

論文の内容の要旨

論文題目 ホメオボックス遺伝子 *CrxOS* の ES 細胞の
自己複製・多分化能に果たす役割の解明

氏名 齊藤 亮太

【はじめに】

マウス胚性幹(ES)細胞は、受精後 3.5 日のマウス胚に存在する内部細胞塊から樹立される幹細胞で、自らと同じ細胞を作る自己複製能と、すべての体細胞や生殖細胞へ分化する多分化能を持つ。この能力は ES 細胞に特異的なものであり、多くの転写因子の関与が知られている。本研究では、ES 細胞の自己複製能と多分化能に関与する遺伝子をさらに見出すために、ES 細胞に特異的に発現し、転写因子のドメインの一つであるホメオボックスを持つ遺伝子を探索した。その結果、*CrxOS* (cone-rod homeobox opposite strand) ホメオボックス遺伝子を見出した。本研究では、ES 細胞の自己複製能と多分化能における *CrxOS* の役割を解析したので報告する。

【結果】

1. *CrxOS* の ES 細胞特異的 EST データベース上の発現はきわめて高い

私は、まず、EST (Expression Sequence Tag) データベースを遺伝子探索に利用した。EST データベースには、240 種類のマウスホメオボックス遺伝子が登録されていた。このうち、ES 細胞に特異的に発現するものは、その遺伝子の EST の総数(Nall)に占める、3.5 日胚由来または ES 細胞由来の EST の数(Nes)の割合(Nes/ Nall)を算出すれば、その値が比較的高いことが期待される。そこで、私は、

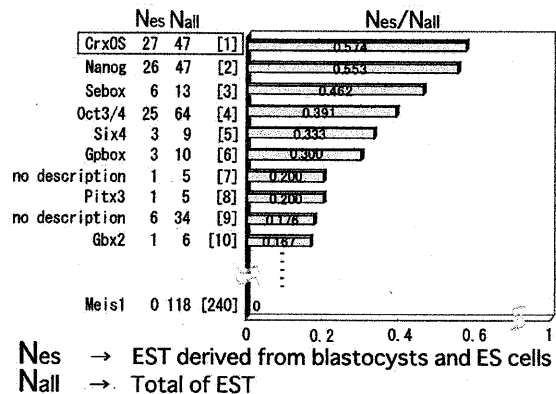


表1 ES細胞由来のESTの割合が高いホメオボックス遺伝子

240 種類のマウスホメオボックス遺伝子に関してこの値を算出し、得られた値の高い順に遺伝子を並べた。その結果、*CrxOS* ホメオボックス遺伝子が、最も高い値を示した(表1)。このようにして、*CrxOS* が ES 細胞特異的転写因子の候補として同定された。

2. ES 細胞では *CrxOS short* が発現している

CrxOS は、long と short の2種類のスプライシングアイソフォームが存在し、マウス網膜上でその mRNA が発現していることが報告されていたが、ES 細胞や 3.5 日胚での発現や機能は不明であった。そこで、まず、*CrxOS short* と *CrxOS long* の共通の部分ペプチドを

抗原として抗体を作製した(図1-a)。次に、*CrxOS short* と *CrxOS long* の泳動距離を調べた。

(図1-b)。そして、上記の抗体を用いて、ES 細胞のライセートに対してウェスタンブロットを行ったところ、*CrxOS short* の泳動距離に特異的なバンドが検出され、*CrxOS long* の泳動距離には特異的なバンドは検出されなかった。(図1-c)。このことから、ES 細胞ではおもに *CrxOS short* が発現していることが見出された。

3. *CrxOS* は ES 細胞に特異的に発現する

次に私は、EST データベース解析の結果から予測されるように、*CrxOS* が ES 細胞に特異的に発現するかを調べるため、RT-PCR 法により、ES 細胞、ES 細胞を分化誘導させた細胞、マウス受精後 3.5 日胚、9.5-12.5 日胚、成体マウスの各臓器で、*CrxOS* の発現の程度を検討した。その結果、未分化な細胞が多く含まれる精巢を除けば、ES 細胞や、ES 細胞の由来である 3.5 日胚でのみ *CrxOS* の発現が見出された(図2)。このことから、*CrxOS* が ES 細胞に特異的に発現することが示された。

4. *CrxOS short* は LIF 除去時の ES 細胞の分化に抑制的に働く

ES 細胞の分化にともない *CrxOS* の発現が消失することから、私は、*CrxOS short* が ES 細胞の分化を抑制している可能性を考えた。そこで、ES 細胞から未分化維持因子の LIF (leukemia inhibitory factor) を除去した状態でも、*CrxOS short* を過剰発現させると分化が抑制されるかを検討した。その結果、*CrxOS short* の発現により、未分化な細胞の指標である、丸い盛り上がったコロニーが多く残存すること(図3-a)、さらに、ES 細胞の特徴である高い増殖能が保たれたままになること(図3-b)が見出された。これらのことから、*CrxOS short* が ES 細胞の分化を抑制する可能性が示唆された。

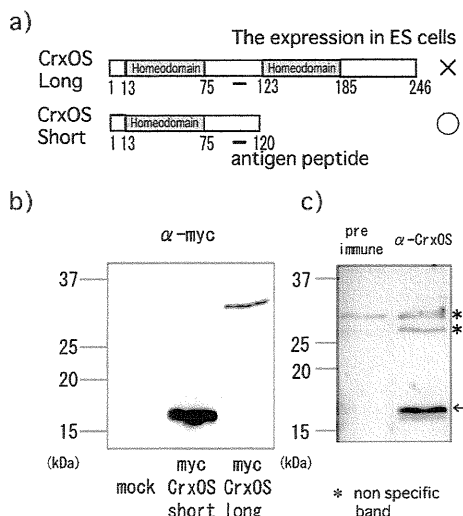


図1 *CrxOS long* と *CrxOS short* の一次構造とES細胞での発現

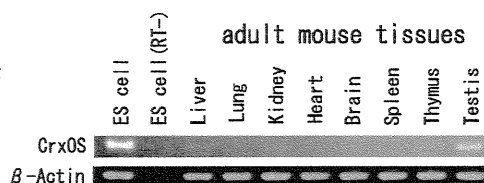


図2 *CrxOS* の発現分布

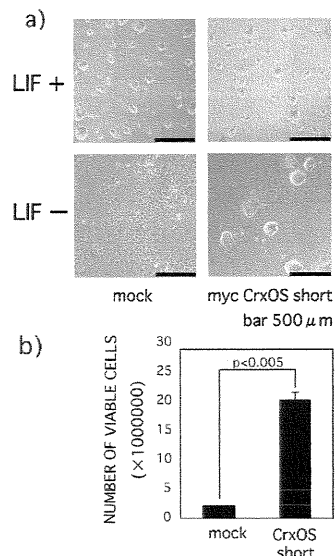


図3 LIF除去時のES細胞分化における *CrxOS short* 過剰発現の影響の検討

5. CrxOS short は ES 細胞の正常な自己複製および、*foxd3* の発現に必要である

CrxOS が多分化能をもった ES 細胞の自己複製に必要なかどうかを検討するために、RNAi 法により ES 細胞で *CrxOS* を発現抑制したところ、生存細胞数が減少することを見出した。また、この生存細胞数の減少は RNAi 非感受性の *CrxOS short* の過剰発現により救助されることを見出した(図4)。このことから、*CrxOS short* が ES 細胞の生存細胞数維持に必要であり、ES 細胞の正常な自己複製に必要であることが示された。

次に、*CrxOS* ノックダウン時の生存細胞数の減少がどのような過程で生じているかを調べるために、ES 細胞の自己複製に必要であることが知られているいくつかの転写因子の発現の変化を調べた。その結果、*CrxOS* ノックダウン時に、*oct3/4* や *nanog* 遺伝子の発現に変化は認められなかったが、*foxD3* の発現の低下が認められた(図5)。また、*CrxOS* ノックダウン時には、LIF 除去時に見られるような扁平な細胞のような目立った形態変化は観察されなかった。このことから、まず *CrxOS* が *foxD3* の発現に必要であることが示唆された。*foxD3* は ES 細胞の自己複製に必要であることが知られているので、*CrxOS* ノックダウン時に自己複製に異常が生じる一因として、*foxD3* の発現低下が考えられる。また、*CrxOS* ノックダウン時に未分化な細胞のマーカーである *oct3/4* や *nanog* の発現に変化が見られないことと、目立った形態変化が見られないことから、*CrxOS* ノックダウン時には ES 細胞の未分化状態は変化していない可能性が示唆された。

【まとめと考察】

本研究で私は、EST データベース解析により、ES 細胞に特異的に発現する転写因子の候補として、*CrxOS* 着目し、1) ES 細胞では *CrxOS long* ではなく、おもに *CrxOS short* が発現していること、2) *CrxOS* の発現分布が ES 細胞に特異的であること、3) *CrxOS short* が LIF 除去時の ES 細胞の分化に抑制的に働くこと、4) *CrxOS short* が ES 細胞の正常な自己複製に必要であること、さらに、5) *foxD3* の発現に必要であることを示唆した。

以上の結果をまとめると、図6のようなモデルが想定される。LIF 存在下の未分化な ES 細胞で、*CrxOS short* は高い増殖能の維持と分化の抑制に関与するが、*CrxOS short* を必要としない何らかの分化抑制因子が存在するため、*CrxOS short* をノックダウンしても分化は抑制

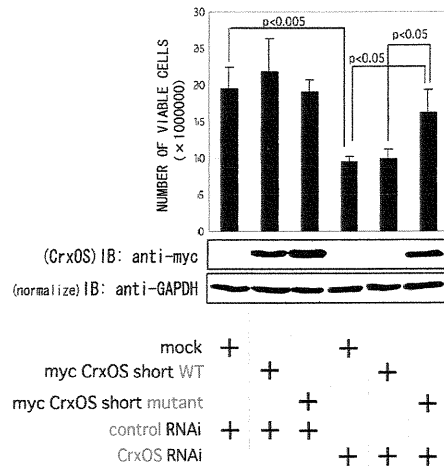


図4 ES細胞の自己複製における *CrxOS short* の必要性の検討

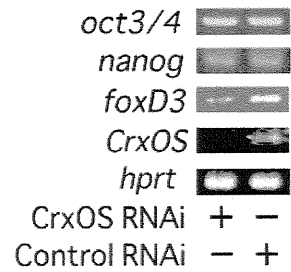


図5 *CrxOS* ノックダウン時の ES細胞の自己複製に必要な転写因子の発現の変化

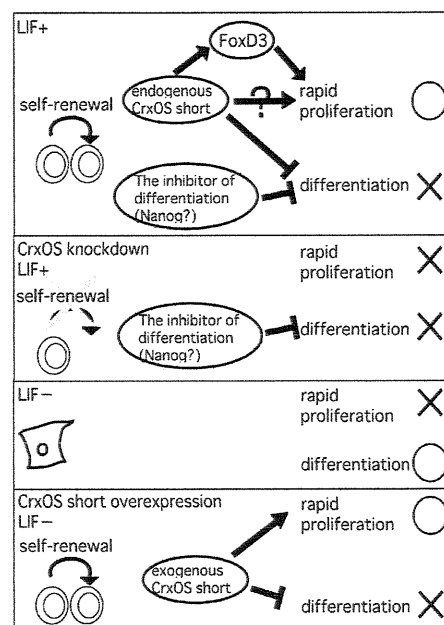


図6 ES細胞の自己複製能と多分化能における *CrxOS short* の役割

されたままである。LIF 除去時には、そのような別の分化抑制因子が発現しなくなるが、CrxOS short の単独発現は、分化の抑制、および、高い増殖能の維持に十分であると考えられる。*foxD3* は ES 細胞の自己複製に必要であるが、*foxD3(-/-)* のマウス内部細胞塊では、未分化な ES 細胞のマーカーである Oct3/4 の発現が正常であることが報告されており、FoxD3 は ES 細胞の分化抑制には必須ではない。それ故、CrxOS short が ES 細胞の自己複製に必要である要因の 1 つは、*foxD3* の発現維持を通してであると考えられる。

これまで、多くの転写因子が ES 細胞の自己複製能と多分化能の維持に関与することが報告されているが、それらの転写因子と CrxOS short の DNA 結合ドメインの比較から、その標的遺伝子は互いに異なると予測している。よって、本研究は ES 細胞の自己複製能と多分化能を維持するために CrxOS short が制御する新しい転写経路の可能性を示した点で意義深いと考えている。