

幹細胞自己複製における転写因子活性化機構

1. はじめに

哺乳動物の幹細胞は、生体内では周囲の微小環境(ニッチ)からのシグナルを受け、自己複製する。「自己複製の維持」あるいはその破綻である「分化」を決定するのは核内の転写因子ネットワークであると考えられるが、幹細胞がニッチからどのシグナルを受け、どのように核内に伝わって転写レベルの作用するのかは大部分が不明である。この原因は、ニッチシグナルが、細胞接着や液性因子など極めて多岐にわたる原因から発せられ、一つ一つのシグナルの寄与度は小さいものの、それらが相乗効果となって転写因子を介して下流遺伝子群を制御するためと考えられよう。したがって、ニッチから受ける複雑なシグナルを明らかにしていくためには、逆方向の視点から、すなわち転写因子の活性制御からも解析を進める必要があるだろう。

核外からのシグナル伝達経路の示唆として、SoxメンバーのHMGドメインには、核移行シグナルと核外輸送シグナル配列が全ファミリーメンバーに共通して存在することがわかっており、Sox10では核外輸送シグナルは転写活性化に必須であることがわかっている(Rehberg et al., 2002)。

しかし、細胞質においてこれらSoxタンパク質がどのような修飾・活性制御を受けるのかは全く不明である。本研究ではSox2をモデルタンパク質として、核外において受ける制御モードの探索を行った。

2. 方法

ES細胞はゼラチンコートシャーレ上で、フィーダー非存在下、LIF (ESGRO, Chemicon) 1000U/ml、10%血清存在下で培養を行った。無血清培地には、培地1は10%KSR+1 μ M ACTH (Genes to Cells 9:471-477, 2004)、培地2はN2B27+3i培地 (Nature 453:519-23, 2008) を用いた。トランスフェクションはLipofectamine 2000 (Invitrogen) を用いたリポフェクション法にてメーカー指定の方法で行った。

3. 結果

Sox2の核外修飾がその活性に必須かを検証するため、*Sox2*ノックアウトES細胞のレスキュー実験を行った。その結果、核外移行シグナルを変異させた*Sox2*L77Aではレスキュー活性が大きく低下した。

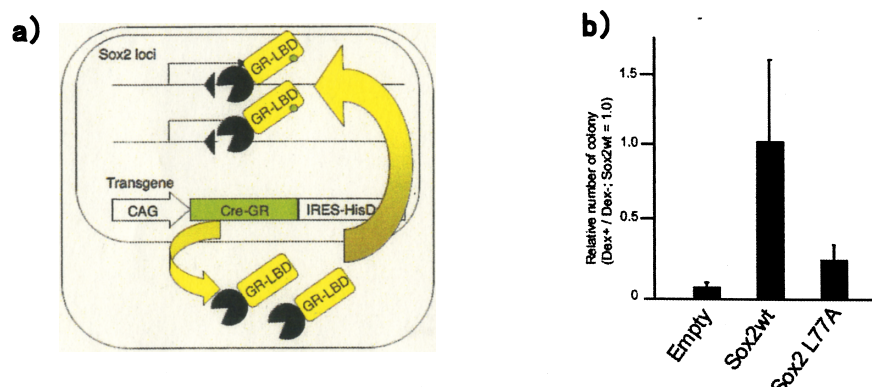


図1. Sox2核外移行シグナルは未分化性維持に必須である

a) *Sox2*誘導的ノックアウトES細胞。Dexamethasone添加により内在遺伝子座を欠失する (Masui et al., 2007)。b) レスキューアッセイ。野生型のコロニー数を1とした。

酵母ツーハイブリッドスクリーニング法を用いて、*Sox2*と結合するタンパク質遺伝子のスクリーニングを行った結果、Plk1やRanbp9などが候補として見出された。

次に、細胞外環境が*Sox2*タンパク質に量的な変動を与えるかを検証した。2つの異なる培地で培養し、*Sox2*のタンパク質量とmRNA量を比較した。その結果、培地2ではmRNAが上昇するにもかかわらずタンパク質量は減少することがわかった。

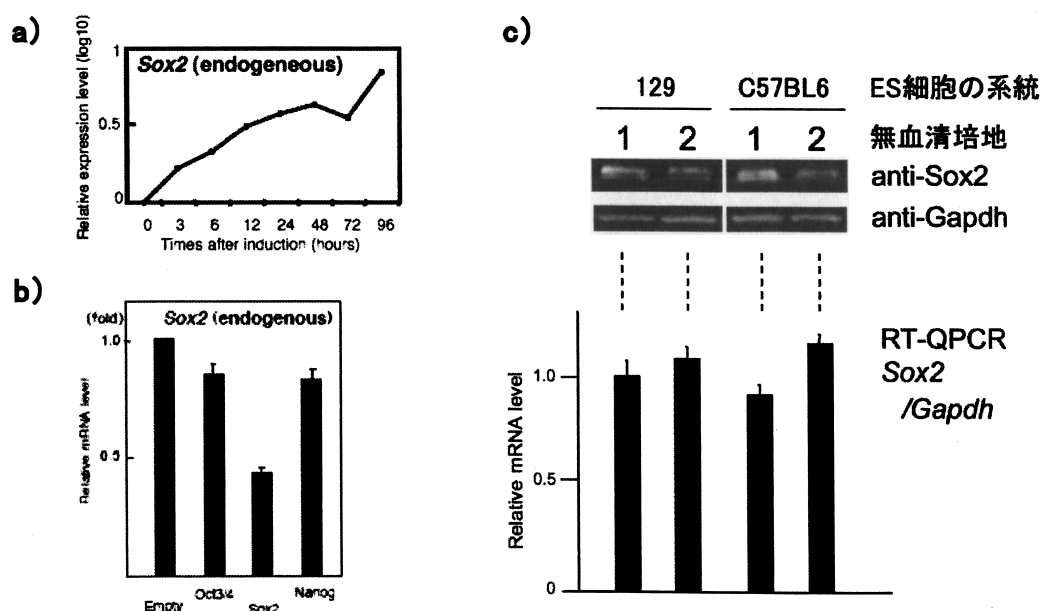


図2. 細胞外環境からのシグナルによるSox2タンパク質の量的制御機構が存在する

a) Sox2ノックアウトに伴い、内在Sox2発現量は上昇する。b) Sox2強制発現によって内在Sox2発現量は減少する。合わせると、Sox2はネガティブフィードバックにより自己の発現を抑制している。c) 培地2ではSox2タンパク質量が減少する。系統の大きく異なるES細胞で同じ結果を得た。

今後のSox2活性解析に指標とする目的において、もっとも確からしいSox2ダイレクトターゲットを絞り込むため、マイクロアレイ解析データおよびクロマチン免疫沈降解析データのメタアナリシスによって検証を行った(発表論文)。その結果、Oct3/4やNanogとオーバーラップする一群の直接下流遺伝子を同定した。

4. 考察

本研究ではSox2の核外でのシグナルがその活性維持に必要なこと、および細胞外環境のシグナルがタンパク質量の維持に必要なことの示唆を得た。後者の分子機構としては、培地1に含まれるACTHがSox2タンパク質を安定化させているか、あるいは培地2に含まれるGSK3betaおよびERKの阻害剤がSox2タンパク質の消化を行う可能性が考えられる。

5. 発表論文;

Sharov AA, Masui S, et al. Identification of Pou5f1, Sox2, and Nanog downstream target genes with statistical confidence by applying a novel algorithm to time course microarray and genome-wide chromatin immunoprecipitation data. BMC Genomics. 9:269, 2008

参考文献;

Kim I et al., Cell. 130:470-83, 2007

Masui S et al., Nat Cell Biol. 9:625-35, 2007

Miyagi S et al., FEBS Lett. 582:2811-5, 2008

Rehberg S et al., Mol Cell Biol. 22:5826-34, 2002