

論文の内容の要旨

論文題目

未分化 ES 細胞におけるポリピリミジン配列結合蛋白 PTB の機能解析

指導教官

吉田進昭教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 13 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

氏名 中武悠樹

マウス胚性幹 (Embryonic Stem : ES) 細胞は、胚盤胞の内部細胞塊より樹立された細胞株である。ES 細胞を他の胚盤胞に移植すると、キメラマウスを作製できることから、全ての細胞系譜に分化することのできる多能性を有していると考えられる。しかし、ES 細胞を未分化な状態に保つためにどのような分子機構が必要なのかは、未だに不明な点が多い。マウス ES 細胞は、Leukemia Inhibitory Factor (LIF) を培地に添加することで未分化状態を維持でき、その活性は下流のシグナル伝達因子である STAT3 の活性化により置き換えることが可能である

が、ヒト ES 細胞は LIF もしくは STAT3 シグナル依存的に未分化状態を保つことができていない。また、転写因子 Oct-3/4 や、ホメオボックス因子 Nanog が ES 細胞を未分化な状態に保つために必要である事が明らかとなつてはいるが、LIF シグナルとの接点は未だ不明である。未分化状態を維持するために必要な、これらの既知因子を用いて、分化した細胞から多分化能を有した細胞に脱分化させることはできておらず、個々の因子間の関連性も不明であるため、未分化状態を構築するために必要十分な分子機構は未だ明らかとなつていない。このため、これらの既知遺伝子の上流および下流で機能する因子を同定・解析し、未分化状態の維持に必要な分子機構の全容を明らかにしてゆく必要があると考えられる。

本研究では Rox-1 と名付けられた未知因子を探索・同定し、その機能解析を行った。Rox-1 は、*Rex-1* 遺伝子の転写調節領域に存在する Oct-3/4 結合部位のごく近傍に配列特異的に結合し、*Rex-1* 遺伝子の転写を制御すると示唆されていた。この Rox-1 の DNA 結合能は ES 細胞や胚性奇形腫 F9 細胞において検出され、その結合能はレチノイン酸 (Retinoic acid: RA) による分化誘導で減弱することが示されていたが、遺伝子として同定されておらず、機能の詳細は不明であった。

Rox-1 結合配列に対する DNA 結合能を指標とすることで、未分化状態の細胞抽出液を分画精製した。精製画分中に含まれるアミノ酸配列を解析したところ、RNA 結合性因子として知られる polypyrimidine tract binding (PTB) タンパクであることが明らかとなった。PTB 組み換えタンパクを作製し、その DNA 結合能を解析した結果、精製画分中に含まれる DNA 結合能と同等の配列特異性を有していることが明らかとなった。次にレポーター遺伝子を用いて、*Rex-1* 遺伝子の転写制御領域を解析した。その結果、PTB が結合する Rox-1 結合配列を欠失させると転写活性は減少するが、その領域を PTB が結合することのできる変異型の配列に置換しても転写活性に変化が無いことが示された。これらのことは

PTB が *Rex-1* 遺伝子の転写制御領域に直接的に結合し、下流の *Rex-1* 遺伝子の発現を制御することを示唆している。この知見を検証するため、siRNA を用いて内在性 PTB の発現を抑制し、*Rex-1* 遺伝子の発現量に変化がおきるかを検討した。PTB に対して特異的な siRNA を導入した ES 細胞では、*PTB* mRNA の発現量は抑制され、PTB の標的遺伝子と想定される *Rex-1* mRNA の発現量も減少することが明らかとなった。この ES 細胞は未分化状態を維持した形態を有し、*Oct-3/4* mRNA の発現量は維持されていたことから、ES 細胞が分化することで間接的に *Rex-1* 遺伝子が抑制されたのではないと考えられる。これらのことから、PTB は *Rex-1* 遺伝子の発現を直接的に制御する因子であり、報告されていた *Rox-1* の有力な候補因子であると考えられる。

PTB の発現抑制を行った ES 細胞では、興味深いことに、*Nanog* も *Rex-1* と同様に mRNA の発現量が減少した。このことは、PTB は *Rex-1* のみならず *Nanog* の発現制御に関与することを示唆する。そこで、*Nanog* 遺伝子上流に存在する約 1.8 k b の配列を段階的に欠失させたレポーター遺伝子を用いて、*Nanog* 遺伝子が未分化な細胞特異的に発現するために必要な領域を同定した。その制御領域は (5'-TCCCTCCCTCCC-3') というピリミジンに富む配列を含んでおり、PTB はこの配列に結合した。これらのことから、PTB は *Rex-1* 遺伝子のみならず *Nanog* 遺伝子の転写調節領域にも結合し、遺伝子発現を直接的に制御すると考えられる。

Rex-1 および *Nanog* 遺伝子は、未分化状態の ES 細胞を RA で分化させると発現が抑制されることが知られているため、これらの転写制御領域に結合する PTB の DNA 結合能は、分化状態により変化することが想定される。ES 細胞内に含まれる PTB の DNA 結合能を解析した結果、そのシグナルは未分化状態で強く、RA による分化により減弱した。しかし、PTB の mRNA やタンパク質の発現量は、ES 細胞を RA により分化させても大きく変化しなかった。そこで、

PTB タンパク自体が質的な制御を受けることを想定し、ES 細胞の抽出液を等電点電気泳動および SDS-PAGE にて二次元的に展開した後、PTB タンパクの分布を解析した。その結果、未分化状態の ES 細胞には、RA により分化した ES 細胞には見られないスポットが酸性側に検出された。他の等電点と比べ、この未分化状態に特徴的なスポットを含む等電点から得られた画分は、PTB を含む DNA 結合能を高く有していた。これらのことから、PTB タンパクは未分化状態特異的な修飾を受けることで DNA への結合能を獲得すると考えられた。未分化状態の ES 細胞の細胞抽出物をアルカリフォスファターゼにて処理すると、PTB の持つ DNA 結合能が減弱した。これらのことから、PTB は未分化状態特異的な修飾を受けることによって DNA 結合能を獲得し、その修飾はリン酸化修飾であることが示唆される。

本研究は、PTB が未同定であった *Rox-1* と多くの共通点を有していることを見だし、未分化状態の ES 細胞における *Rex-1* および *Nanog* 遺伝子の発現に関与することを示した。この PTB の機能は、PTB タンパクが特異的な修飾を受けることによって発揮されると考えられる。今後、この特異的な修飾がどのような分子により制御されるのかを解明する必要がある。本研究で行った PTB の発現抑制は、下流の遺伝子発現には影響が見られたが、ES 細胞の分化状態には影響が見られなかった。PTB が ES 細胞の未分化状態維持に必要であるかを解明するためには、PTB 欠損 ES 細胞の樹立とその表現型の解析が求められる。

本研究によりもたらされた知見は、未分化状態の ES 細胞における PTB の重要性を示すとともに、その機能を解析してゆく礎になると考えられる。