

# 論文内容の要旨

## 論文題目

遺伝子トラップ法を用いた未分化細胞の分化制御を担う膜局在タンパク質の探索

(Gene trap screening of membrane bound proteins involved in the regulation of pluripotent stem cell differentiation)

氏名 岡江 寛明

## 要旨本文

哺乳類の体を構成する全ての細胞は、胚盤胞期に見られる1種類の未分化細胞から、細胞間相互作用を介して分化誘導される。本研究では膜局在タンパク質に着目し、未分化細胞の分化制御を担う新規因子の網羅的探索を行った。

### ① 未分化細胞の分化制御を担う膜局在タンパク質の探索

胚性幹細胞 (ES 細胞) において、分泌トラップ法と ES 細胞の胚体外組織への分化誘導系を併用し、未分化細胞に強発現する膜局在タンパク質の網羅的探索を行った。分泌トラップ法とは、スプライシングアクセプター (SA)、CD4 膜貫通ドメイン (TM)、マーカー遺伝子 ( $\beta$ -gal-hyg、 $\beta$ -galactosidase と hygromycin phosphotransferase の融合タンパク質をコード)、ポリ A シグナル (pA) を持つトラップベクターを用い、分泌シグナルを持つ遺伝子を特異的に破壊する方法である (図 1)。破壊された遺伝子 (トラップされた遺伝子) はトラップベクター内の配列を利用することで容易に特定することができ、さらにトラップされた遺伝子の発現パターンを、マーカー遺伝子を用いて解析可能である。ES 細胞にトラップベクターを導入後、ES 細胞を転写因子の強制発現により胚体外組織へと分化誘導し、分化後に発現量の減少する遺伝子の選択を行った (図 2)。

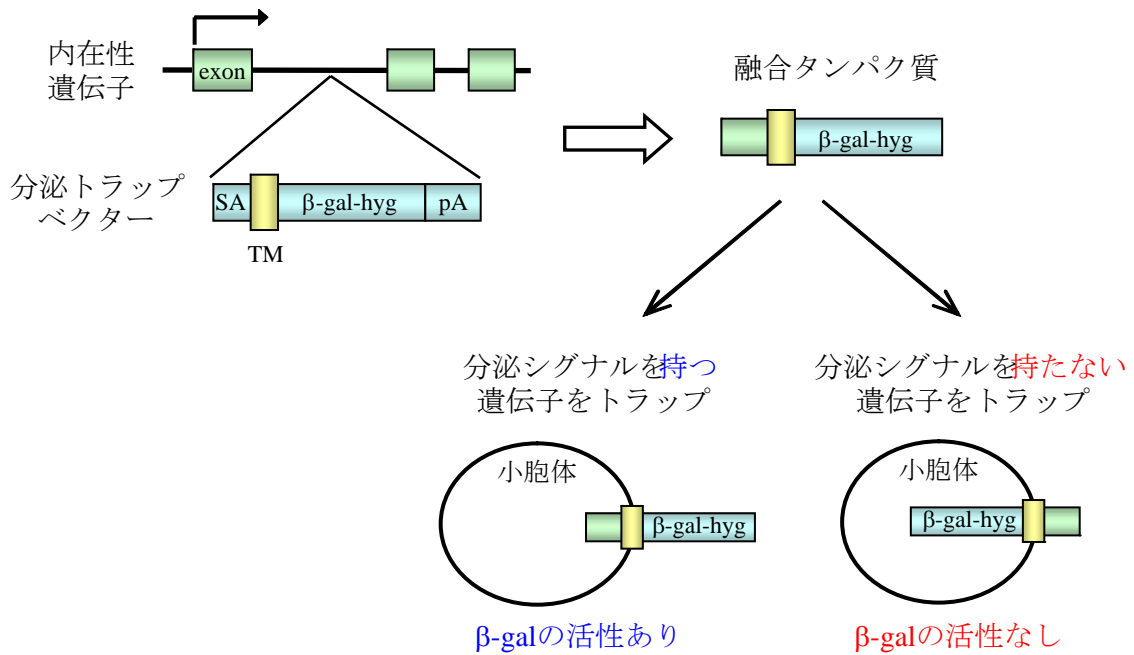


図1 分泌トラップ法

分泌シグナルを持つ遺伝子をトラップしたときのみ $\beta$ -gal が活性を持つことを利用し、膜局在タンパク質の濃縮を行うことが出来る。

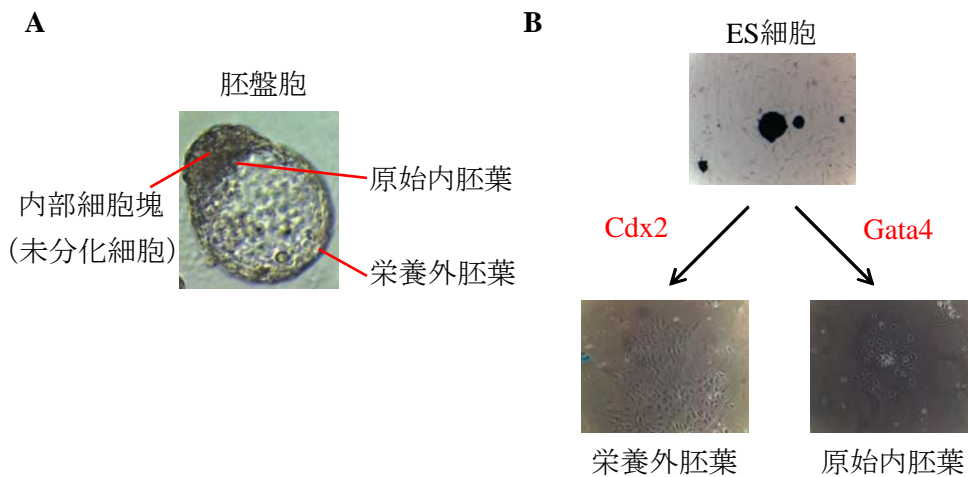


図2 ES細胞の胚体外組織への分化誘導

- A. 着床前の胚盤胞期胚。内部細胞塊と、胚体外組織（原始内胚葉、栄養外胚葉）から成る。
- B. トラップベクターを導入したES細胞の分化誘導例。転写因子 *Cdx2* もしくは *Gata4* の強制発現により胚体外組織へと分化誘導後、X-gal染色を行った。このクローンでは分化誘導により $\beta$ -galの発現量が減少している。

分泌トラップ法により得られた約 1000 の ES クローンをスクリーニングし、ES 細胞で強発現し、膜局在タンパク質をコードする 26 遺伝子に変異を導入した。このうち KO マウスが作製されておらず、シグナル伝達に関与すると考えられる 3 遺伝子について KO マウスを作製したところ、2 遺伝子で致死となった。この結果を含めると、得られた 26 遺伝子中 16 遺伝子について KO マウスの表現型が報告されており、このうち 13 遺伝子で劣性致死となる。さらに、4 遺伝子が未分化細胞の分化制御に必要な因子であった。よって、分泌トラップ法と分化誘導系の併用により、未分化細胞の分化制御を担う遺伝子および発生に必須な遺伝子を、高効率で探索・破壊することが可能である。

## ② *Gβ1* KO マウスの解析

作製した KO マウスのうち、最も発生の初期に異常が見られた *Gβ1* KO マウスについてより詳細な解析を行った。*Gβ1* は三量体型 G タンパク質のβサブユニットをコードし、G タンパク質共役受容体 (GPCR) の下流のシグナル伝達に関与する。*Gβ1* の発現は胚盤胞期においては未分化細胞に特異的であった。また、胎生 10.5 日胚においては神経管で強く発現しており (図 3-A)、*in vitro* で培養した神経前駆細胞でも強い発現が見られた。*Gβ1*<sup>-/-</sup>胚の発生異常の有無を解析したところ、胚盤胞期においては大きな異常は見られなかったが、胎生中期において約 40% が神経管閉鎖異常を示した (図 3-B)。

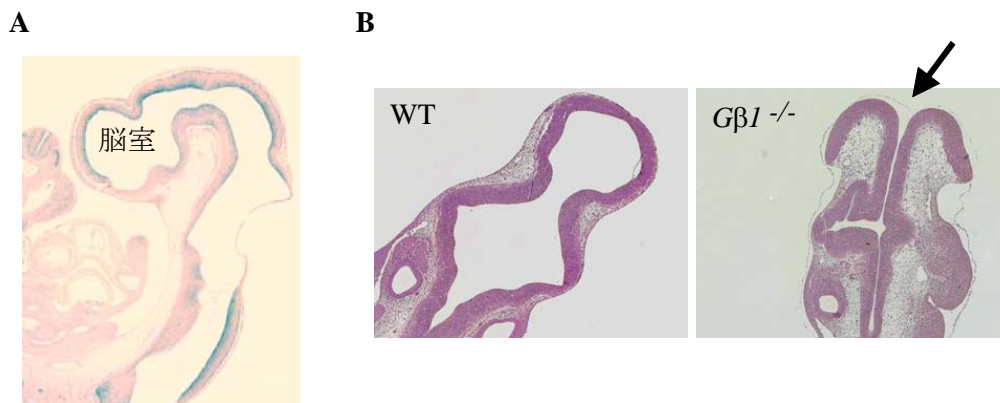


図 3 *Gβ1*<sup>-/-</sup>マウスにおける神経管閉鎖異常

- A. 胎生 10.5 日胚における *Gβ1* の発現解析。*Gβ1*<sup>+/-</sup>胚を X-gal 染色した。
- B. 胎生 10.5 日胚の切片の H&E 染色。矢印は神経管閉鎖異常部分を示す。

また、神経管閉鎖異常を示さない個体においても大脳皮質の萎縮および神経前駆細胞の増殖異常が見られ (図 4)、全ての  $G\beta 1^{-/-}$  マウスは呼吸異常などを伴い、出生後 2 日以内に致死となった。さらに、神経管閉鎖や神経前駆細胞増殖を制御することが知られている GPCR リガンドにより神経前駆細胞を刺激したところ、 $G\beta 1^{-/-}$  細胞では WT と比べ ERK のリン酸化が抑制されていた (図 5)。以上から、 $G\beta 1$  は神経前駆細胞で機能し、GPCR の下流で神経発生を制御していると考えられる。

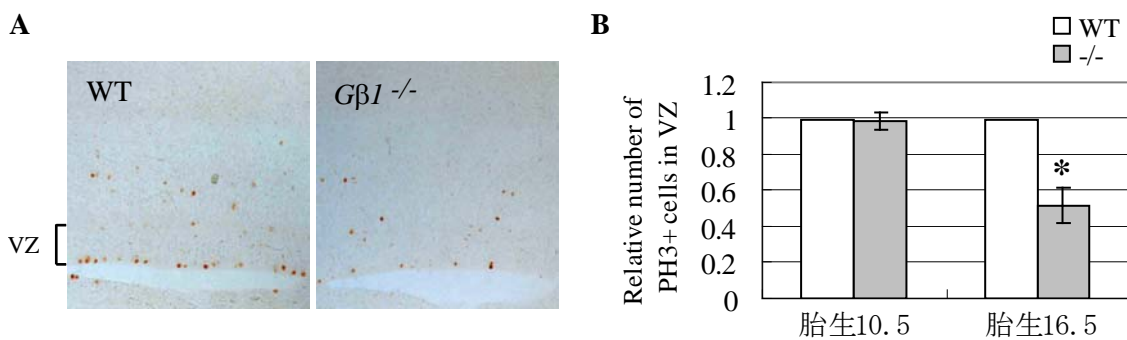


図 4  $G\beta 1^{-/-}$  マウスにおける神経前駆細胞の増殖異常

- A. 胎生 16.5 日胚における神経前駆細胞増殖解析。大脳切片を抗リン酸化 histone H3 抗体 (PH3、細胞分裂 M 期のマーカー) を用いて染色した。VZ (Ventricular zone、脳室領域)
- B. VZ 中の PH3 陽性細胞数。WT を 1 としたときの相対的な値を示す。

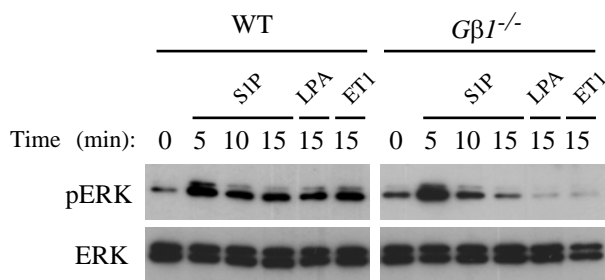


図 5  $G\beta 1^{-/-}$  神経前駆細胞における GPCR リガンドへの応答性低下

神経前駆細胞において、GPCR リガンドによる ERK の活性化を解析した。GPCR リガンドで刺激後、リン酸化 ERK (pERK) をウェスタンブロッティングによって検出した。S1P (Sphingosine-1-phosphate)、LPA (Lysophosphatidic acid)、ET1 (Endothelin-1)