マーカー(Oct3/4、Sox2、Nanog)のタンパク質とmRNAの発現を野生型(WT)と比較するため、ウェスタンブロッティング(左上)と半定量RT-PCR(右図)を行った。 $\alpha$ -tubulinとGAPDHは各々の内部標準とした。

B、野生型とCIBZが欠損したES細胞(*CIBZ*<sup>-/-1</sup>)から、mRNAを抽出し、半定量RT-PCRで分化マーカーの発現量を比較した。*Pax6*と*Nestin*は外胚葉マーカー、*T*と*Tbx2*は中胚葉マーカー、*Gata6*と*Gata4*は内胚葉マーカーである。GAPDHは内部標準とした。



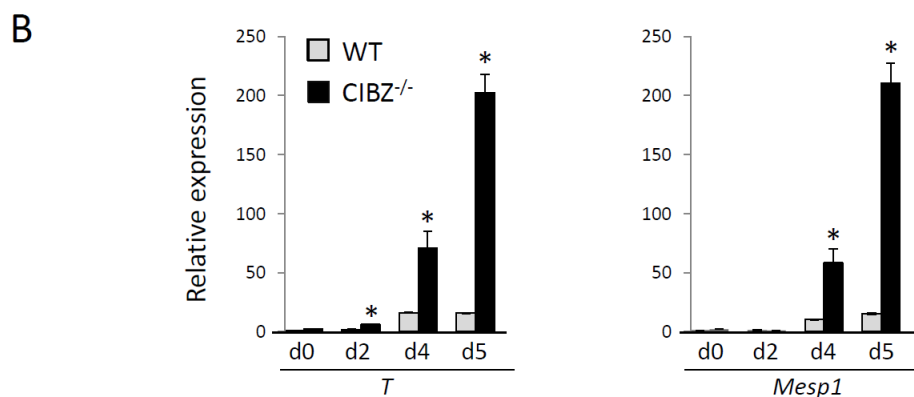
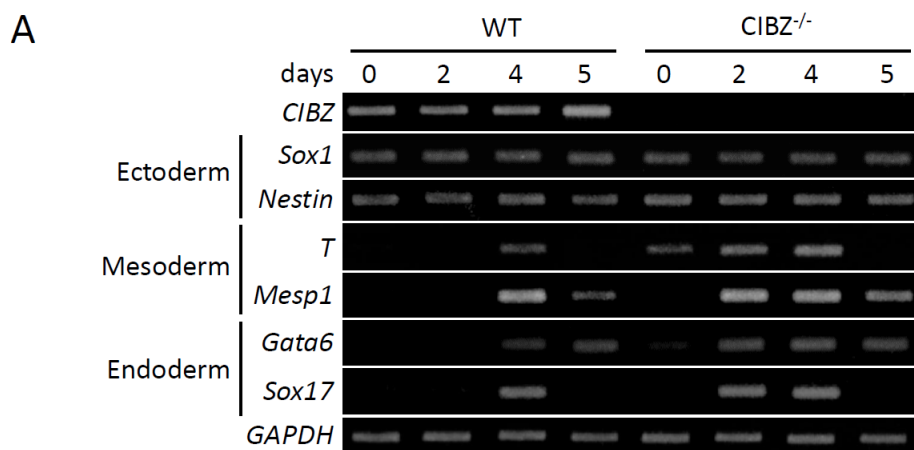
**図7 LIF 非存在下において、ES 細胞の分化誘導に伴って CIBZ タンパク質の発現が顕著に減少する**

A、ES 細胞の EB 分化誘導法 (Rotary 細胞培養法)。LIF 非存在下において、ES 細胞を低速水平旋回振動させることで均一な球状の細胞塊 (スフェア) を形成する。

B、EB 分化誘導後 2~5 日目における EB スフェアの顕微鏡写真。Scale bar = 500  $\mu$ m。

C-D、マウス ES 細胞から EB 形成過程における CIBZ の発現。LIF 非存在下における ES 細胞の EB 分化誘導後、図に示した時間に EB を回収し、ウェスタンブロッティング (C) と半定量 RT-PCR (D) でそれぞれの発現量を解析した。 $\alpha$ -tubulin と GAPDH は各々の内部標準とした。

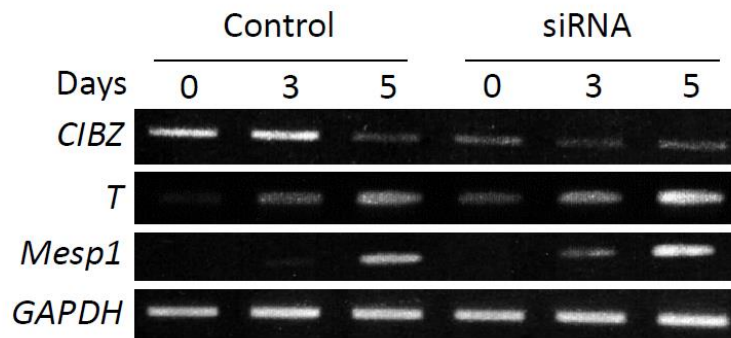




**図 8 CIBZ が欠損した EB では中胚葉と前心臓中胚葉マーカースの発現が上昇する**

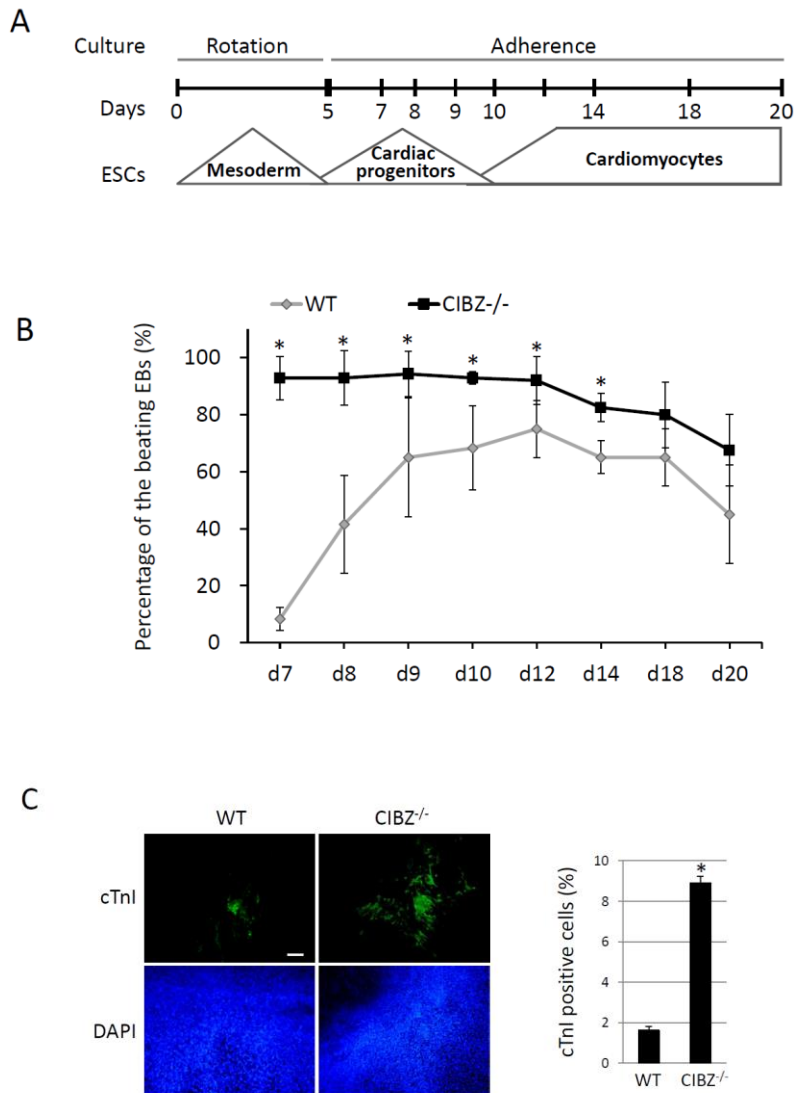
A、野生型 (WT) と CIBZ が欠損した ES 細胞 (CIBZ<sup>-/-</sup>) を用いて、EB 形成による三胚葉への分化誘導実験を行った。図に示した時間に細胞を回収し、半定量 RT-PCR で各分化マーカースの発現を解析した。Sox1 と Nestin は外胚葉マーカース、T は中胚葉マーカース、Mesp1 は前心臓中胚葉マーカース、Gata6 と Sox17 は内胚葉マーカースである。GAPDH は内部標準とした。

B、WT と CIBZ<sup>-/-</sup> ES 細胞での EB 形成による分化誘導過程で、T と Mesp1 の発現量をリアルタイム PCR により解析した。グラフは独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で表している。また、それぞれ内部標準として用いた GAPDH で転写レベルの補正を行った。グラフのアスタリスクは Student の T 検定より P < 0.05 であることを示している。



**図9 CIBZ をノックダウンした EB では *T* と *Mesp1* の発現が上昇する**

ES 細胞に *CIBZ* に対する特異的な siRNA と scrambled negative control (Control) をトランスフェクションし、72 時間後に EB への分化誘導を行った。分化誘導前の 0 日目と、分化誘導後 3 日目と 5 日目に細胞を回収し、半定量 RT-PCR により *CIBZ*、*T* と *Mesp1* の発現を解析した。*GAPDH* は内部標準とした。



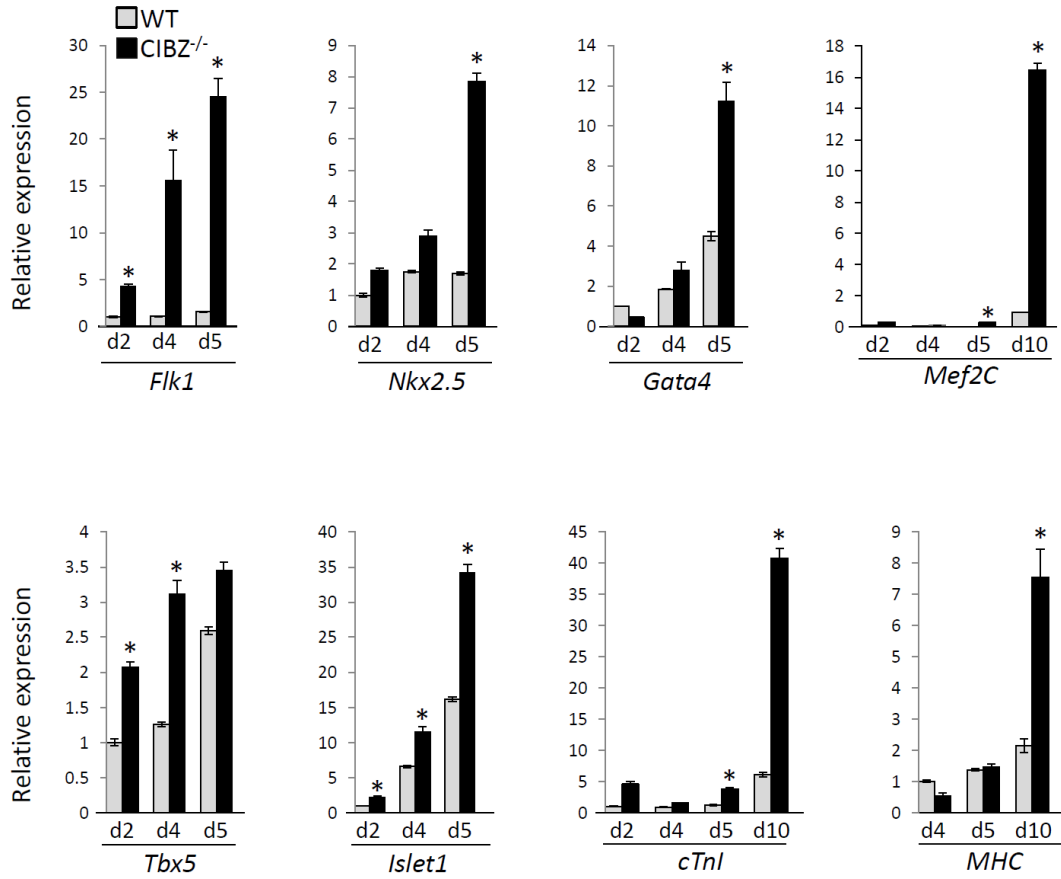
### 図 10 CIBZ の欠損は ES 細胞から心筋細胞への分化を促進する

A、ES 細胞から EB 形成を経て心筋細胞に分化する模式図である。ES 細胞をサスペンション浮遊培養してか 5 日後に、0.1% ゼラチンコートされた 24 ウェルプレートへ移すことで接着培養に切り替えた。接着培養 2-3 日後に、効率的に拍動する心筋細胞が確認された。

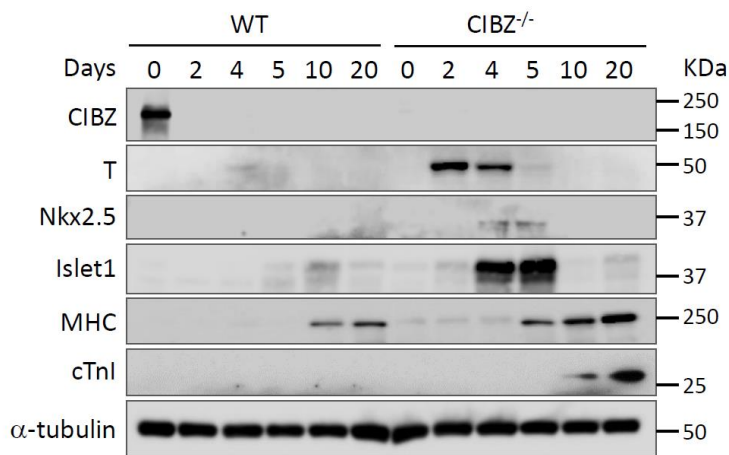
B、WT と CIBZ<sup>-/-</sup> ES 細胞由来の EB を 24 ウェルプレートへ接着培養させた後、自発的に拍動する心筋細胞が観察されたウェル (N=25 ウェル) をカウントして、その割合 (%) を示した。グラフはそれぞれ図に示した独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で表している。グラフのアスタリスクは Mann-Whitney *U* test より  $P < 0.05$  であることを示している。

C、接着培養から 10 日目のそれぞれの EB (WT と CIBZ<sup>-/-</sup>) を抗 cTnI 抗体 (緑) と DAPI (青) で免疫染色した (図左)。免疫染色した EB よりランダムに 15 箇所から cTnI 陽性細胞の割合 (cTnI/DAPI) を定量した (図右)。Scale bar = 20  $\mu$ m。グラフのアスタリスクは Student の *T* 検定より  $P < 0.05$  であることを示している。

A



B



### 図 11 CIBZ の欠損は心筋分化に関わる重要な転写因子群の発現が上昇する

A、WT と *CIBZ*<sup>-/-</sup> ES 細胞を用いて、心筋細胞への分化誘導を行った。図に示した時間に細胞を回収し、qPCR により各心筋分化ステージで発現する転写因子群の発現を解析した。*Flk1*、*Gata4*、*Mef2c*、*Nkx2-5* は心筋分化の初期ステージのマーカであり、*Tbx5* と *Islet1* はそれぞれ第一心臓予定領域 (First heart field) と第二心臓予定領域 (Second heart field) のマーカである。グラフは独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で表している。また、それぞれ内部標準として用いた *GAPDH* で転写レベルの補正を行った。グラフのアスタリスクは Student の *T* 検定より  $P < 0.05$  であることを示している。

B、分化誘導開始から経時的に WT と *CIBZ*<sup>-/-</sup> の EB を回収して、上述した抗体 {T、Nkx2.5、Islet1、myosin heavy chain (MHC)、cardiac Troponin I (cTnI) } を用いてウェスタンブロッティングを行った。 $\alpha$ -tubulin は内部標準とした。

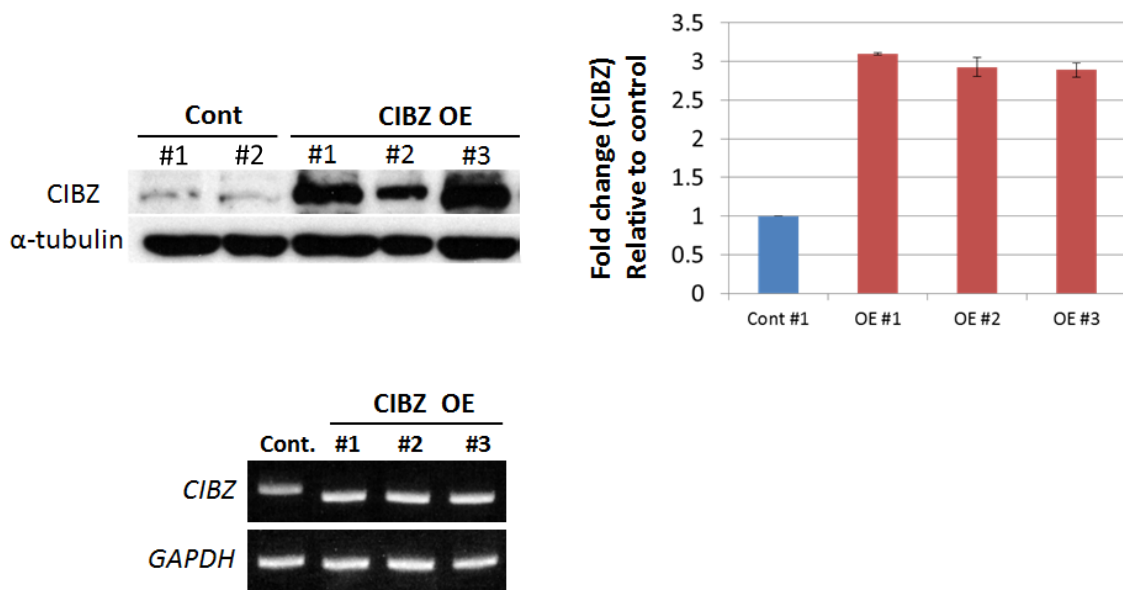
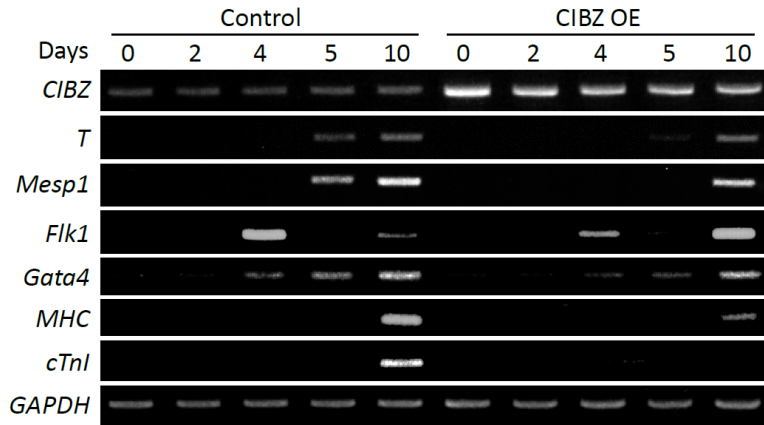


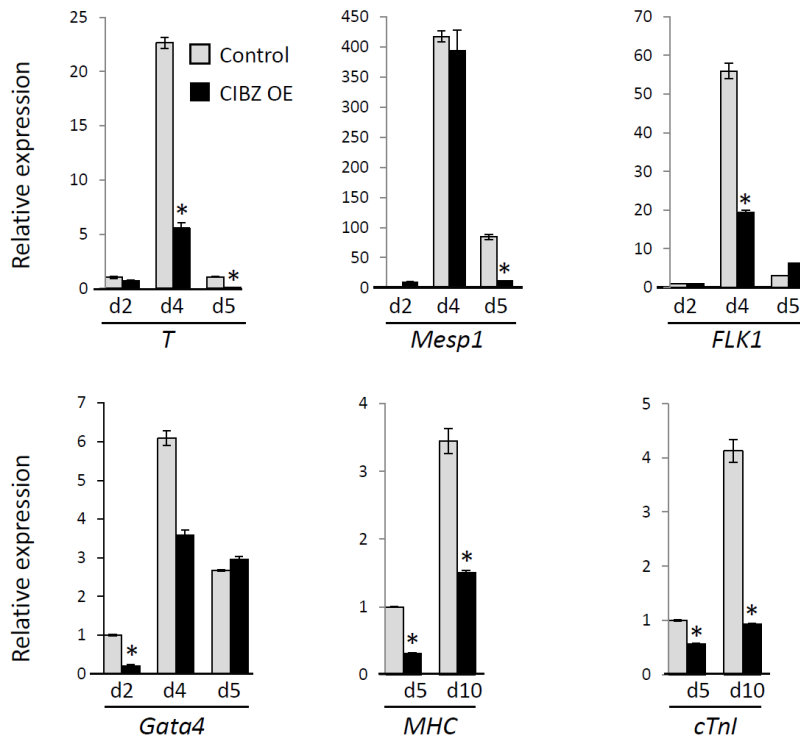
図 12 CIBZ が安定的に発現する ES 細胞株の樹立

CIBZ が安定的に発現する (CIBZ overexpression: CIBZ OE) ES 細胞株を作製するため、Flag タグと Flag タグ付きの CIBZ 全長 (Flag-CIBZ) のコンストラクトを WT の ES 細胞に導入し、G418 の選択より G418 耐性のコロニーを複数ピックアップした。Flag 由来のコロニー (#1 と #2、Cont) と Flag-CIBZ 由来のコロニー (#1~#3、CIBZ OE) において、ウェスタンブロッティング (上図) と半定量 RT-PCR (下図) を行った。ウェスタンブロッティングの結果を定量化しグラフは右上図で示している。グラフは独立した 3 回の実験の平均と標準偏差を表している。 $\alpha$ -tubulin と GAPDH は各々の内部標準とした。

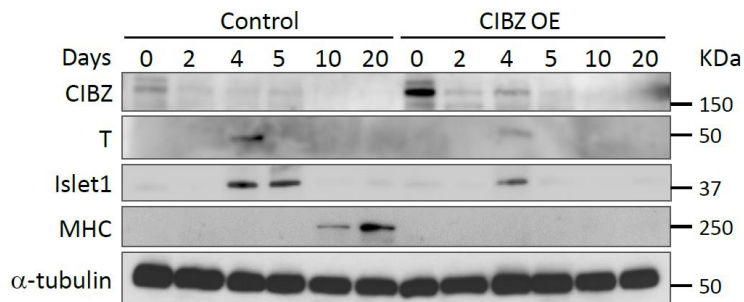
A



B



C



### 図 13 CIBZ の過剰発現は ES 細胞の心筋への分化を促進する転写因子群の発現が低下する

A、Flag 由来の ES クローン (#1: Control) と CIBZ を過剰発現させた ES クローン (#3: CIBZ OE) を用いて、EB 形成を経て心筋細胞への分化誘導実験を行った。図に示した時間で細胞を回収し、半定量 RT-PCR ウェスタンブロッティングにより CIBZ と各心筋分化ステージで発現する転写因子群の発現を解析した。*GAPDH* と  $\alpha$ -tubulin はそれぞれの内部標準とした。

B、Control と CIBZ OE 由来の ES 細胞を用いて、EB 形成による分化誘導時における各遺伝子の発現量を qPCR により解析した。グラフは独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で表している。また、それぞれ内部標準として用いた *GAPDH* で転写レベルの補正を行った。グラフのアスタリスクは Student の *T* 検定より  $P < 0.05$  であることを示している。

C、Control と CIBZ OE 由来の ES 細胞を用いて、EB 形成による分化誘導時における各遺伝子のタンパク質の発現量をウェスタンブロッティングを行った。 $\alpha$ -tubulin は内部標準とした。



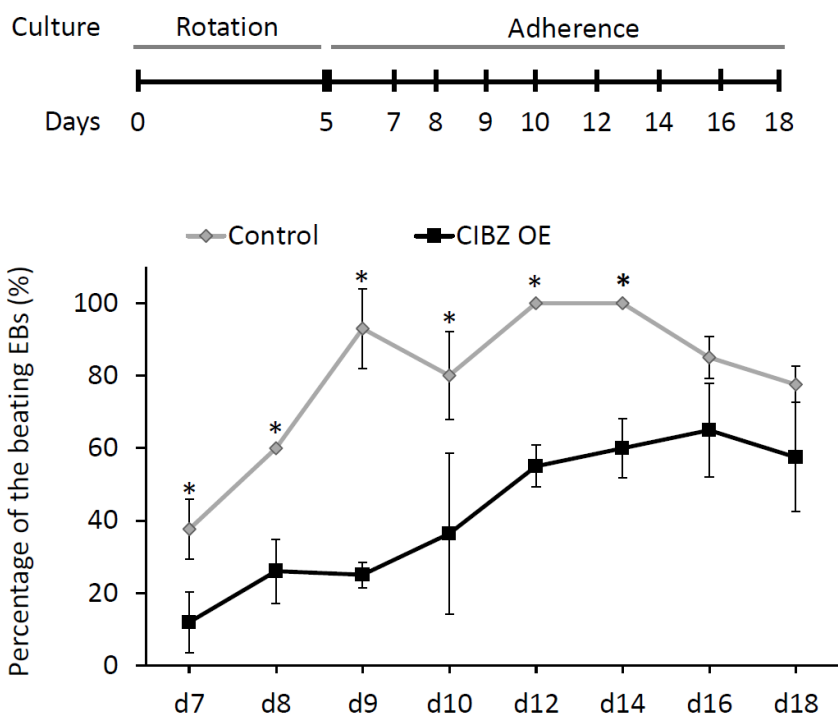


図 14 CIBZ の過剰発現は ES 細胞から心筋細胞への分化を抑制する

ES 細胞から EB を経て心筋細胞を分化する模式図 (上)。ES 細胞をサスペンション浮遊培養してか 5 日後に形成した個々の EB を、0.1% ゼラチンでコートした 24 ウェルプレートへ移すことで接着培養を行った。コントロールと CIBZ OE 由来の EB を 24 ウェルプレートへ接着培養させた後、自発的に拍動する心筋細胞が観察されたウェルをカウントして、その割合 (%) を示した (N=20 ウェル)。グラフは独立した 5 回の実験からの平均と標準偏差で表している。グラフのアスタリスクは Mann-Whitney *U* test より  $P < 0.05$  であることを示している。

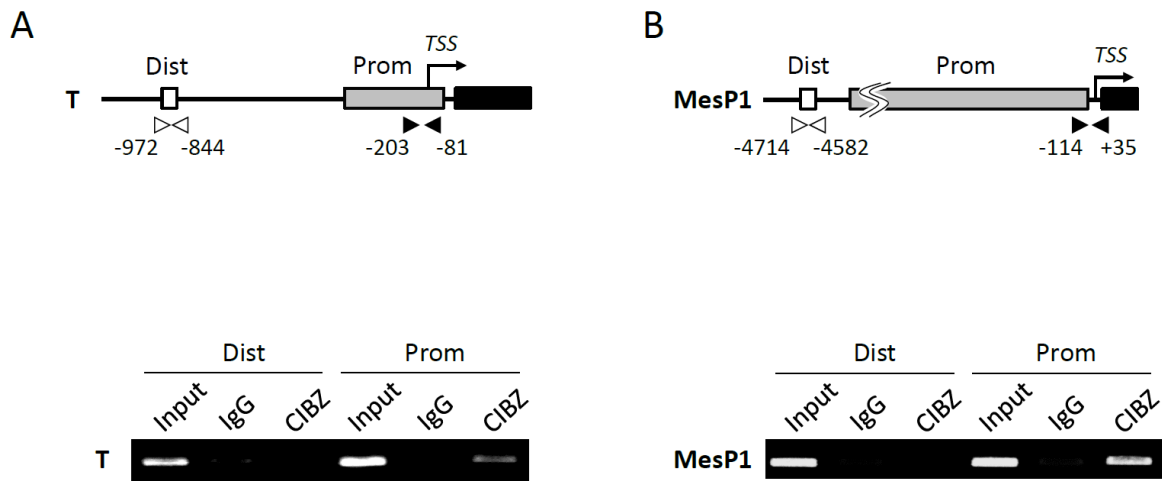


図 15 CIBZ は *T* と *Mesp1* のプロモーター領域に結合する

A、*T* プロモーターの模式図を示した。*T* のプロモーター領域は転写開始点 (TSS) の上流約 500 bp から 5' UTR を含む計 665 bp である。-81、-203、-844、-972 の数字はそれぞれ転写開始点からの距離を表している。白三角印と黒三角印は、それぞれ ChIP アッセイで用いた PCR プライマーの位置を示している。TSS: transcriptional start site; Dist, distal region; Prom, promoter region。

B、*Mesp1* プロモーターの模式図を示した。*Mesp1* の転写調節領域は TSS の上流約 4.6 kb までの広範囲な領域である。+35、-114、-4582、-4714 の数字はそれぞれ転写開始点からの距離を表している。白三角印と黒三角印は、それぞれ ChIP アッセイで用いた PCR プライマーの位置を示している。

*T* と *Mesp1* それぞれの ChIP アッセイの結果を A、B 模式図の下に示している。フィーダー細胞を取り除いた ES 細胞懸濁液にホルムアルデヒドを加えて DNA とタンパク質を架橋したものをサンプルとした。CIBZ 抗体は 2  $\mu$ g を使用し、ネガティブコントロールとして等量の Rabbit IgG を用いて免疫沈降を行った。

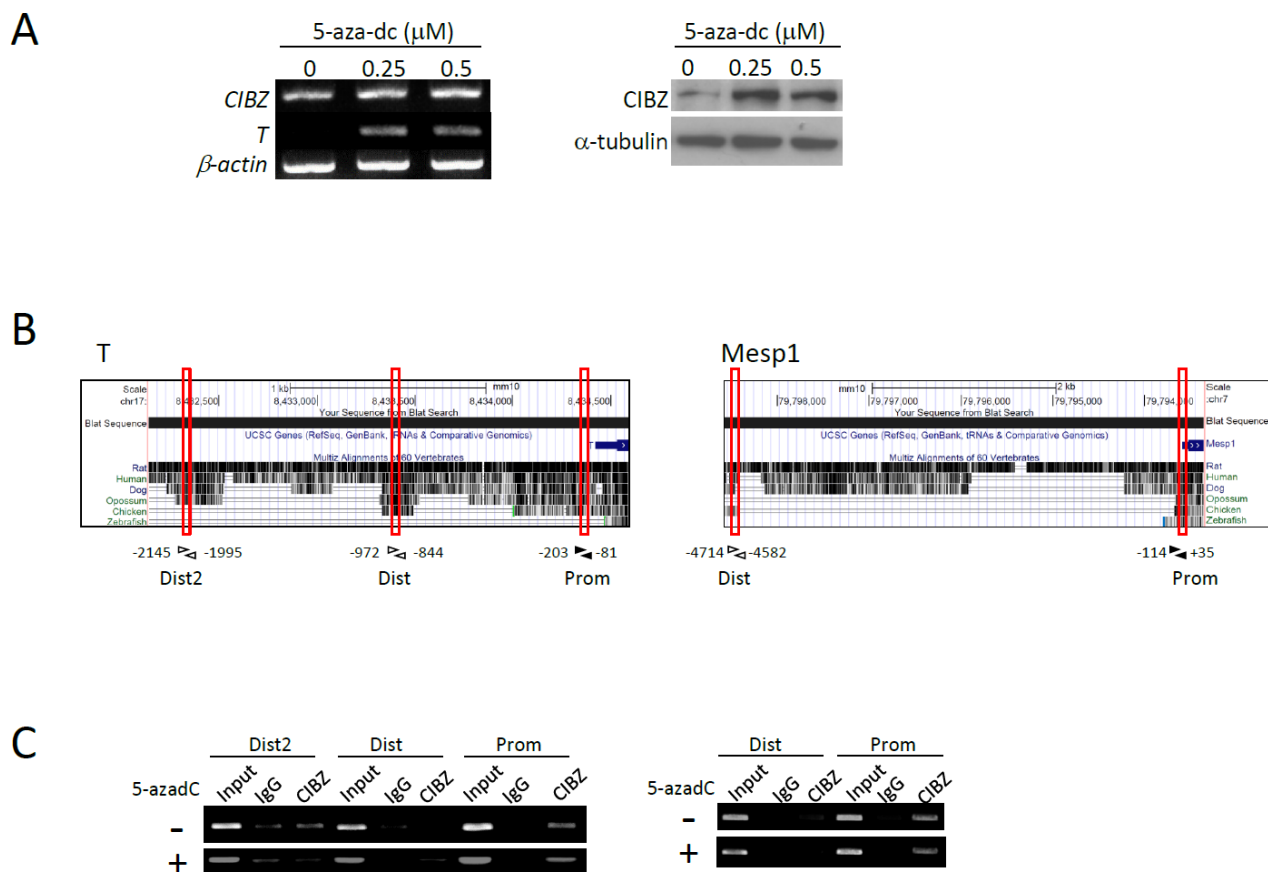
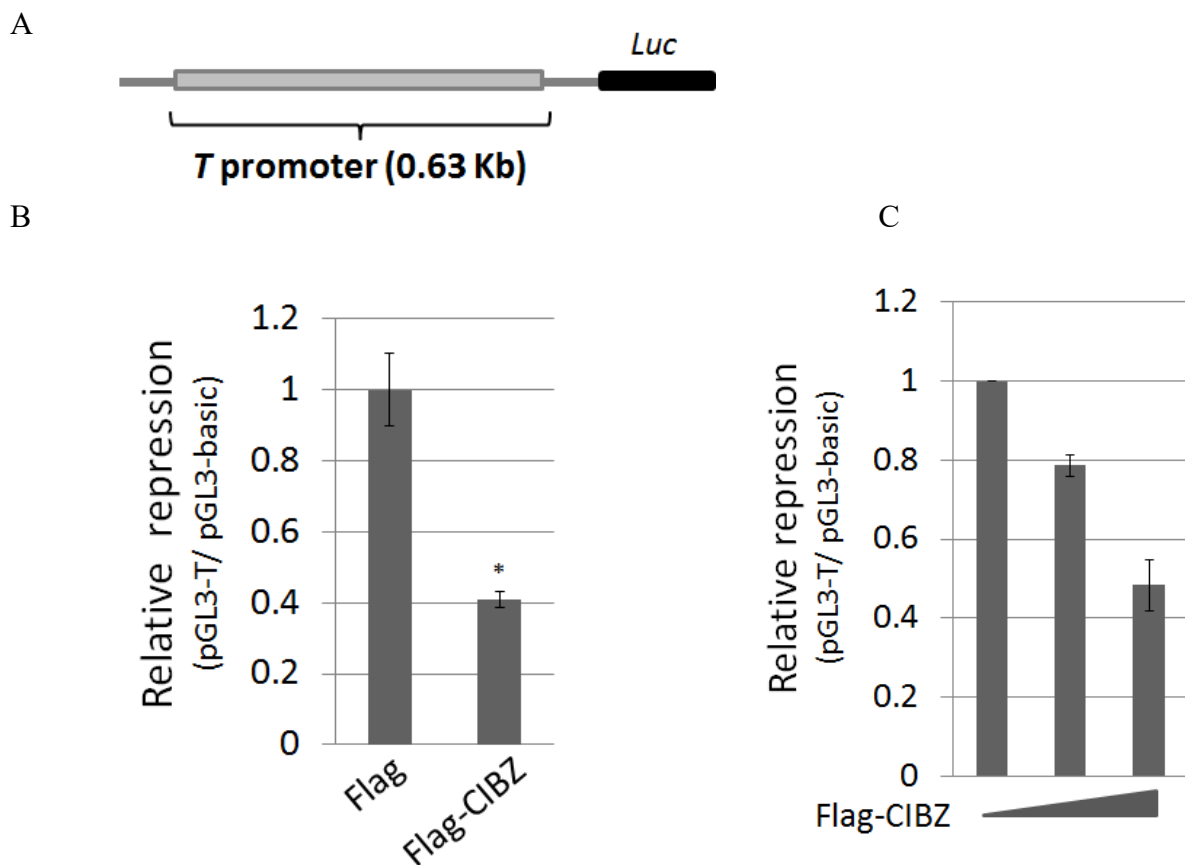


図 16 CIBZ は *T* と *Mesp1* のプロモーター領域への結合は DNA メチル化非依存的であることが示唆される

A、ES 細胞に図に示した各濃度の 5-azacytidine(5-aza-dC)を添加し、48 時間処理した後、細胞を回収して半定量 RT-PCR とウェスタンブロッティングにより CIBZ と T の mRNA とタンパク質の発現量を解析した。 $\beta$ -actin と  $\alpha$ -tubulin はそれぞれの内部標準とした。

B、*T* と *Mesp1* プロモーターの模式図 (BLAT search genome, UCSC Genome Bioinformatics より) を示している。ChIP アッセイで使用したプライマーペアの位置は赤の線で示している。Dist, distal region; Prom, promoter region。

C、0.5  $\mu$ M 5-aza-dC 未処理 (-) と処理 (+) した ES 細胞において、CIBZ が *T* と *Mesp1* のゲノムに結合するかどうかを ChIP アッセイの結果を示している。フィーダー細胞を取り除いた ES 細胞懸濁液にホルムアルデヒドを加えて DNA とタンパク質を架橋したものをサンプルとした。CIBZ 抗体は 2  $\mu$ g を使用し、ネガティブコントロールとして等量の Rabbit IgG を用いて免疫沈降を行った。



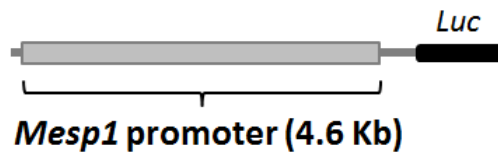
**図 17 CIBZ は *T* のプロモーターを抑制する**

A、レポーターアッセイに用いたコンストラクトの模式図を示した。マウス ES 細胞より抽出したゲノム DNA より、PCR にて増幅した 630 bp の *T* のプロモーター領域を pGL3 basic ベクターに挿入し、pGL3-*T* を作製した。

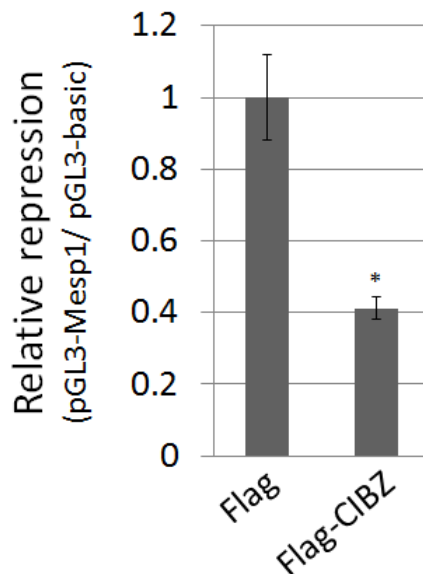
B、レポーターアッセイの結果を示した。HEK293T 細胞にレポーターの pGL3-basic または pGL3-*T*、そして Flag または Flag-CIBZ をコトランスフェクションし 48 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。レポーターアッセイの内部コントロールには pRL-TK (コントロールベクター) を用いた。グラフは独立した 6 回の実験からの平均と標準偏差で示している。グラフのアスタリスクは Mann-Whitney の *U* 検定より  $P < 0.05$  であることを示している。

C、Flag-CIBZ を 5, 20, 200ng と段階的に増加させたレポーターアッセイの結果を示した。HEK293T 細胞に pGL3-basic または pGL3-*T*、各濃度の Flag-CIBZ をコトランスフェクションし 48 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。レポーターアッセイの内部コントロールには pRL-TK (コントロールベクター) を用いた。グラフは独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で示している。

A



B



**図 18 CIBZ は *Mesp1* のプロモーターを抑制する**

A、レポーターアッセイに用いたコンストラクトの模式図を示している。マウス ES 細胞より抽出したゲノム DNA より、PCR にて増幅した 4.6 Kb の *Mesp1* のプロモーター領域を pGL3 basic ベクターに挿入し、pGL3-*Mesp1* を作製した。

B、レポーターアッセイの結果を示している。HEK293T 細胞にレポーターの pGL3-basic または pGL3-*Mesp1*、そして Flag または Flag-CIBZ をコトランスフェクションし 48 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。レポーターアッセイの内部コントロールには pRL-TK (コントロールベクター) を用いた。グラフは独立した 6 回の実験からの平均と標準偏差で示している。グラフのアスタリスクは Mann-Whitney の U 検定より  $P < 0.05$  であることを示している。

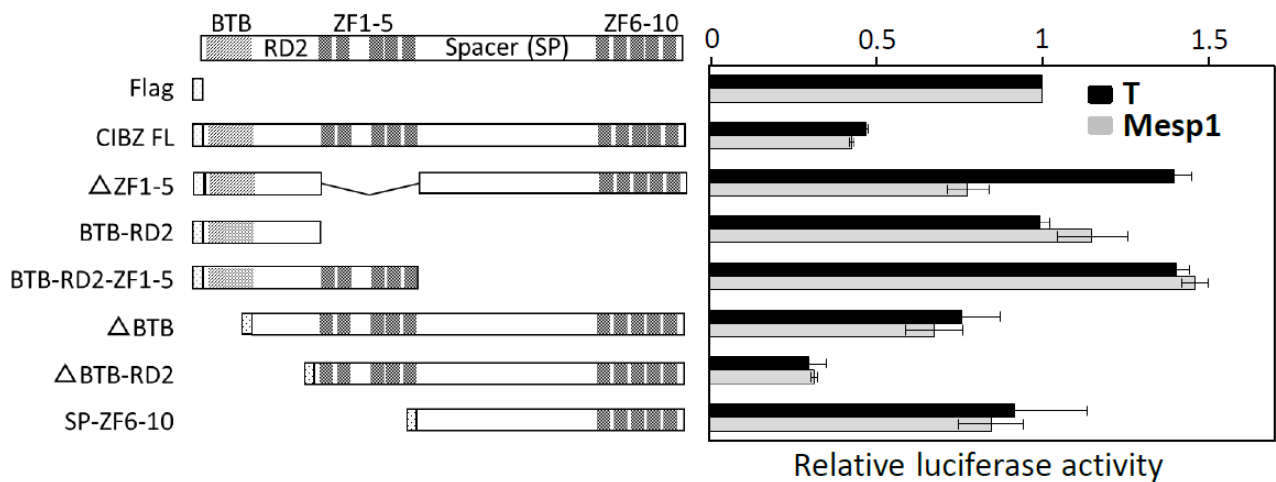


図 19 CIBZ による *T* と *Mesp1* の転写抑制には Zinc finger1-5 が必要である

Flag に融合した CIBZ の各種欠失変異体を用いて、pGL3-*T* と pGL3-*Mesp1* レポーターに対する影響を調べた。HEK293T 細胞にレポーター (pGL3-basic、pGL3-*T* と pGL3-*Mesp1*) と CIBZ の各種欠失変異体をコトランスフェクションし 48 時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。レポーターアッセイの内部コントロールには pRL-TK を用いた。グラフは Flag 単独の値を 1 とした時の相対的な抑制値を表している。グラフは独立した 3 回の実験からの平均と標準偏差で示している。

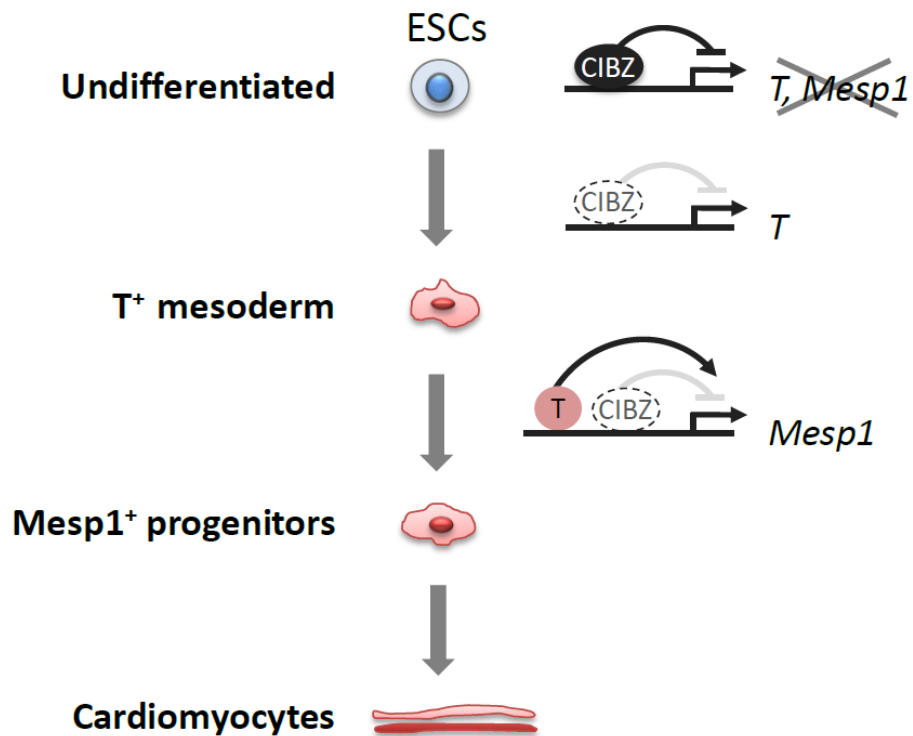


図 20 CIBZ が ES 細胞から心筋細胞への分化を制御するモデル

CIBZ の発現低下は ES 細胞から心筋細胞への分化に必要なモデル。未分化 ES 細胞において、CIBZ は *T* と *Mesp1* のプロモーターを抑制することでこの 2 つの転写を “off” にする。ES 細胞の分化に伴って、CIBZ タンパク質の発現低下による *T* と *Mesp1* への抑制が弱くなることでこの 2 つ遺伝子の発現が上昇して、中胚葉と心筋へと分化する。CIBZ の欠損或いは発現低下は ES 細胞の心筋への分化を促進することに対して、CIBZ の過剰発現はこの分化を抑制する。

## 7. 謝辞

本研究は奈良先端科学技術大学院大学、バイオサイエンス研究科、動物遺伝子機能学研究室において川市正史教授の下、行った研究成果をまとめたものである。

研究を行うにあたり、すばらしい環境と貴重なご助言を与えて下さった川市正史教授に心より御礼申し上げます。また、研究を進めるにあたり手厚くご指導を頂きました松田永照助教授に心より感謝と敬意の意を表します。セミナーなどを通じて有益なご助言を頂きました石田靖雅准教授、並びに北川教弘准教授、岡千緒助教授、研究員の福田七穂先生に深く御礼申し上げます。

中間報告の機会などで貴重なご助言を与えて下さった河野憲二教授及び加藤順也教授に心より感謝申し上げます。研究室の方々にも日々の生活を楽しく過ごさせて頂いたことに心から感謝致します。特に同じ研究グループであり、実験をサポートして下さった巖竹青君、小坂幸二君、向出史行君、Xu Fei さん、Antono Pangestu Hadi さん、西尾美紀さんには大変お世話になりました。深く御礼申し上げます。また、同期である白潔さん、Md. Zobaer Hasan さん、村越幹昭君、佐藤洋一君、林祐一君、後輩の Muthi Ikawati さん、豊田由美子さんには、研究のディスカッションだけでなく、研究生活を過ごす中での不安や悩みなどを相談できる良き友人として支え励まして頂きました。この場をお借りして、深く御礼申し上げます。最後に、これまで常に励まし、支えてきていただいた家族の皆様にも心より深く御礼申し上げます。



## 8. 参考文献

- Arnold, S.J., Stappert, J., Bauer, A., Kispert, A., Herrmann, B.G., Kemler, R. (2000). Brachyury is a target gene of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mech. Dev.* 91, 249-258.
- Avilion, A. A., Nicolis, S. K., Pevny, L. H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003). Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* 17, 126-140.
- Bergmann, O., Bhardwaj, R.D., Bernard, S., Zdunek, S., Barnabe-Heider, F., Walsh, S., Zupicich, Joel., et al. (2009). Evidence for Cardiomyocyte Renewal in Humans. *Science.* 324, 98-102.
- Berdasco, M., and Esteller, M. (2011). DNA methylation in stem cell renewal and multipotency. *Stem Cell Research & Therapy.* 2, 42-51.
- Boheler, K.R., Czyz, J., Tweedie, D., Yang, H.T., Anisimov, S.V., Wobus, A.M. (2002). Differentiation of pluripotent Embryonic Stem Cells Into Cardiomyocytes. *Circ. Res.* 91, 189-201.
- Bondue, A., Lapouge, G., Paulissen, C., Semeraro, C., Iacovino, M., Kyba, M., and Blanpain, C. (2008). *Mesp1* Acts as a Master Regulator of Multipotent Cardiovascular Progenitor Specification. *Cell Stem Cell.* 3, 69-84.
- Bondue, A., and Blanpain, C. (2010). *Mesp1*: A Key Regulator of Cardiovascular Lineage Commitment. *Circ. Res.* 107,1414-1427.
- Chambers, I., and Smith, A. (2004). Self-renewal of teratocarcinoma and embryonic stem cells. *Oncogene.* 23, 7150-7160.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., et al. (2007). Nanog safeguards pluripotency and mediates. *Nature* 450, 1230-1234.
- Chen, S.J., Zelent, A., Tong, J.H., et al. (1993). Rearrangements of the retinoic acid receptor alpha and promyelocytic leukemia zinc finger genes resulting from t(11;17) (q23;q21) in a patient with acute promyelocytic leukemia. *J. Clin. Invest.* 91, 2260-2267.

Chen, Z., Brand N.J., Chen, A., et al. (1993). Fusion between a novel Kruppel-like zinc finger gene and the retinoic acid receptor-alpha locus due to a variant t(11;17) translocation associated with acute promyelocytic leukaemia. *EMBO J.* 12, 1161-1167.

Cho, J.H., Kim, M.J., Kim, K.J., and Kim, J-R. (2011). POZ/BTB and AT-hook-containing zinc finger protein 1 (PATZ1) inhibits endothelial cell senescence through a p53 dependent pathway. *Cell Death Differ.* 19, 703-712.

Collins, T., Stone, J.R., and Williams, A.J. (2001). All in the Family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN Domains. *Mol. Cell. Biol.* 21, 3609-3615.

Costello, I., Pimeisl I-M., Drager, S., Bikoff, E.K., Robertson, E.J., Arnold, S.J. (2011). The T-box transcription factor Eomesodermin acts upstream of *Mesp1* to specify cardiac mesoderm during mouse gastrulation. *Nat. Cell Biol.* 13, 1084-1091.

Dansranjavin T, Krehl S, Mueller T, Mueller LP, Schmoll HJ, Dammann RH. (2009) The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes during differentiation. *Cell Cycle.* 8:916-924.

David, R., Jarsch, V.B., Schwarz, F., Nathan, P., Gegg, M., Lickert, H., and Franz, W.M. (2011). Induction of *MesP1* by Brachyury(T) generates the common multipotent cardiovascular stem cell. *Cardiovasc Res.* 92, 115-122.

Filion, G.J., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., Defossez. P.A. (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* 26, 169-181.

Fischbach, G.D. and Fischbach, R.L. (2004). Stem cells: science, policy, and ethics. *J Clin Invest.* 114, 1364-1370.

Fukuda, T., Yoshida, T., Okada, S., Hatano, M., Miki, T., Ishibashi, K., Okabe, S., Koseki, H., Hirose, S., Taniguchi, M., Miyasaka, N., Tokuhiya, T. (1997). Disruption of the *Bcl6* gene results in an impaired germinal center formation. *J. Exp. Med.* 186, 439-448.

Haraguchi, Seiki., Kitajima, Satoshi., Takagi, Atsuya., Takeda, H., Inoue, T., Saga, Y. (2001). Transcriptional regulation of *Mesp1* and *Mesp2* genes: differential usage of enhancers during development. *Mech. Dev.* 108, 59-69.

Ieda, M., Fu, J.D., Delgado-Olguin, P., Vedantham, V., Hayashi, Y., Bruneau, B.G., Srivastava,

D. (2010). Direct Reprogramming of Fibroblasts into Functional Cardiomyocytes by Defined Factors. *Cell*. 142, 375-386.

Kanai-Azuma, M., Gad, J. M., Tajima, Y., Taya, C., Kurohmaru, M., Sanai, Y., et al. (2002). Depletion of definitive gut endoderm in *Sox17*-null mutant mice. *Development*. 129, 2367-2379.

Kattman, S.J., Huber, T.L., Keller, G.M. (2006). Multipotent Flk-1<sup>+</sup> Cardiovascular Progenitor Cells Give Rise to the Cardiomyocyte, Endothelial, and Vascular Smooth Muscle Lineages. *Dev. Cell*. 11, 723-732.

Kiefer, H., Chatail-Hermitte, F., Ravassard, P., Bayard, E., Brunet, I., and Mallet, J. (2005). ZENON, a novel POZ Kruppel-like DNA binding protein associated with differentiation and/or survival of late postmitotic neurons. *Mol. Cell. Biol*. 25, 1713-1729.

Lei X, Deng Z, Zhang H, Zhao H, Zhou J, Liu S, Chen Q, Ning L, Cao Y, Wang X, Zhang X, Duan E. (2014). Rotary Suspension Culture Enhances Mesendoderm Differentiation of Embryonic Stem Cells Through Modulation of Wnt/ $\beta$ -catenin Pathway. *Stem Cell Rev and Rep*. 10, 526-538.

Li, Y., Yu, W., Cooney, A.J., Schwartz, R.J., and Liu, Y. (2013). Oct4 and Canonical Wnt Signaling Regulate the Cardiac Lineage Factor *Mesp1* through a Tcf/Lef-Oct4 Composite Element. *Stem Cells*. 31, 1213-1217.

Lindsley, R.C., Gill, J.G., Kyba, M., Murphy, T.L., and Murphy, K.M. (2006). Canonical Wnt signaling is required for development of embryonic stem cell-derived mesoderm. *Development*. 133, 3787-3796.

Liu, Y., Asakura, M., Inoue, H., Nakamura, T., Sano, M., Niu, Z., Chen, M., et al. (2007). *Sox17* is essential for the specification of cardiac mesoderm in embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 104, 3859-3864.

Loh, K.M., and Lim, B. (2011). A Precarious Balance: Pluripotency Factors as Lineage Specifiers. *Cell Stem Cell*. 8, 363-369.

Matsuda, E., Shigeoka, T., Iida, R., Yamanaka, S., Kawaishi, M., and Ishida, Y. (2004) Expression profiling with arrays of randomly disrupted genes in mouse embryonic stem cells leads to in vivo functional analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 101, 4170-4174.

Minami, I., Yamada, K., Otsuji, T.G., Yamamoto, T., Shen, Y., Otsuka, S., et al. (2012) A Small Molecule that Promotes Cardiac Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells under Defined, Cytokine- and Xeno-free Conditions. *Cell Rep.* 2, 1448-1460

Miotto, B., Chibi, M., Xie, P., Koundrioukoff, S., Moolman-Smook, H., Pugh, D., et al. (2014). The RBBP6/ZBTB38/MCM10 axis regulates DNA replication and common fragile site stability. *Cell.* 7, 575-587.

Nishii, T., Oikawa, Y., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E. (2012). CtBP-interacting BTB Zinc Finger Protein (CIBZ) Promotes Proliferation and G1/S Transition in Embryonic Stem Cells via Nanog. *J. Biol. Chem.* 287, 12417-12424.

Niwa, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of STAT3. *Genes Dev.* 12, 2048-2060.

Niwa, H., Miyazaki, J., and Smith, A. (2000). Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat. Genet.* 24, 372-376.

Oikawa, Y., Matsuda, E., Nishii, T., Ishida, Y., and Kawaichi, M. (2008). Down-regulated of CIBZ, a Novel Substrate of Caspase-3, Induces Apoptosis. *J. Biol. Chem.* 283, 14242-14247.

Oikawa, Y., Omori, R., Nishii, T., Ishida, Y., Kawaichi, M., and Matsuda, E. (2011). The methyl-CpG-binding protein CIBZ suppresses myogenic differentiation by directly inhibiting *myogenin* expression. *Cell Res.* 21, 1578-1590.

Qu, Yang., Whitaker, G.M., Hove-Madsen, L., Tibbits, G.F., and Accili, E.A. (2008). Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated 'HCN' channels confer regular and faster rhythmicity to beating mouse embryonic stem cells. *J. Physiol.* 586, 701-716.

Ramakrishna S, Suresh B, Lim K, et al. (2011) PEST motif sequence regulating human NANOG for proteasomal degradation. *Stem Cells Dev.* 20(9):1511-1511-9.

Rathjen, J., and Rathjen. P. (2001). Mouse ES cells: experimental exploitation of pluripotent differentiation potential. *Genes Dev.* 11, 587-594.

Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J., and Inoue, T. (1999). *Mesp1* is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single

heart tube. *Development*. 126, 3437-3447.

Sasai, N., Matsuda, E., Sarashina, E., Ishida, Y., and Kawaichi, M. (2005). Identification of a novel BTB-zinc finger transcriptional repressor, CIBZ, that interacts with CtBP corepressor. *Genes Cells*. 10, 871-885.

Sasai, N., Nakao, M. & Defossez, P. (2010) Sequence-specific recognition of methylated DNA by human zinc-finger proteins. *Nucl. Acids Res*. 38, 5015-5022.

Senyo, S.E., Steinhauser, M.L., Pizzimenti, C.L., Yang, V.K., Cai, L., Wang, M., et al. (2013). Mammalian heart renewal by pre-existing cardiomyocytes. *Nature*. 493, 433-436.

Shaffer, A.L., Yu, X., He, Y., Boldrick, J., Chan, E.P., Staudt, L.M. (2000). BCL-6 Represses Genes that Function in Lymphocyte Differentiation, Inflammation, and Cell Cycle Control. *Immunity*. 13, 199-212

Srivastava, D. (2006). Making or Breaking the Heart: From Lineage Determination to Morphogenesis. *Cell*. 126, 1037-1048.

Takeuchi, J.K., and Bruneau, B.G. (2009). Directed transdifferentiation of mouse mesoderm to heart tissue by defined factors. *Nature*. 459, 708-711.

Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A., Lim, B. & Rigoutsos, I. (2008) MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* 455, 1124-1128.

Yamaguchi, T.P., Takada, S., Yoshikawa, Y., Wu, N., and McMahon, A.P. (1999). T (Brachyury) is a direct target of Wnt3a during paraxial mesoderm specification. *Genes Dev*. 13, 3185-3190.

Yeyati, P.L., Shakhovich, R., Boterashvili, S., Li, J., Ball, H.J., Waxman, S., et al. (1999). Leukemia translocation protein PLZF inhibits cell growth and expression of cyclin A. *Oncogene*. 18, 925-934.

Vliet, P.V., Wu, S.M., Zaffran, S., and Puceat, M. (2012). Early cardiac development: a view from stem cells to embryos. *Cardiovasc Res*. 96, 352-362.

Wobus, A.M., Guan, K., Yang, H.T. & Boheler, K.R. (2002). Embryonic stem cells as a

model to study cardiac, skeletal muscle, and vascular smooth muscle cell differentiation.  
Methods Mol. Biol. 185, 127-156.