

ES 細胞の増殖と細胞周期における
転写因子 CIBZ の機能解析

西井 友教

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能研究室

(川市 正史 教授)

平成 24 年 1 月 20 日提出

目次

	ページ番号
1. 序論 (表 1 と図 1～5 を含む)	3-16
2. 材料と方法	17-25
3. 結果 (図 6～29 を含む)	26-54
4. 考察 (今後の研究課題を含む) (図 30 と 31 を含む)	55-62
5. 謝辞	63
6. 参考文献	64-68

序論

ES 細胞の研究の重要性

地球誕生から最初に生命が誕生したのは、約 40 億年前と言われている。そのころから既に生物は DNA を遺伝子とし、後世に自分自身の設計図を伝え続けてきた。しかし、遺伝子の本体が、DNA であることを発見したのはわずか 70 年ほど前のオズワルド・セオドア・アベリーらによる。さらに、ジェームズ・ワトソン博士とフランシス・クリック博士により、DNA の構造が 2 重らせん構造であることが判明したのが 1953 年である。それから、約 60 年後の現在では、ヒトの皮膚細胞に遺伝子を発現させることで、細胞を初期化し、ES 細胞 (Embryonic Stem cell, 胚性幹細胞) のように未分化性状態の細胞である iPS 細胞 (induced Pluripotent Stem cell, 人工多能性幹細胞) を作り出すことができるようになった (Takahashi et al., 2007)。さらに、マウスの実験では iPS 細胞を用いることで、生殖細胞を含むすべての細胞と組織に分化し、新たな生命を作り出すことにも成功し、iPS 細胞の多分化能を証明した (Takahashi and Yamanaka, 2006)。

近年では、これらの発見も後押しをして iPS 細胞以外の幹細胞である ES 細胞や AS 細胞 (Adult Stem cell, 体性幹細胞) の研究が盛んに行われ、目覚ましい成果を挙げている。幹細胞は、多分化能を保ちつつほぼ無限に細胞増殖させることができるため、哺乳類の発生の分子メカニズムの解明や再生医療の実現へ向けた医学、及び生物学研究への理解や応用に非常に重要である。臨床応用に向けて、まずは細胞を用いて基礎研究が行われる。その際、細胞の増殖性、多分化能、安定性の 3 つの特性が優れていることが非常に重要である。ES 細胞は他の幹細胞よりもこの 3 つの特徴が優れているため、倫理性や拒絶反応などの短所があるが、頻繁に基礎研究で使用されている (表 1)。1998 年にヒト ES 細胞が樹立され、再生医療の応用への期待が一気に高まったが、15 年以上前の 1981 年には、すでにマウス ES 細胞は樹立され、それ以後細胞増殖や多分化能などの研究が、ヒト ES 細胞以上に盛んに行われ続けている。

しかし、細胞増殖や多分化能に関して不明な点が多いのも現状で、更なる ES 細胞の特性のメカニズムの解明は、非常に重要である。

マウス ES 細胞の特徴

マウスの受精卵は卵割を繰り返して、3.5 日で胚盤胞 (ブラストシスト) へとなる。この胚盤胞の ICM (Inner cell mass, 内部細胞塊)、あるいは 4.5 日目

のエピブラストと呼ばれる部分には、将来的に胎仔を構成する多分化能を有する細胞が含まれる。この ICM、あるいはエピブラストから樹立された細胞を ES 細胞という。

マウス ES 細胞は、「自己複製能」と「多分化能」の 2 つの重要な特性を持っている (Evans and Kaufman, 1981 ; Martin, 1981)。未分化性状態を維持しつつ、無限に細胞増殖できる能力が自己複製能である。特定の条件で ES 細胞を様々な細胞に分化させると、内胚葉、外胚葉、中胚葉の全ての細胞種に分化できる能力が多分化能である。ES 細胞の多分化能に関して、分化誘導方法や分化誘導因子に関する知見が多く、その詳細なメカニズムについては報告が多い。

その一方、ES 細胞の自己複製能の特徴に一番重要である細胞増殖については報告が少ない。

マウス ES 細胞の自己複製能と多分化能における転写因子の機能

マウス ES 細胞の自己複製能と多分化能において中心的な役割を果たす重要な転写因子は、Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor 3/4)、Sox2 (SRY-box containing gene 2)、Nanog (Tir nan Og) が知られている。Oct3/4 は、多分化能を有する未分化性状態の細胞に特異的な発現を示し、ES 細胞ではわずかな発現の増減が、特定の分化方向へ誘導するため、発現量が厳密にコントロールされており、現在まで報告された転写因子の中で、最も重要である (Niwa et al., 2000)。Sox2 は、ES 細胞で高い発現を示し、Oct3/4 と協調して様々な標的遺伝子の発現を制御することで ES 細胞の特性の維持に重要である (Avilion et al., 2003)。Nanog は、ES 細胞で高い発現を示す重要な転写因子であり、未分化性状態維持に必須である LIF (Leukaemia inhibitory factor, 白血病阻害因子) 非存在下において、Nanog を過剰発現した ES 細胞は長期間未分化性状態を維持する特性がある (Chambers and Smith, 2004)。

ES 細胞の自己複製能と多分化能において、これら 3 つの転写因子の重要性は、ヒト iPS 細胞への作製に使用されていることからわかる。京都大学の山中伸弥教授が、ヒトの皮膚細胞に発現させた 4 つの遺伝子は Oct3/4、Sox2、c-Myc、Klf4 であり、またアメリカのウィスコンシン大学のジェームズ・トムソン教授が使用した 4 つの遺伝子は Oct3/4、Sox2、Nanog、LIN28 である。よって、ES 細胞の状態が転写により強く制御されており、3 つの転写因子は、ES 細胞で活発に働く上流の転写因子で、ES 細胞の自己複製能と多分化能へ重要である。

Oct3/4 と Sox2 は、遺伝子を欠損させると、ES 細胞が分化することから、ES 細胞の未分化性状態の維持に必須であることが報告されている(Niwa et al., 2000 ; Avilion et al., 2003)。その一方、Nanog 遺伝子を欠損させても Oct3/4 と Sox2 の発現に変化がなく、ES 細胞は未分化性状態を維持したままであることから、Nanog は ES 細胞の未分化性状態の維持に必須でないことが判明した(Chambers et al., 2007)(図 1)。ES 細胞において、Oct3/4 と Sox2 の遺伝子発現は、恒常的に「ON」の状態であることに対して、Nanog の遺伝子発現は、「ON」と「OFF」の状態が観察される。Nanog 遺伝子の発現量の変化が、遺伝子発現における二者択一の選択状態を作り、未分化性状態を制御している。つまり、Nanog 遺伝子を欠損する(Nanog が「OFF」の状態になる)ことで、未分化性を制御しやすい安定な状態から、未分化性を制御しにくい不安定な状態へと可逆的に遷移を起こしている。Nanog は「OFF」の状態において未分化性状態を維持しているが、外部の分化刺激で、ES 細胞は速やかに分化する。

Nanog 遺伝子を欠損した ES 細胞は、細胞増殖が抑制され、逆に Nanog 遺伝子の過剰発現は細胞増殖を促進することから、Nanog は ES 細胞の増殖に重要であることが報告されている(Liu et al., 2008 ; Zhang et al., 2009 ; Chen et al., 2011)(図 2)。Nanog が細胞増殖を促進させるのは ES 細胞に限らず、造血幹細胞とマウス繊維芽細胞においても、Nanog の過剰発現は、これらの細胞増殖を促進することが知られている(Zhang et al., 2005 ; Tanaka et al., 2007)(図 2)。PI3K/AKT シグナル経路、Wnt/ β -catenin シグナル経路、BMP4 シグナル経路などが ES 細胞の増殖に関与することが知られている。シグナル伝達阻害剤を用いた研究から、ES 細胞の増殖には PI3K/AKT シグナル経路のみが必須であることが判明している(Paling et al., 2004)。PI3K/AKT シグナル経路の阻害剤を添加すると、Nanog タンパク質の発現が減少することから、Nanog はこの経路で機能することが判明している(Storm et al., 2007)。

Nanog が ES 細胞の増殖に関与しており、Nanog の発現制御の解明は ES 細胞の増殖機構への理解と解明に非常に重要である。

Nanog の発現制御

Nanog 遺伝子の発現は、Oct3/4 と Sox2、そして Nanog 自身を含む多くの転写因子によって、転写制御を受けている(Kim et al., 2008)。その一方、Nanog の転写後の修飾に関しては、報告が少ないことから不明な点が多い。最近の研究で、Nanog タンパク質の発現は、ポリユビキチン化修飾を受けることで、ユビキチン-プロテアソーム経路によって制御されていることが報告されている

(Ramakrishna et al., 2011)。また、異性化酵素である Pin1 (Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1) は、リン酸化された Nanog タンパク質と結合することで Nanog のユビキチン化を抑制し、Nanog タンパク質を安定化する転写後の修飾メカニズムも知られている (Moretto-Zita et al., 2010)。さらに、miRNA-134 (micro-RNA-134) は、転写後の修飾メカニズムを介して、Nanog の発現を制御している (Tay et al., 2008)。

しかし、現在までに、転写因子が、転写後の修飾で Nanog タンパク質の発現を制御している報告は知られていない。

マウス ES 細胞の増殖における細胞周期の特徴

ES 細胞の増殖は、様々なシグナル経路と関連する転写因子により厳密に制御され、その中核を成すのが細胞周期制御である。マウス ES 細胞の増殖は、体細胞と比較すると、顕著に速いことが特徴として挙げられる。これは、体細胞と比較して細胞の倍加時間は約半分と極めて短く、G1 期に占める細胞の割合が非常に少なく、S 期に占める細胞の割合が多いことに起因する (White et al., 2005)。細胞周期は、Cyclin と Cdk (Cyclin-dependent kinase, サイクリン依存性キナーゼ) の複合体によって制御されている。この複合体が各細胞周期で働く標的タンパク質をリン酸化することで、細胞周期を厳密に調節している。

細胞が増殖する際には、G1 期から S 期への移行の制御が重要である。体細胞において、CyclinD-Cdk4 複合体と CyclinE-Cdk2 複合体の 2 つの複合体が、G1 期から S 期への移行を制御している (White et al., 2005)。その一方、マウス ES 細胞において、CyclinD-Cdk4 複合体の発現はほとんど検出されず、CyclinE-Cdk2 複合体は恒常的に発現していることから、この複合体が G1 期から S 期への移行に重要であることが示唆されている (White et al., 2005 ; Neganova and Lako, 2008 ; Neganova et al., 2009)。実際、CyclinE-Cdk2 複合体は、マウス ES 細胞の G1 期から S 期の移行に必須であることが判明した (Koledova et al., 2010) (図 3)。

ヒト ES 細胞でも Nanog の過剰発現が、G1 期から S 期への移行を加速し、ES 細胞の増殖を促進していることが判明している (Zhang et al., 2009)。最近の研究で、マウス ES 細胞において Nanog の発現低下は、G1 期から S 期への移行を遅延させることで、細胞増殖を抑制することが判明した (Chen et al., 2011)。

現状では、ES 細胞の増殖における G1 期から S 期への移行を制御する転写因子の数が少なく、これらの過程の分子メカニズムに不明な点が多い。よって、これらの過程を制御する新規の転写因子の同定は非常に重要である。

転写因子 CIBZ (CtBP-interacting BTB zinc finger protein) の特徴

これまで当研究室において、マウス新規 BTB ドメインを有する zinc finger 転写因子 CIBZ を RT-PCR 法より初めて同定し、この遺伝子がマウス ES 細胞を含む様々な細胞や成体の各組織でユビキタスに発現することを明らかにした (Sasai et al., 2005) (図 4)。CIBZ は BTB (broad-complex, tramtrack, bric a brac) ドメインと 10 個の zinc finger を有していることから、転写因子として機能していることが予想された。zinc finger は、ゲノム中で最も多く見出される DNA 結合モチーフの一つで、このモチーフを持つタンパク質の内、5~10% は BTB ドメインを有する (Collins et al., 2001)。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ことが分かっている (Albagli et al., 1995)。BTB ドメインは、酵母からヒトまで保存されており、このドメインを持つタンパク質は数多く報告されている。その多くが zinc finger や leucine zipper といった DNA 結合モチーフを持つタンパク質の N 末端側に存在している (Albagli et al., 1995 ; Collins et al., 2001)。CIBZ は、N 末端側から BTB ドメイン、中央部と C 末端側に 5 個ずつの合計 10 個の zinc finger を持つ。CIBZ の中央部の 3~5 番目の zinc finger が、メチル化された CpG ジヌクレオチドと結合する。GAL4 を用いたレポーターアッセイ法の結果から、BTB ドメインは転写抑制機能を持ち、2 つの zinc finger クラスタ間の spacer ドメインは転写促進機能を持つことが確認されている (Sasai et al., 2005)。CIBZ は、N 末端側の PLDLR 結合モチーフを介して、初期胚の発生、細胞死、腫瘍形成などに重要な機能を持つコリプレッサーの CtBP (C-terminal binding protein) と結合する (Sasai et al., 2005)。過剰発現した CIBZ は、ペリセントロメアヘテロクロマチンに局在し、CtBP をこの領域にリクルートすることも判明している (Sasai et al., 2005)。

BTB zinc finger タンパク質は、ヒトやマウスでは約 50 種類存在するが、その大部分は、転写制御機構や成体での機能に関してほとんど不明である。よって、CIBZ の機能解析は非常に重要である。

国内（当研究室）における CIBZ に関する研究

これまで国内で唯一 CIBZ の研究をしている当研究室において、転写因子 CIBZ について、マウスの骨格筋の幹細胞である筋芽細胞を用いた研究報告をしている(図 5A-B)。筋芽細胞は、*in vitro* 系において、低血清で培養すると一部の細胞は細胞死を引き起こし、残りの細胞は、細胞分化へ誘導され、細胞同士が互いに融合し、細胞が繊維状になった筋管細胞を形成する。この分化モデルはよく知られている。

CIBZ は、細胞死マーカーである cleaved caspase-3 の発現を制御して、筋芽細胞に細胞死を誘導すること、CIBZ は骨格筋分化決定因子 myogenin の転写を、プロモーター上の CpG のメチル化に依存的に抑制して、筋芽細胞の骨格筋分化を制御していることも判明した(Oikawa et al., 2008 ; Oikawa et al., 2011)。

国外における CIBZ に関する研究

CIBZ のオーソログに関しては、以下の 3 つのことが他のグループにより報告されている。

一つ目は、CIBZ のラットのオーソログである ZENON(Zinc finger gene expressed in neurons)は、成熟した神経細胞の神経伝達物質の合成に関わる tyrosin hydroxylase 遺伝子のプロモーター上に存在する E-box に、zinc finger の 1~5 番目を介して結合し、この遺伝子の転写を「正」に制御していることを報告している(Kiefer et al., 2005)。二つ目は、CIBZ のヒトのオーソログである ZBTB38 (Zinc finger and BTB domain containing protein 38) は、メチル化された CpG に結合する新規のメチル化 CpG 結合タンパク質であることを報告している(Filion et al., 2006)。BTB zinc finger タンパク質は、約 50 種類ある中でメチル化された CpG に結合することが報告されているのは、ZBTB4、ZBTB33(Kaiso)、ZBTB38 の 3 種類のみである。ZBTB33(Kaiso)の機能解析が進む一方、ZBTB4 と ZBTB38 の機能解析はほとんど行われていない。ZBTB33(Kaiso)は、メチル化された CpG に結合して転写を制御する場合と、メチル化された CpG との結合に関係なく、タンパク質間相互作用を介して p120 カテニンと直接結合して、機能する場合が知られている。三つ目は、ヒトの身長における調査と SNP(Single nucleotide polymorphism, 一塩基多型)とを比較すると、ZBTB38 の SNP は、既知の身長に関連する他の遺伝子の SNP と比較して、ヒトの身長との相関が一番高いことが報告されている(Gudbjartsson et al., 2008)。

マウス ES 細胞における CIBZ とメチル化との関係

国内(当研究室)及び国外の研究から、CIBZ は zinc finger の 3~5 番目で、メチル化された CpG に結合して、転写を制御することが明らかにされている。

CpG にメチル基を修飾する酵素として Dnmt(DNA methyltransferases, DNA メチル化酵素) 1、3a、3b の 3 種類が知られている(Bestor, 2000)。Dnmt1 は、DNA 複製の際に生じた娘鎖のように片側のみメチル化された CpG を認識して、メチル化する維持メチル化酵素として機能する(Chuang et al., 1997)。Dnmt3a と 3b は、胚形成時の DNA のメチル化パターン構築の際のように、新たにメチル基を付加する酵素として機能する(Okano et al., 1999)。3 つの酵素の遺伝子すべてのノックアウトマウスでは、胎生致死であることから、マウス初期胚の発生や分化段階で重要な機能を担っていることが明らかになっている(Li et al., 1992 ; Jackson-Grusby et al., 2001)。

3 つの遺伝子を欠損したマウス ES 細胞を分化誘導すると細胞死が誘導されることから、DNA のメチル化は ES 細胞の分化にも必須であることが判明した。しかし、3 つの遺伝子を欠損したマウス ES 細胞は、未分化性状態を維持したまま、無限に細胞増殖を行うことができることから、自己複製能(細胞増殖)には必須でないことがわかった(Tsumura et al., 2006)。

3 つの遺伝子を欠損した ES 細胞は、ゲノム全体において、ほとんど CpG がメチル化されていない。メチル化 CpG 結合タンパク質の CIBZ は、メチル化 CpG に結合できないことが推測される。つまり、ES 細胞の増殖において CIBZ は標的遺伝子のプロモーター上のメチル化された CpG に結合するメチル化依存的に機能せず、DNA のメチル化非依存的に機能すると考えられる。

本研究の目的(マウス ES 細胞の増殖と細胞周期における CIBZ の機能解析)

マウス ES 細胞をモデルとする網羅的な遺伝子解析法により、多分化能に関与する多くの転写因子が同定され、その機能解析により、分子メカニズムは解明されてきた。その一方、ES 細胞の自己複製能、特に細胞増殖と細胞周期については報告が少ない。そこで、私は ES 細胞において、細胞増殖と細胞周期を制御する転写因子として CIBZ に着目した。その理由は、① 当研究室において同定したマウス BTB zinc finger 転写因子 CIBZ はマウス ES 細胞に発現が見られること、② 他の BTB zinc finger 転写因子(PLZF など)が細胞周期を制御すること、③ CIBZ と結合する CtBP が細胞周期制御因子(Rb など)の転写を調節すること である。以上のことから、転写因子 CIBZ が、マウス ES 細胞の増殖と細胞周期に影響を与えることが推測される。

本研究の目的は、CIBZ がマウス ES 細胞の増殖と細胞周期に与える影響を検証した上で、CIBZ により制御される経路や遺伝子を明らかにすることである。

本論文で明らかになったこと及び意義

本論文の研究目的を解明するため、CIBZ の発現変化(欠損、発現低下、過剰発現)によって解析を試みた。その結果、CIBZ の発現が、ES細胞の未分化性状態の維持に必須ではなく、細胞増殖と細胞周期(G1 期からS 期への移行)に影響を及ぼすことが判明した。CIBZ の発現変化による ES 細胞の増殖と細胞周期(G1 期から S 期への移行)への表現型は、Nanog の発現変化による表現型とよく類似している。

さらに、CIBZ の発現変化が Nanog タンパク質の発現に影響を与え、Nanog の過剰発現が CIBZ の発現低下による細胞増殖の低下を回復させることから、CIBZ が Nanog のタンパク質を介して、細胞増殖に影響を与えていることが判明した。さらに、CIBZ の発現変化は Nanog mRNA の発現に変化を与えず、Nanog タンパク質の発現に変化を及ぼすことから、CIBZ は、転写後の修飾で Nanog の発現を制御していることも示唆された。ES 細胞において転写後の修飾で Nanog の発現を調節する転写因子の報告は、CIBZ が初めてである。

以上より、詳細に解明が進んでいない ES 細胞の増殖と細胞周期の理解に、CIBZ が Nanog のタンパク質を介して制御しているという新たな知見をもたらすことができた。

	ES 細胞	iPS 細胞	AS 細胞
増殖性	◎	○～◎	△
多分化能	◎	○～◎	△
安定性	◎	○～◎	△
倫理性	×	◎	○
拒絶反応	×	◎	×～◎
発癌性	△	×～△	◎

表 1. 幹細胞の種類と特徴

ES 細胞、iPS 細胞、AS 細胞の 3 つの幹細胞における増殖性、多分化能、安定性、倫理性、拒絶反応、発癌性を比較した。

◎ は、非常に優れている。○ は、優れている。△ は、劣っている。× は非常に劣っている。

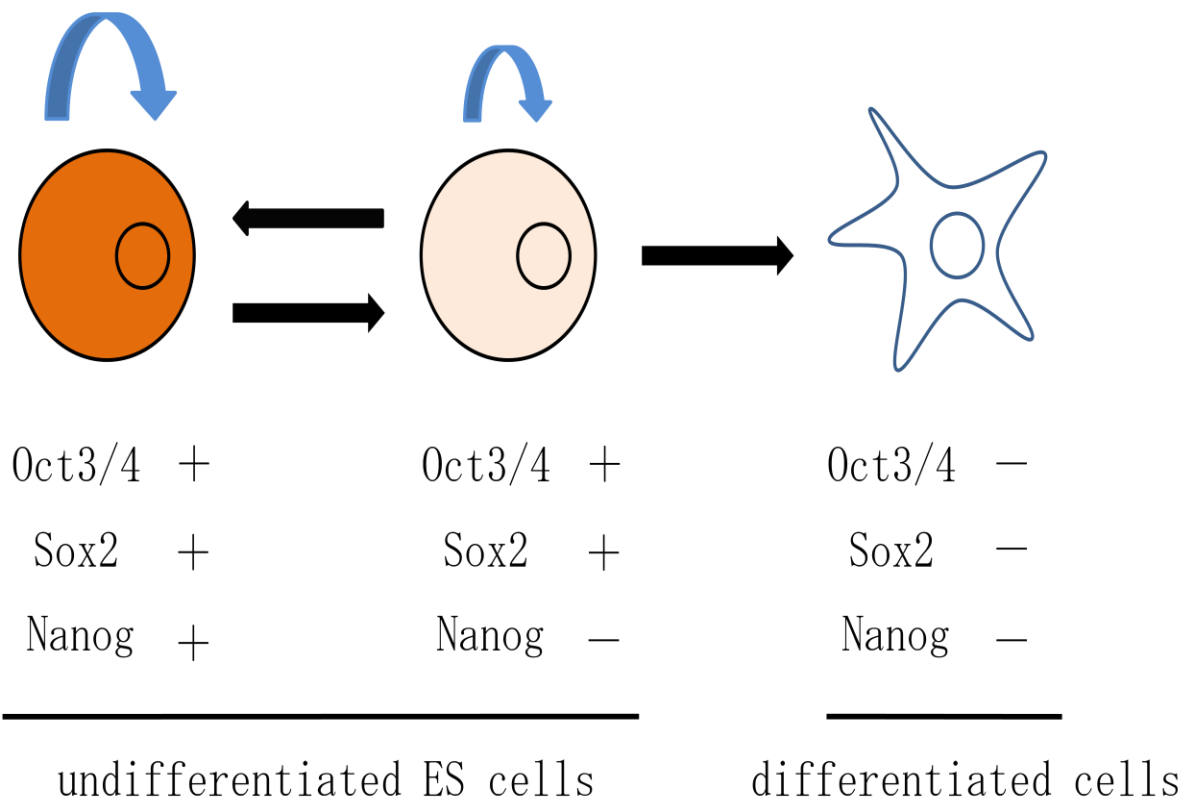


図 1. ES 細胞における Oct3/4、Sox2、Nanog の役割

中心的な役割を果たす Oct3/4、Sox2、Nanog は、未分化性状態の維持に重要な標的遺伝子の発現を活性化し、分化に重要な標的遺伝子の発現を不活性化して、ES 細胞の自己複製能及び多分化能を制御する。ES 細胞は、Nanog の発現が陰性でも未分化性状態を維持するが、外部の分化刺激で、速やかに分化する。さらに、Nanog の発現が陰性だと ES 細胞の自己複製能が低下する。+ は遺伝子発現が陽性を、- は陰性を示す。一番上の太い矢印(青色)は、自己複製能の程度を示す。

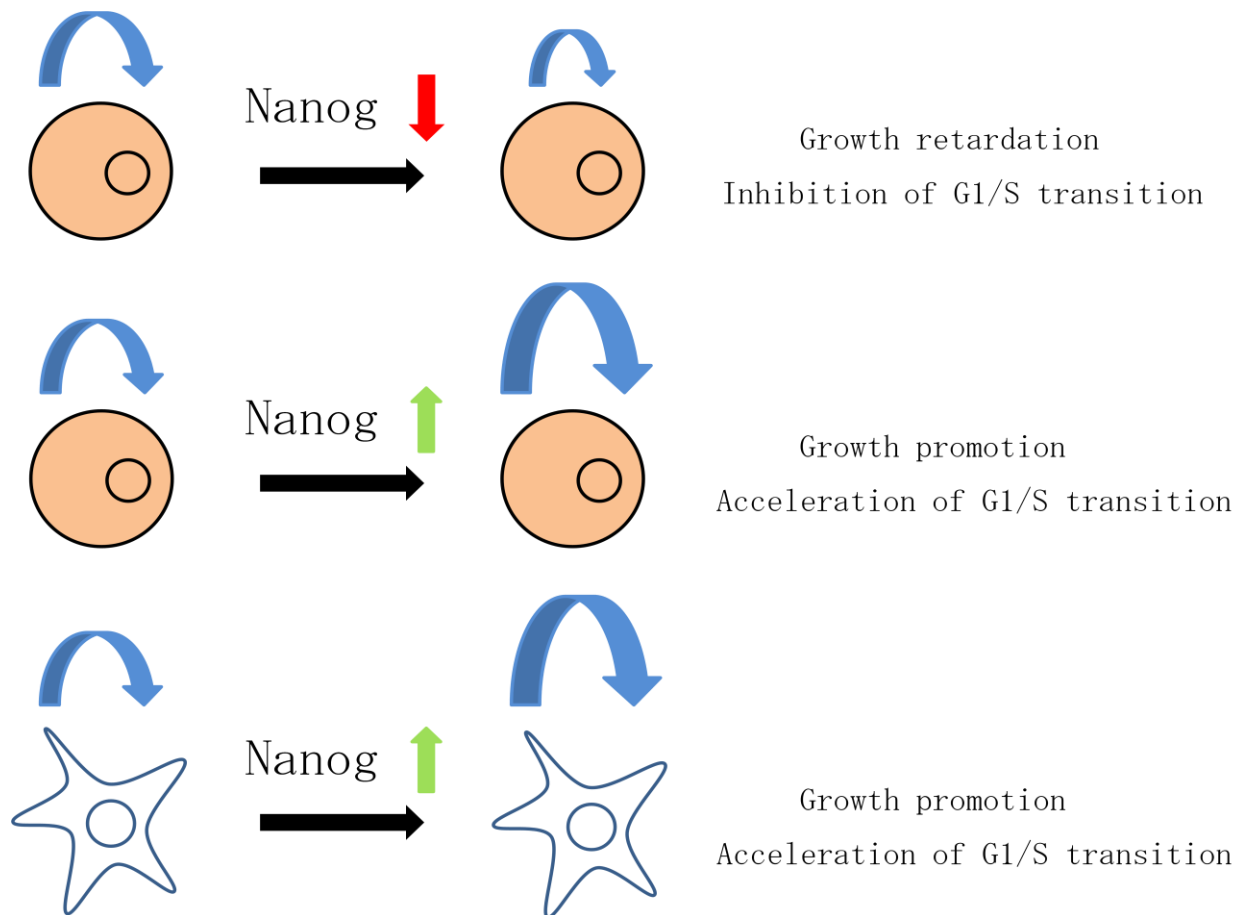


図 2. 種々の細胞における Nanog の機能

- 上の図：ES 細胞において、Nanog の発現が低下すると、細胞周期の G1 期から S 期への移行が遅延し、細胞増殖が抑制する。
- 中の図：ES 細胞において、Nanog の発現が増加すると、細胞周期の G1 期から S 期への移行が加速し、細胞増殖が促進する。
- 下の図：ES 細胞以外の細胞(造血幹細胞、繊維芽細胞など)において、Nanog の発現が増加すると、細胞周期の G1 期から S 期への移行が加速し、細胞増殖が促進する。

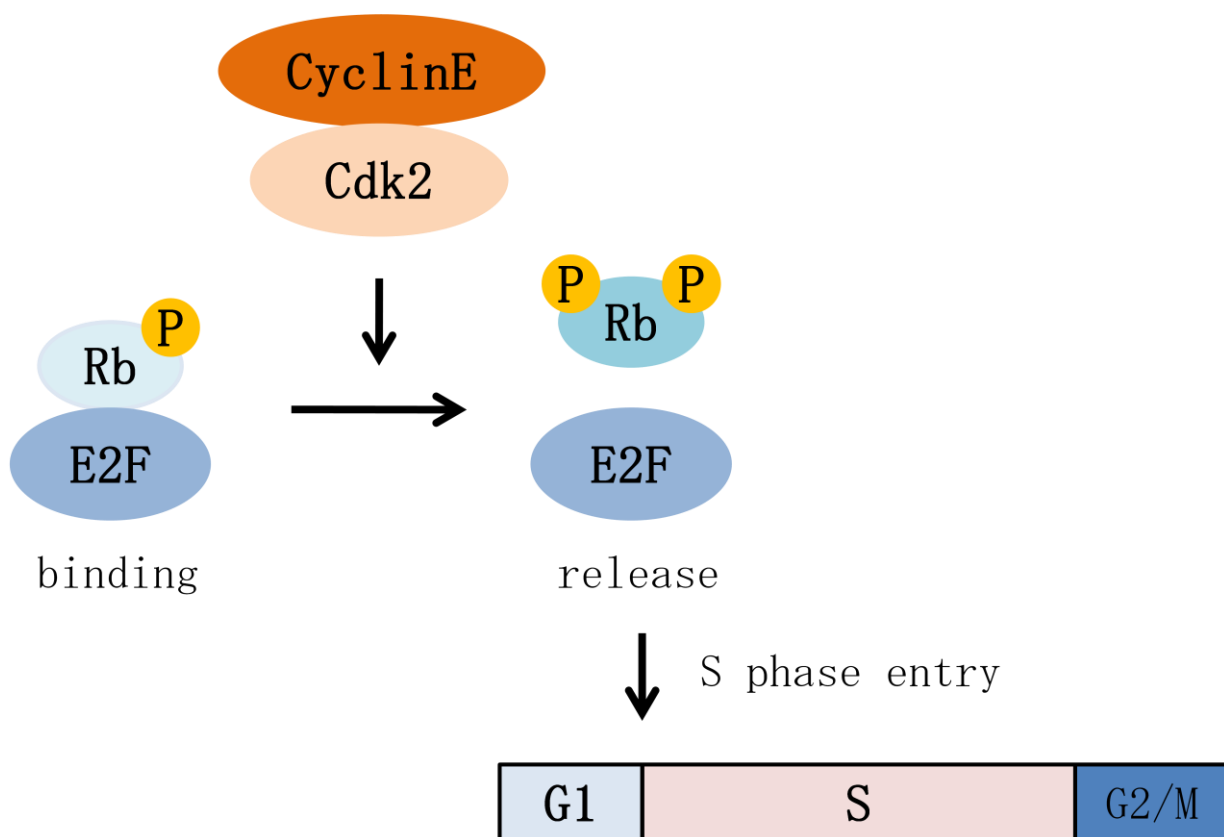


図 3. ES 細胞における CyclinE-Cdk2 複合体の機能

ES 細胞が G1 期から S 期へ移行する際に、転写因子 E2F が S 期への移行に重要な標的因子を活性化する。E2F は、Rb と結合すると機能が阻害される。CyclinE-Cdk2 複合体が、Rb をリン酸化し E2F を開放すると ES 細胞は G1 期から S 期へ移行する。

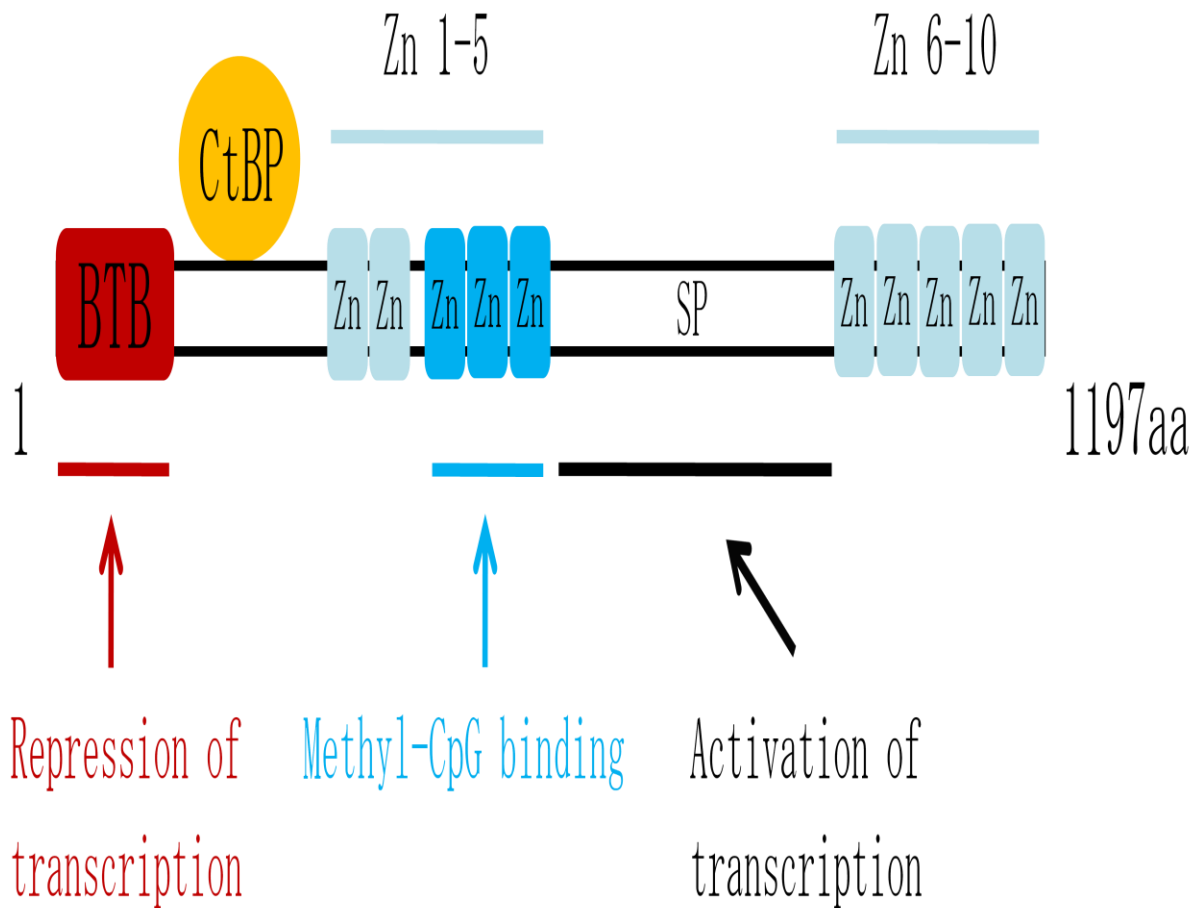
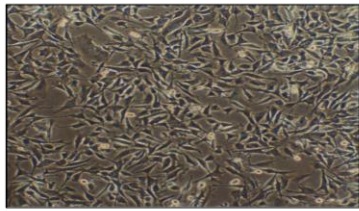


図 4. CIBZ の構造と各ドメインの機能

CIBZ(CtBP-interacting BTB-zinc finger protein)は、BTB ドメインをもつ zinc finger 転写因子である。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 5 個の zinc finger クラスターを有している。BTB ドメインは転写抑制機能があり、SP(spacer)領域には転写活性機能がある。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。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。

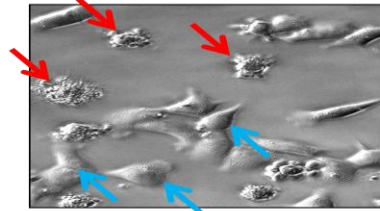
A

Muscle stem cells

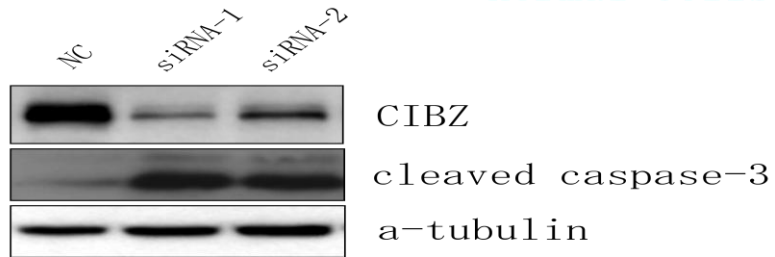


CIBZ ↓
→

death cells



normal cells



B

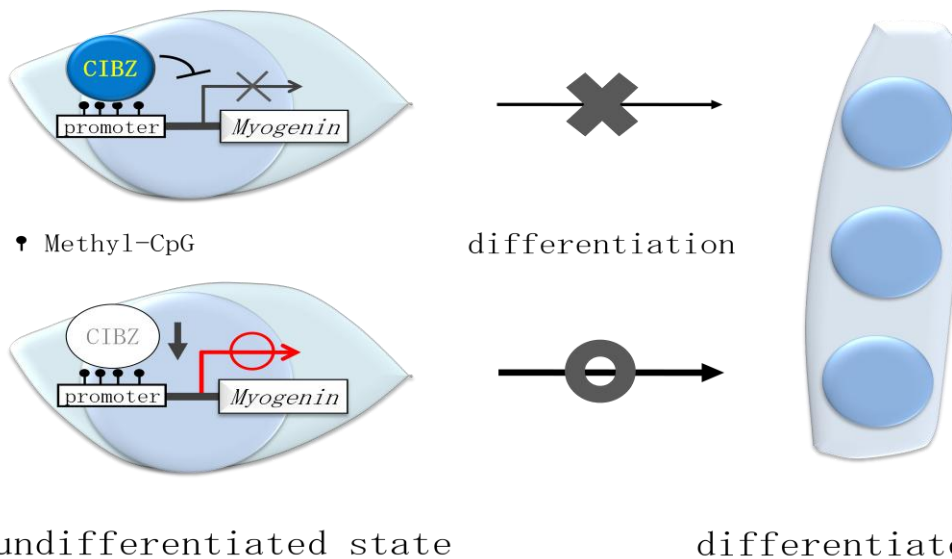


図 5. マウス骨格筋の幹細胞(筋芽細胞)における CIBZ の機能解析

A. CIBZ による筋芽細胞の細胞死誘導

CIBZ の発現低下は、筋芽細胞の細胞死を誘導する。メチル化 CpG 結合タンパク質が、筋芽細胞の細胞死を制御していることを明らかにしたのは、CIBZ が初めてである。さらに、細胞死を Western blot 法で確認した。

B. CIBZ による筋芽細胞の分化抑制

CIBZ は、筋分化決定因子の発現に重要なメチル化 CpG 部位に結合し、その発現制御は、筋芽細胞の分化に影響を与える。CIBZ の発現量を低下させると筋管細胞（筋芽細胞が分化した細胞）の形成が促進される。

材料と方法

ES 細胞の培養

ES 細胞は、RF8(129SV/Jae マウスに由来する ES 細胞)の系統を使用した。ES 細胞の培養は、フィーダー細胞上において、ES 細胞の培地で 37°C、5% CO₂ 条件のインキュベータ内で培養した。フィーダー細胞として、10 μg/ml で 2 時間 30 分マイトマイシン(協和発酵キリン)処理後の SNL 細胞(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 遺伝子の発現ベクターを組み込んだ細胞)を使用した。SNL 細胞を播く前は、0.1% ゲラチンでディッシュを 37°C で 30 分間コーティングした。

[ES 細胞の培地の組成]

Dulbecco' s Modified Eagle Medium(Nacalai Tesque)	445.5 ml
Fetal Bovine Serum(Thermo)	81 ml
Penicillin-Streptomycin(GIBCO)	2.7 ml
2-mercaptoethanol(Nacalai Tesque)	4.5 μl
non-essential amino acid solution(SIGMA)	5.4 ml
L-Glutamine Stock Solution(Nacalai Tesque)	5.4 ml

[SNL 細胞の培地の組成]

Dulbecco' s Modified Eagle Medium(Nacalai Tesque)	457.5 ml
Fetal Bovine Serum(Thermo)	35 ml
Penicillin-Streptomycin(GIBCO)	2.5 ml
L-Glutamine Stock Solution(Nacalai Tesque)	5 ml

CIBZ が恒常的に欠損した ES 細胞株の作製

CIBZ の ORF が 1 つのエクソンにコードされるため、gene targeting 法を用いた。相同組換えが生じた際に CIBZ の ORF が pgk-neo のカセットと完全に置き換わるように、約 18 kb の targeting vector を設計した。ES 細胞を 800rpm、4°C、5 分間遠心後、上清を除き 2.5×10^7 cells/ml になるように PBS を加え懸濁した。懸濁液 0.8ml をエレクトロポレーション用のチューブに加え 250V、500mF で、Xho I で切断し線状化した targeting vector を ES 細胞に導入した。15 分間室温で静置後、フィーダー細胞上で 37 °C、5% CO₂ 条件のインキュベータ内で培養した。その後、0.2mg/ml G418(InvivoGen)及び 0.2M FIAU (InvivoGen)で薬剤選択を行い、分化傾向の少ないコロニーを選び、

耐性コロニーを単離した。単離する際は、コロニーそれぞれ 37°C、15 分間、20 μ l の 0.25% trypsin/EDTA で処理した。これに、ES 培地を 180 μ l 加え、20 回ピペティング後、24 穴プレートにまかれたフィーダー細胞上に加え、2 日~4 日間培養した。細胞を回収するまでの間は、毎日培地交換を行った。回収する際は、各 ES クローンについて、PBS で洗浄後 100 μ l の 0.25% trypsin/EDTA で 37°C、10 分間処理した。これに 700 μ l の ES 培地を加え、ピペティングした。この細胞液 500 μ l に対し、2 \times 凍結培地 500 μ l を加え、凍結チューブ内に入れ、液体窒素下で保存した。残された細胞液 300 μ l から、PUREGENE DNA Purification kit (Gentra Systems) を用いて Genomic DNA を抽出した。Genomic DNA を BamH I で切断後、Southern blot 法でニトロセルロースメンブレン (Roche) に転写した。シグナルの検出は、PCR 法で増幅したプローブを AlkPhos Direct Labelling and Detection System (Amersham Biosciences) で標識したものを使用した。野生型では 10.5kb の位置に、相同組換えが起きた場合では 6.7kb の位置にバンドが見られる。相同組換えにより得られた CIBZ^{+/-} ES 細胞を G418 (1mg/ml) の高濃度で (Mortensen et al., 1992)、14 日間薬剤選択し、形の良いコロニーのみを単離し、CIBZ が完全に欠損した CIBZ^{-/-} ES 細胞を得た。抽出した Genomic DNA を用いて、Genomic PCR 法も行った。野生型のアレルは 2.0kb、相同組換えにより得られたアレルは 2.2kb の位置に、バンドが見られるようにプライマーを設計した。

[2 \times 凍結培地の組成]

Dulbecco' s Modified Eagle Medium (Nacalai Tesque)	6 ml
Fetal Bovine Serum (Thermo)	2 ml
Dimethyl Sulfoxide (SIGMA)	2 ml

[プライマーの種類と配列]

Forward 1

5' -CCTGGGAGAATTTCCAAC TAAGC-3'

Reverse 1

5' -AAGTCGTCCTTGAGGTCCTGGAGAGG-3'

Reverse 2

5' -AGAACCTGCGTGCAATCCATC-3'

CIBZ が恒常的に過剰発現した ES 細胞株の作製

ES 細胞における CIBZ 一過性過剰発現の条件と同様の条件で、トランスフェクションを行い、24 時間後に、G418 (0.2mg/ml) で薬剤選択を行い、9 日後にコロニーを単離した。Western blot 法により CIBZ の過剰発現株を同定した。

CIBZ が一過性に発現低下または過剰発現した ES 細胞の作製

1) CIBZ の一過性な発現低下

CIBZ に特異的な Dicer substrate siRNA または Dicer substrate scrambled negative control siRNA (Integrated DNA Technologies) を ES 細胞に INTERFERin (Polyplus Transfection) を用いて一過性に CIBZ をノックダウンした。無血清培地の Opti-MEM (GIBCO) 200 μ l に CIBZ siRNA (50nM) または scramble siRNA (50nM) をそれぞれ加え、ピペッティングにより混和した後、INTERFERin 12 μ l を加え、懸濁後、15 分間静置した。この間に、ES 細胞のペレット (4×10^5 cells) を用意した。そのペレットを先ほどの Opti-MEM で懸濁し、15 分間静置した。ES 培地 2 ml を 6 穴プレートに分注後、細胞懸濁液を加え、37°C、5% CO₂ インキュベータ内で 48 時間培養した。トランスフェクション後、2 時間で ES 培地を 4ml 添加した。

[CIBZ siRNA の配列]

CIBZ siRNA-1

sense sequence 5'-phospho-GCGGACCACAUGGUGAAAUUUGUdGdA-3'

antisense sequence 5'-UCACAAAUUUCACCAUGUGGUCCGCGU-3'

CIBZ siRNA-2

sense sequence 5'-phospho-GCUGAAGAAACCAGUAAGAUUGAdAdA-3'

antisense sequence 5'-UUUCAAUUCUACUGGUUUCUUCAGCGU-3'

2) CIBZ の一過性な過剰発現

無血清培地の Opti-MEM 200 μ l に pcDNA3-Myc (2 μ g/ml) または pcDNA3-Myc-CIBZ (2 μ g/ml) をそれぞれ加え、ピペッティングにより混和した後、Transfast (Promega) を 6 μ l 加え、懸濁後、15 分間静置した。この間に、ES 細胞のペレット (4×10^5 cells) を用意した。そのペレットを上記の Opti-MEM で懸濁し、15 分間静置した。ES 培地 2ml を 6 穴プレートに分注後、細胞懸濁液を加え、37°C、5%CO₂ インキュベータ内で 48 時間培養した。トランスフェクション後、2 時間で ES 培地を 4ml 添加した。

mRNA の検出方法

1) RNA の抽出

Total RNA は、セパゾール RNA I super (Nacalai Tesque) を用いて ES 細胞から抽出した。セパゾール RNA I super を 0.5ml ずつ入れ、細胞が溶解するまでボルテックスをかけた。その後、chloroform 100 μ l を入れボルテックスし、室温で 3 分間静置した。4°C、15000rpm、15 分間遠心し、上清に 100% ethanol を 700 μ l 加えてボルテックスし -80°C に 10 分間静置した。その後、4°C、15000rpm、15 分間遠心した。上清を捨て 70% ethanol 700 μ l を加え、4°C、1500rpm、15 分間遠心した。次に、上清を捨て、5 分間乾燥させた。DEPE 処理水を 12 μ l 加え、-80°C で保存した。

2) cDNA の合成

1 μ g の total RNA から SuperScript II RNaseH-Reverse Transcriptase (Invitrogen) とオリゴ(dT)を用いて cDNA を合成し、それぞれ特異的なプライマーを用いて PCR 反応を行った。RNA 1 μ g、オリゴ(dT)12-18(0.5 μ g/ μ l) 0.5 μ l、10mM dNTP mix 0.5 μ l を混和し、DDW を用いて 7 μ l にメスアップした。これを 65°C、5 分間インキュベーションし、すぐに氷上、3 分間静置した。その後、5 \times buffer 2 μ l、0.1M DDT 0.5 μ l、SuperScript II RNaseH-Reverse Transcriptase 0.5 μ l を加え、42°C、50 分間インキュベーションした。その後、70°C、15 分間インキュベーションした。

3) PCR 反応

合成した cDNA を鋳型として以下の組成で PCR 反応させた。PCR 産物は、2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色を用いて確認した。PCR 反応は、① 96°C 2 分間、② 94°C 20 秒間、58°C 30 秒間、72°C 30 秒間、③ 72°C 3 分間の条件を通しで行った。

[PCR 反応液の組成]

cDNA	1 μ l
10 \times PCR buffer	1 μ l
2.5mM dNTP mixture	1 μ l
10 μ M Forward primer	0.5 μ l
10 μ M Reverse primer	0.5 μ l
Blend Tag	0.05 μ l
DDW	6 μ l

[プライマーの種類と配列]

CIBZ

5' -GCACAGACAGTTCTATCCCA-3' (Forward)

5' -GCTCTGACATAGCATCATCC-3' (Reverse)

GAPDH

5' -GTACAGACTTTGAATCCAGCC-3' (Forward)

5' -GCATCATCCTTACGTTCCCA-3' (Reverse)

Oct3/4

5' -TCACTCACATCGCCAATCAG-3' (Forward)

5' -CCTGTAGCCTCATACTCTTCTC-3' (Reverse)

Sox2

5' -CTACAGCATGTCCTACTCGC-3' (Forward)

5' -CCTCCCAATTCCTTGTATCTC-3' (Reverse)

Nanog

5' -TTCAGAAATCCCTTCCCTCG-3' (Forward)

5' -AGTAGCAGACCCTTGTAAGC-3' (Reverse)

Pax6

5' -GTACCAGTGTCTACCAGCCAATC-3' (Forward)

5' -ACGAGTATGAGGAGGTCTGACTG-3' (Reverse)

Nestin

5' -CTGGAAGTGGCTACATACAGGAC-3' (Forward)

5' -AGTCTCAAGGGTATTAGGCAAGG-3' (Reverse)

Brachyury

5' -GAAGTGAAGGTGGCTGTTGG-3' (Forward)

5' -ATTTACCTTCAGCACCGGGA-3' (Reverse)

Tbx2

5' -GACATCTTGAAGCTCCCATACAG-3' (Forward)

5' -GCTCCTCATACAAACGGAGAGT-3' (Reverse)

Gata4

5' -GTGAGCCTGTATGTAATGCC-3' (Forward)

5' -CTGTGCCCATAGTGAGATGAC-3' (Reverse)

Gata6

5' -GGGAGAACTGTGACAATGAC-3' (Forward)

5' -ACGAACGCTTGTGAAATGTG-3' (Reverse)

CDC25A

5' -ACCACGACACCTTTTCACCTC-3' (Forward)

5' -ATCCTCATCGGACAAAGTGG-3' (Reverse)

CDK6

5' -TGCCTTACCAAGGAAACCAC-3' (Forward)

5' -GCTGCAGGCGGATTACATCATA-3' (Reverse)

タンパク質の検出方法

1) タンパク質の抽出

細胞を 4°C で Protease Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science) を含む ELB buffer で希釈した。10 秒間の超音波処理をした後 20 分間氷上で静置して細胞構造を破壊した。その後、4°C、15000rpm、20 分間遠心し、上清を回収した。

[ELB buffer の組成] DDW で 50ml にメスアップ

1M Hepes (pH7.5)	2.5 ml
5M NaCl	2.5 ml
0.5M EDTA	0.1 ml
10% Nonidet P-40	0.5 ml
1M DTT	50 μ l
100mM phenylmethanesulfonyl fluoride	0.5 ml
2 mg/ml leupeptin	50 μ l
2 mg/ml aprotinin	50 μ l

2) SDS-PAGE

抽出したタンパク質溶液 12 μ l と 5×SDS loading buffer 3 μ l を混和した後、95°C、5 分間加熱し、全量を SDS-PAGE に添加した。分子量マーカーは Precision Plus Protein Standards Dual Color (BIO-RAD) 3 μ l を添加した。8-12% で SDS-PAGE を行った。SDS-PAGE Electrophoresis buffer を注ぎ、ゲル 1 枚につき 20mA で泳動した。泳動後、ゲルを Transfer buffer 50ml で 30 分間振とうした。

[10×SDS-PAGE Electrophoresis buffer の組成] DDW で 1L にメスアップ

Glycine	30.3 g
Tris	144 g
SDS	10 g

[10×Transfer buffer の組成] DDW で 1L にメスアップ

Tris base	6 g
Glycine	14.4 g
SDS	1 g

3) Blotting

PVDF membrane (Pall Corporation) を 100% methanol に浸し、DDW で洗浄し、ろ紙 6 枚を Transfer buffer に浸した。その後、陰極側からろ紙 3 枚、SDS-PAGE 後のゲル、PVDF membrane、ろ紙 3 枚の順に空気が入らないように重ねて blotting 装置にセットした。12V、60 分間 blotting を行った。Blotting 後の PVDF membrane を 5% スキムミルク / PBST (PBS + 0.05% Tween 20) 溶液 50ml に入れて室温、1 時間で blocking した。その後、PBST で 5 分間、3 回洗浄を行った。

4) Western blot

一次、二次抗体の希釈液は、Can Get Signal Solution (TOYOBO) と 5% スキムミルクを用いて行った。一次抗体を希釈液に溶かし、PVDF membrane に添加し、室温、1 時間反応させた。一次抗体は、CIBZ 抗体 (C2)、Oct3/4 抗体 (R&D Systems)、Sox2 抗体 (Sigma)、Nanog 抗体 (Millipore)、 α -tubulin 抗体 (Sigma)、CyclinE 抗体 (Santa Cruz Biotechnology)、Cdk2 抗体 (Santa Cruz Biotechnology) を使用した。一次抗体反応後、PBST で 3 回洗浄した。二次抗体も希釈液に溶かし、室温、1 時間反応させた。二次抗体は、マウス抗体 (GE Healthcare)、ラット抗体 (GE Healthcare)、ラビット抗体 (GE Healthcare) を使用した。その後、PBST を用いて 3 回洗浄した。

ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) を用いて検出を行った。Solution A と B を 40:1 の割合で混合し、PVDF membrane に添加し、室温で 5 分間静置した。その後、ECL Plus 溶液を除き、PVDF membrane をラップに挟み、FUJI MEDICAL X-RAY FILM (Fujifilm) で感光、現像した。

Annexin V-FITC による細胞死の解析

Annexin V kit(MBL)を用いて細胞死を検出した。0.25% trypsin/EDTA 処理後、培養液で 1 回洗浄し、さらに PBS で 1 回洗浄した。洗浄後の細胞(2×10^5 cells)に $85 \mu\text{l}$ Binding buffer を加え、懸濁した。さらに、 $10 \mu\text{l}$ Annexin V-FITC と $5 \mu\text{l}$ Propidium Iodide を加え、よく混合した。サンプルを暗中、室温で 15 分間反応させた。サンプルは $40 \mu\text{m}$ ナイロンメッシュを通して、Fluorescence-activated cell sorting(BD Biosciences)を用いて各サンプルにつき 20000 個の細胞を解析した。

PI(Propidium Iodide)による核染色を用いた DNA 細胞周期の解析

0.25% trypsin/EDTA 処理後、PBS で 1 回洗浄した。洗浄後の細胞(5×10^5 cells)に 70% ethanol をボルテックスをかけながら、少しずつ添加して、細胞を固定した。 4°C 、overnight で固定した細胞を PBS で 2 回洗浄した。細胞を 1ml PBS/0.2% TritonX-100 で溶解後、RNase A(250g/ml)を加え、暗中、 37°C 、20 分間反応させた。さらに、 $50 \mu\text{g/ml}$ PI(Sigma)を添加して氷上、30 分間反応させた。サンプルは $40 \mu\text{m}$ ナイロンメッシュを通し、Fluorescence-activated cell sorting(BD Biosciences)を用いて各サンプルにつき 20000 個の細胞を測定した。測定した結果を ModFit LT software で解析した。

BrdU (Bromodeoxyuridine) 取り込みによる細胞増殖の解析

培養中の ES 細胞に、チミジンのアナログである BrdU(Sigma)を $10 \mu\text{M}$ 、45 分間取り込ませた。0.25% trypsin/EDTA 処理後、PBS で 2 回洗浄した。洗浄後の細胞(10×10^5 cells)に -20°C の 70% ethanol をボルテックスをかけながら、少しずつ添加して、細胞を固定した。 4°C 、overnight で固定した細胞を PBS で 2 回洗浄した。 $100 \mu\text{l}$ 2N HCl/PBS(PBS+0.5% Triton X-100)を加え、室温で 20 分間置き、DNA を切断させた。途中で、1 回懸濁した。遠心後、上清を捨て、0.1M sodium tetraborate pH8.2 で、5 分間中和した。遠心後、上清を捨て、PBST(PBS+0.5% BSA+0.5% Tween 20)で 2 回洗浄した。BrdU 抗体(Sigma)を室温、1 時間反応させた。反応後、PBST で 1 回洗浄した。Alexa488 抗体(Invitrogen)を暗中、室温、30 分間反応させた。反応後、PBST で 1 回洗浄した。最後に、DAPI($1 \mu\text{g/ml}$)を添加し、室温、5 分間核を染色した。その後、PBS で細胞を懸濁し、スライドガラスに滴下して、カバーガラスをかけて、蛍光顕微鏡(OLYMPUS)で観察した。画像は、NIS-Elements software で解析した。

アルカリフォスファターゼ染色による未分化性状態の確認

培地を除去し、AP buffer にて 2 回洗浄した。発色液を添加し、室温で静置して 30 分間発色した。その後、発色液を除去し PBS にて 2 回洗浄した。4% パラホルムアルデヒドを添加し、4℃、30 分間静置して固定した。DDW にて、3 回洗浄後、風乾した。

[AP buffer の組成] DDW で 500ml にメスアップし、pH9.5 に調製

NaCl	2.92 g
Tris	6.06 g
MgCl ₂ · 6H ₂ O	5.08 g

[発色液の組成] 使用直前に調製

AP buffer	9.92 ml
75mg/ml NitroBlue Tetrazolium(SIGMA)	45 μl
50mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl Phosphate(SIGMA)	35 μl

PI3K キナーゼ阻害剤による CIBZ のタンパク質と mRNA の発現変化の解析

ES 細胞を 6 穴プレートに 4×10^5 cells を播種し、24 時間後に PI3K キナーゼ阻害剤の LY294002(Cell Signaling)を添加した。コントロールには、LY294002 の粉末を溶解させるのに用いた DMSO(SIGMA)を加えた。阻害剤添加後、6 時間後と 24 時間後に細胞を回収した。

結果

CIBZ が欠損した ES 細胞を樹立した

本研究に用いた ES 細胞は、マウス ES 細胞の研究でよく使用される RF8 ES 細胞である。当研究室では、CIBZ 遺伝子がマウスの各組織にユビキタスに発現し、ES 細胞にも発現していることを報告している (Matsuda et al., 2003)。CIBZ が ES 細胞の機能に影響するか検証するため、CIBZ を欠損した ES 細胞を作製した。まず、ネオマイシンカセットと CIBZ の全長をコードする領域が相同組換えを起こす targeting vector を構築した (図 6)。次に、targeting vector をエレクトロポレーション法により ES 細胞に導入し、抗生物質の G418 (0.2mg/ml) で薬剤選択した。相同組換えを起こした ES クローンの同定は、Southern blot 法と Genomic PCR 法で検証した。その結果、片方のアレルの相同組換えが確認された細胞株を 2 つ作製した (図 7A-B)。さらに、作製した相同組換え体 CIBZ^{+/-} ES 細胞を高濃度の G418 (1 mg/ml) で薬剤選択し、耐性コロニーをピックアップし、CIBZ を欠損した 2 つの CIBZ^{-/-} ES 細胞株を作製した (図 7B)。この 2 つの細胞株において、CIBZ のタンパク質と mRNA の完全な欠損を Western blot 法と半定量 RT-PCR 法を用いて確認した (図 8A-B)。

これらの結果より、CIBZ を欠損した 2 つの CIBZ^{-/-} ES 細胞株を樹立した。

CIBZ は、ES 細胞の未分化性状態の維持に必須ではない

CIBZ を欠損した 2 つの ES クローンのコロニーは、野生型の ES 細胞と同様に、輪郭が丸くはっきりし、コロニーの中の細胞も分化傾向は観察されなかった (図 9A)。また、ES 細胞の未分化状態を評価するアルカリフォスファターゼ染色の結果においても、野生型と比較して変化はなかった (図 9B)。さらに、ES 細胞の未分化性状態の維持に中心的な役割を果たす Oct3/4、Sox2、Nanog の発現を検証した。その結果、Oct3/4 と Sox2 のタンパク質と mRNA の発現は、野生型と比較して変化はなかった (図 10A-B)。さらに、分化マーカーも野生型の ES 細胞と比較した結果、Gata4 と Gata6 (内胚葉分化マーカー)、Brachyury と Tbx2 (中胚葉分化マーカー)、Pax6 と Nestin (外胚葉分化マーカー) において mRNA の発現に変化はなかった (図 11)。

さらに、CIBZ を一過性に発現低下した場合の未分化性状態への影響を検証するため、野生型の ES 細胞を用いて、2 つの siRNA により CIBZ を一過性にノックダウンした。その結果、CIBZ の顕著な発現低下を確認した (図 12A-B)。CIBZ を発現低下した ES 細胞の形態及びアルカリフォスファターゼ染色は、

野生型と比較して変化はなかった(図 13A-B)。さらに、CIBZ を発現低下した細胞において、ES 細胞の分化マーカーもコントロール ES 細胞と比較して、変化はなかった(図 14)。

これらの結果より、CIBZ は、ES 細胞の未分化性状態の維持に必須でないことが判明した。

CIBZ の欠損と発現低下は、ES 細胞の細胞数を低下させる

CIBZ を欠損と発現低下した ES 細胞において、ES 細胞の増殖に重要である Nanog のタンパク質が、低下していた(図 10A、12A)。また、CIBZ を欠損した ES 細胞は、野生型と同じ培養条件下で培養すると細胞増殖が抑制されていることが観察された。よって、CIBZ による増殖抑制の効果を定量化するため、低密度で細胞を播種し、日毎に細胞数をカウントした。野生型と比較して、CIBZ を欠損した ES 細胞は、播種して 2 日目から 4 日目にかけて細胞数が顕著に低下していくことが判明した(図 15)。同様に、コントロール ES 細胞と比較して、CIBZ を一過性に発現低下した ES 細胞においても、2 日目において細胞数の顕著な低下が観察された(図 16)。

これらの結果より、CIBZ の欠損と発現低下は、ES 細胞の増殖において細胞数を低下させることが判明した。

CIBZ の欠損と発現低下は、ES 細胞の細胞死を誘導しない

細胞数は、細胞死と細胞増殖のバランスによって調節されている。筋芽細胞では、CIBZ の発現低下が細胞死を誘導することから、まず、細胞数の低下が、細胞死の誘導によるものであると考えた。フローサイトメーターを用いて、初期の細胞死を Annexin V で、後期の細胞死を PI(Propidium iodide)で解析した。初期の細胞死では、細胞膜のリン脂質の非対称性が失われ、細胞膜の内側に局在するフォスファチジルセリンが細胞膜の外側に露出し、それを Annexin V で検出する。後期の細胞死では、細胞膜が破壊され、核が露出し、PI で DNA を検出する。その結果、CIBZ が欠損した ES 細胞は、野生型と比較して、全細胞数に占める初期死細胞数及び後期死細胞数の割合の上昇は見られなかった(図 17A)。さらに、細胞死マーカーである cleaved PARP と cleaved caspase-3 の発現を Western blot 法で解析した結果、CIBZ を欠損した ES 細胞において、それらの発現上昇は観察されなかった(図 17B)。同様に、CIBZ を発現低下しても、細胞死の誘導は観察されなかった(図 18A-B)。

これらの結果より、CIBZ の欠損や発現低下による細胞数の低下は、ES 細胞の細胞死誘導ではなく、ES 細胞の増殖抑制の可能性が示唆された。

CIBZ の欠損や発現低下は、ES 細胞の増殖を抑制させる

細胞増殖は、BrdU(Bromodeoxyuridine)の取り込みを観察することで解析した。BrdU は、チミジンのアナログで、新たに合成された DNA の中に取り込まれることから、細胞増殖の定量によく使用される。CIBZ が欠損した ES 細胞は、野生型と比較して、BrdU の陽性細胞数の顕著な減少が観察された(図 19A-B)。同様に、CIBZ の発現低下でも、コントロールと比較して、BrdU の陽性細胞数の顕著な減少が見られた(図 20A-B)。

これらの結果より、CIBZ の欠損や発現低下による ES 細胞の細胞数の低下は、ES 細胞の増殖が抑制することに起因すると判明した。

CIBZ の欠損や発現低下は、ES 細胞の G1 期から S 期への移行を遅延させる

細胞周期が、ES 細胞の増殖に中心的な役割を担うことが知られている。そこで、CIBZ による細胞周期に及ぼす影響を検証した。細胞周期をフローサイトメーター(PI 染色)を用いて解析した。その結果、CIBZ が欠損した ES 細胞は、野生型の ES 細胞と比較して、G1 期に占める細胞数の割合が増加し、S 期に占める細胞数の割合が減少していた(図 21A)。同様な結果が、CIBZ の発現低下でも確認された(図 22A)。

それ故、CIBZ が G1 期から S 期への移行の制御に影響を与えていることが示唆された。そのメカニズムを調べるため、ES 細胞の G1 期から S 期への移行の制御に重要である CyclinE と Cdk2 の発現レベルを Western blot 法で調べた。その結果、CIBZ を欠損した ES 細胞において、CyclinE と Cdk2 のタンパク質の発現が、減少していることが確認された(図 21B)。同様の結果が、CIBZ の発現低下でも確認された(図 22B)。

これらの結果より、CIBZ の欠損と発現低下による細胞増殖の抑制は、細胞周期の G1 期から S 期への移行が遅延することが原因であると判明した。

CIBZ の過剰発現は、ES 細胞の増殖を促進させる

CIBZ が、ES 細胞の増殖と細胞周期の制御因子として働くことの確証を高めるために、CIBZ の過剰発現株を作製し、欠損と発現低下の結果に相反するかを確認した。まず、EF1 α プロモーターの下流に、Myc タグのみと Myc タグ付きの CIBZ 全長(Myc-CIBZ)が安定的に発現する 2 つのコンストラクトを構築した。これらのコンストラクトを野生型の ES 細胞に導入し、G418(0.2 mg/ml)による薬剤選択後、ES 細胞のコロニーを複数ピックアップした。Myc 抗体と CIBZ 抗体を用いた Western blot 法で確認して、過剰発現した Myc、及び Myc-CIBZ の ES 細胞をそれぞれ樹立した(図 23A)。

CIBZ を過剰発現したコロニーは、野生型と同様な未分化性状態の形態的な特徴を表していた。また、コントロール ES 細胞と比較して Oct3/4 と Sox2 のタンパク質と mRNA の発現においても変化は見られなかった(図 23A-B)。また、CIBZ を過剰発現した ES 細胞において Nanog のタンパク質の発現のみが増加していた(図 23A)。その一方、Nanog の mRNA の発現において変化はなかった(図 23B)。

次に、過剰発現した CIBZ が、ES 細胞の増殖に与える影響を検討した。その結果、コントロール ES 細胞と比較して、CIBZ が過剰発現した ES 細胞の増殖は促進した(図 24)。フローサイトメーターによる細胞周期を調べた結果、コントロール ES 細胞と比較して、CIBZ が過剰発現した ES 細胞は、G1 期に占める細胞数の割合が減少し、S 期に占める細胞数の割合が増加した(図 25A)。さらに、CIBZ が過剰発現した ES 細胞において、CyclinE と Cdk2 のタンパク質の発現が増加することが観察された(図 25B)。

これらの結果より、CIBZ の過剰発現は、CIBZ の欠損と発現低下の逆の表現型を示した。

CIBZ は、Nanog タンパク質の発現に依存して ES 細胞の増殖に関与する

ES 細胞において CIBZ の欠損と発現低下により、Nanog タンパク質の発現が減少し、CIBZ の過剰発現により Nanog タンパク質の発現が増加した。Nanog は、ES 細胞の増殖に重要であるため、CIBZ が関与する ES 細胞の増殖は、Nanog を介することが示唆された。そこで、ES 細胞において Nanog の過剰発現が CIBZ の発現低下による細胞増殖の低下を回復できるか検証した。ES 細胞に Nanog を恒常的に発現させるコンストラクトを構築した。このコンストラクトを野生型の ES 細胞に導入し、G418(0.2 mg/ml)による薬剤選択後、耐性の ES コロニーを複数個ピックアップした。Nanog 抗体を用いた Western blot 法より、Nanog が過剰発現した 2 つのクローンを樹立した(図 26A)。Nanog が過剰発現した ES 細胞は、コントロール ES 細胞と比較して細胞数が約 30% 増加したことから、Nanog は ES 細胞の増殖を促進することが確認された(図 26B)。コントロール ES 細胞で、CIBZ を一過性に発現低下した場合、細胞数の減少の割合は 29.8% だが、Nanog を過剰発現した ES 細胞で、CIBZ を一過性に発現低下した場合、細胞数の減少の割合はわずか約 10.1% であった(図 26B)。つまり、細胞増殖の低下が Nanog 過剰発現により、かなり回復することが確認された。

これらの結果より、CIBZ の発現低下による ES 細胞の増殖抑制は、Nanog タンパク質の発現に依存することが判明した。

CIBZ は、PI3K/AKT シグナル経路を介して ES 細胞の増殖を制御する

Nanog は、PI3K/AKT シグナル経路で機能するため、CIBZ もこの経路を介する可能性が示唆された。PI3K/AKT シグナル経路の上流を阻害することで CIBZ の発現が Nanog と同様に減少することが推測された。そこで、PI3K/AKT シグナル経路阻害剤の LY294002 (10 nM) を ES 細胞に添加して、CIBZ のタンパク質の発現変化を検証した。その結果、阻害剤を添加すると、6 時間後と 24 時間後でコントロールと比較して、CIBZ のタンパク質の発現低下が観察された (図 27A)。24 時間後では、CIBZ の mRNA の発現低下も観察された (図 27B)。

これらの結果より、CIBZ も Nanog と同様に PI3K/AKT シグナル経路を介して ES 細胞の増殖を制御していることが判明した。

CIBZ は、Nanog の発現を転写後の修飾で制御する

今までの結果より、CIBZ の発現変化 (欠損、発現低下、過剰発現) は、Nanog タンパク質の発現を制御して、Nanog mRNA の発現には影響を及ぼさないことが判明した。Nanog の mRNA に関して、CIBZ が発現低下した細胞で、Nanog に対する 2 つの異なるプライマーペアを用いて再検証すると、上記と同様な結果を示した。また、Myc-CIBZ を ES 細胞に一過性に過剰発現させ、2 日後に Nanog の発現を検証した。その結果、CIBZ の一過性の過剰発現も、Nanog タンパク質の発現を上昇させ、Nanog mRNA の発現には変化が見られなかった (図 28A-B)。さらに、CIBZ と Nanog の両方が発現していないヒトの胚性腎細胞の HEK293T 細胞において、CIBZ と Nanog を共発現させた場合においても、Nanog タンパク質の発現のみが増加した (図 29A-B)。

これらの結果より、CIBZ は、Nanog タンパク質の発現を転写後の修飾で制御していることが示唆された。

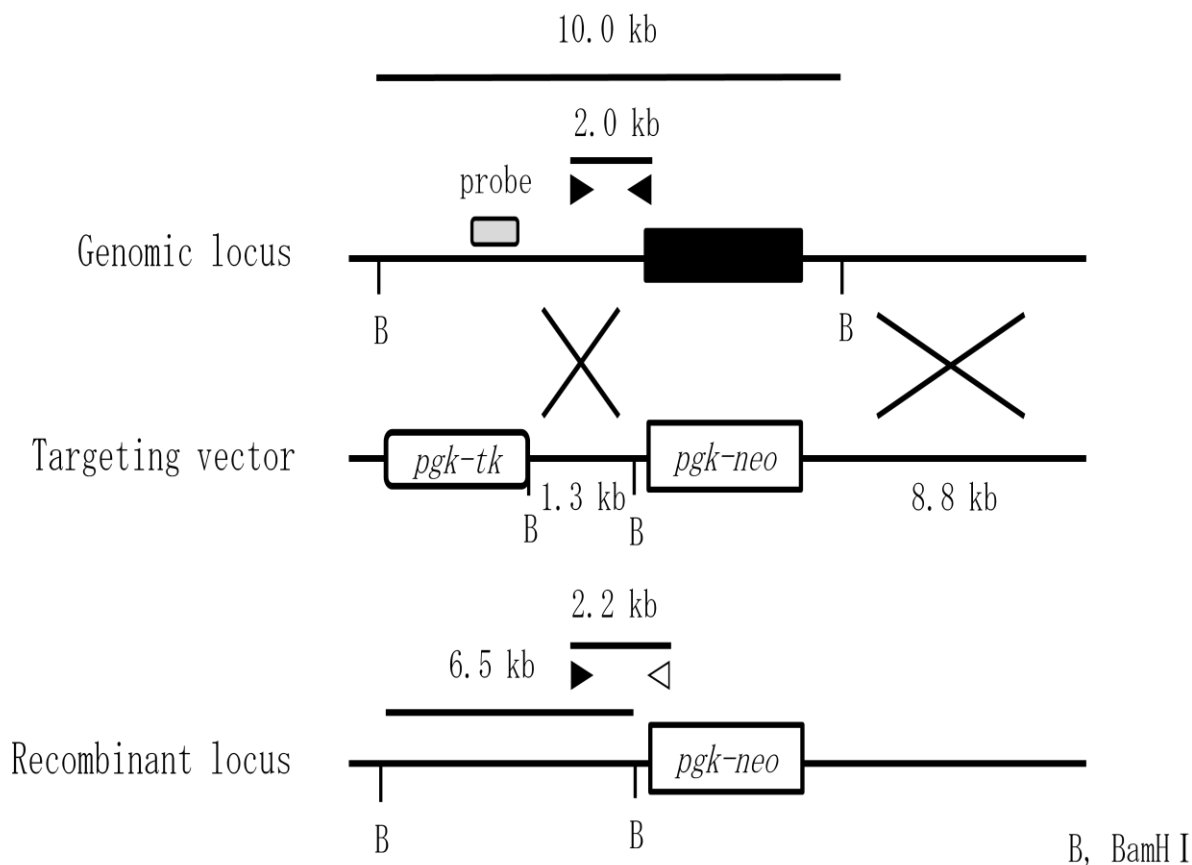
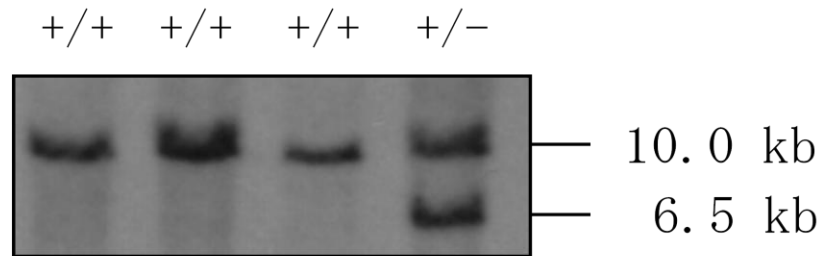


図 6. Targeting vector の構築

CIBZ 遺伝子の ORF (Genomic locus の黒い box)、targeting vector、相同組換え後の配列、Southern blot 法の probe の位置、Genomic PCR 法のプライマーの位置をそれぞれ示した。CIBZ の ORF とネオマイシン遺伝子 (pgk-neo) が相同組換えを生じると ORF が全て欠損するように targeting vector を設計した。Southern blot 法を行う際、野生型及び相同組換え体で、BamH I 消化後に予測されるバンドのサイズを示した (10.0kb、6.5kb)。Genomic PCR 法を行う際、野生型及び相同組換え体で合成されるバンドのサイズを示した (2.0kb、2.2kb)。targeting vector は、ポジティブ選択に pgk-neo、ネガティブ選択に pgk-tk のカセットを有している。

A



B

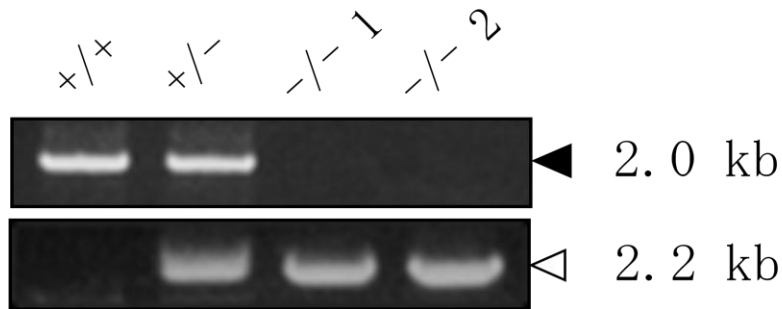


図 7. CIBZ が欠損したマウス ES 細胞の作製

- A. ES 細胞の相同組換え体のスクリーニングを行うため、各 ES クローンから Genomic DNA を抽出した。Genomic DNA を BamH I で消化し、野生型のアレルは 10.0kb に、相同組換え体のアレルは 6.5kb にそれぞれバンドを検出できる probe を用いて、Southern blot 法を行った。相同組換え体では 10.0kb と 6.5kb のバンド 2 本、非相同組換え体では 6.5kb のバンド 1 本を検出した。
- B. ES 細胞の遺伝子型解析のために、野生型、ヘテロ欠損型、ホモ欠損型の ES 細胞からそれぞれ Genomic DNA を抽出した。野生型のアレルは 2.0kb に、相同組換え体のアレルは 2.2kb に、それぞれバンドを検出できるプライマーセットを用いて、Genomic PCR 法を行った。野生型は 2.0kb のバンド 1 本、ヘテロ欠損型は 2.0kb と 2.2kb のバンド 2 本、ホモ欠損型は 2.2kb のバンド 1 本を検出した。

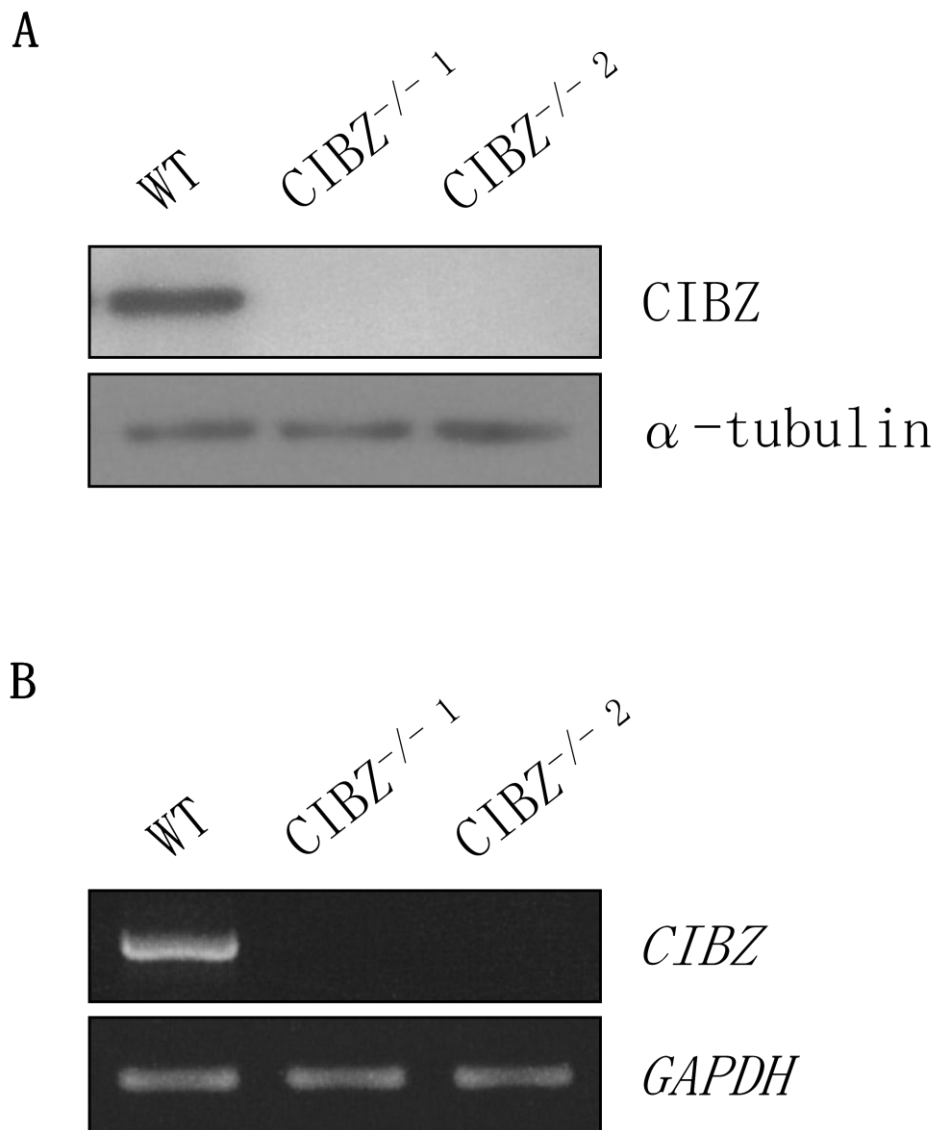


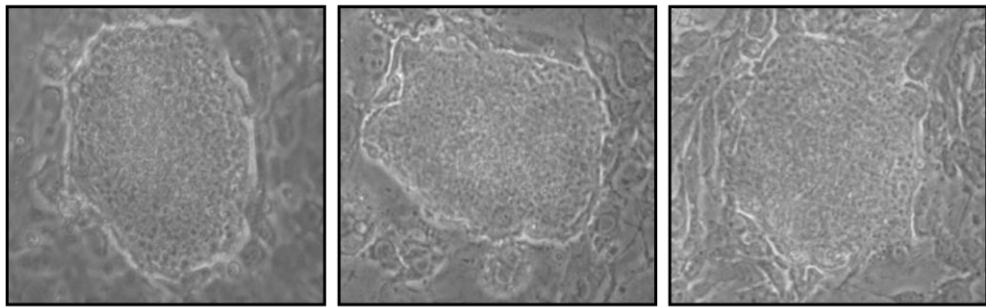
図 8. CIBZ が欠損した ES 細胞における CIBZ のタンパク質と mRNA の発現
 CIBZ を欠損した ES 細胞における CIBZ のタンパク質と mRNA の欠損を調べるため、野生型とホモ欠損型 ES 細胞からタンパク質と mRNA を抽出し、Western blot 法 (A) と半定量 RT-PCR 法 (B) でそれぞれの発現量を解析した。 α -tubulin と GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をそれぞれの内部標準とした。

A

WT

CIBZ^{-/-} 1

CIBZ^{-/-} 2



B

WT

CIBZ^{-/-} 1

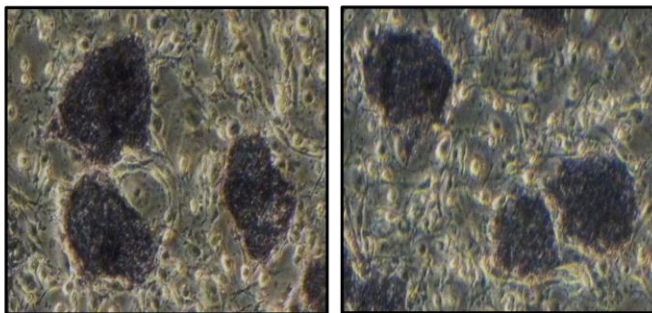


図 9. CIBZ が欠損した ES 細胞の未分化性状態

- A. フィーダー細胞上の野生型とホモ欠損型の ES 細胞を明視野顕微鏡で観察した。
- B. 野生型とホモ欠損型の ES 細胞をアルカリファスファターゼで染色し、明視野顕微鏡で観察した。

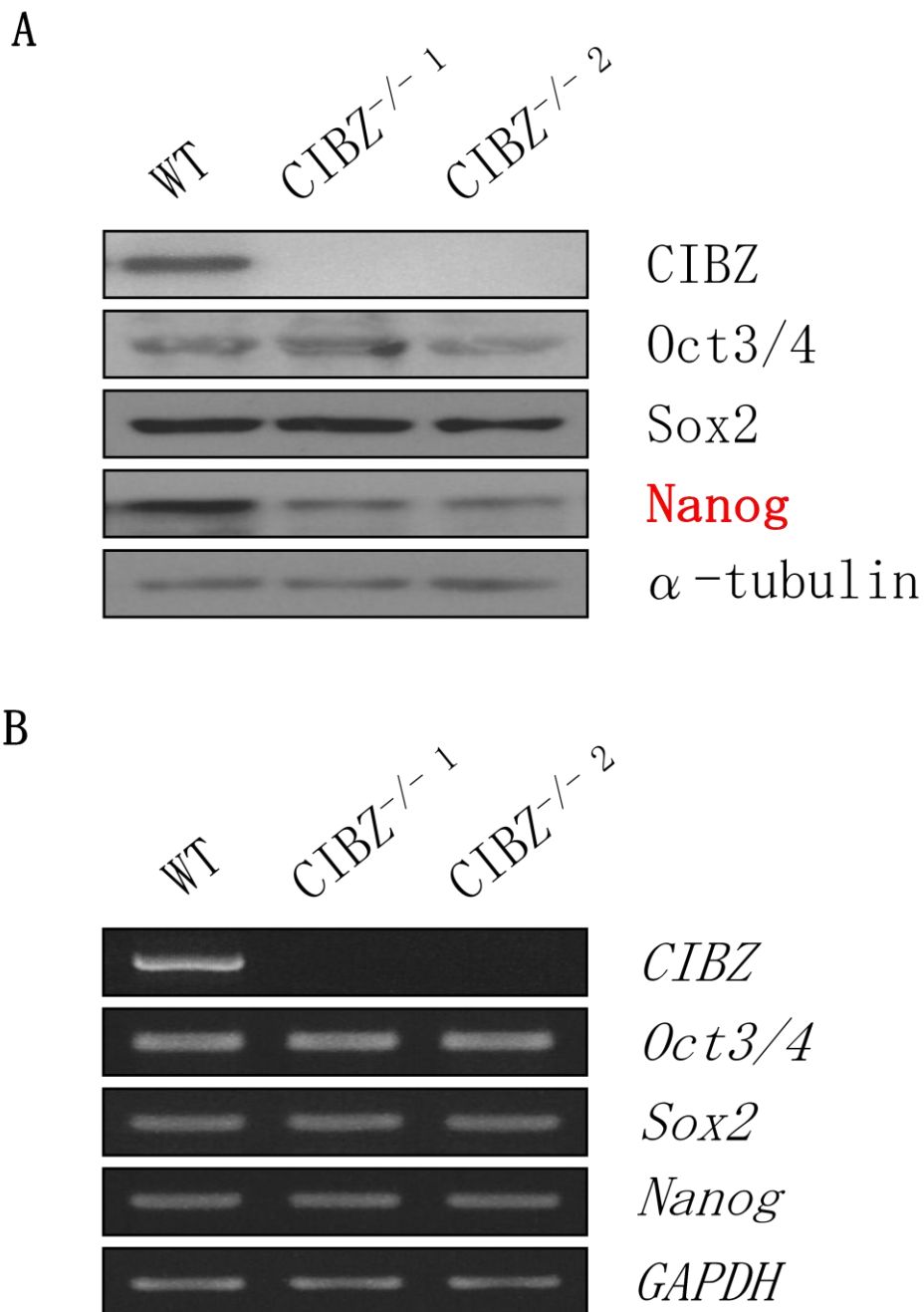


図 10. CIBZ が欠損した ES 細胞の未分化マーカーの発現

CIBZ を欠損した ES 細胞における未分化マーカーの Oct3/4、Sox2、Nanog のタンパク質と mRNA の発現を調べるため、野生型とホモ欠損型 ES 細胞からタンパク質と mRNA を抽出し、Western blot 法(A)と半定量 RT-PCR 法(B)でそれぞれの発現量を解析した。 α -tubulin と GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)をそれぞれの内部標準とした。

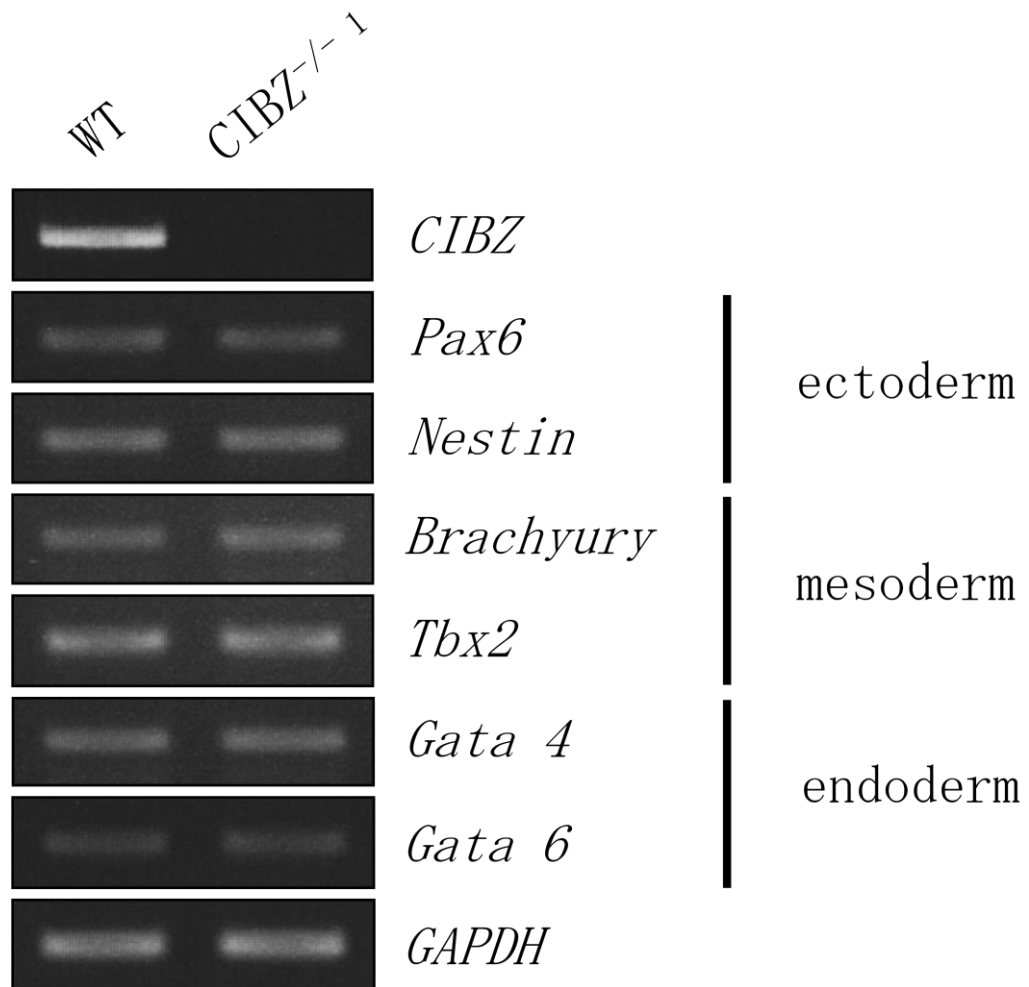


図 11. CIBZ が欠損した ES 細胞の分化マーカーの発現

野生型とホモ欠損型の ES 細胞から、mRNA を抽出し、半定量 RT-PCR 法で分化マーカーの発現量を解析した。Gata4 と Gata6 は内胚葉分化マーカー、Brachyury と Tbx2 は中胚葉分化マーカー、Pax6 と Nestin は外胚葉分化マーカーである。GAPDH (Glycer α ldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を内部標準とした。

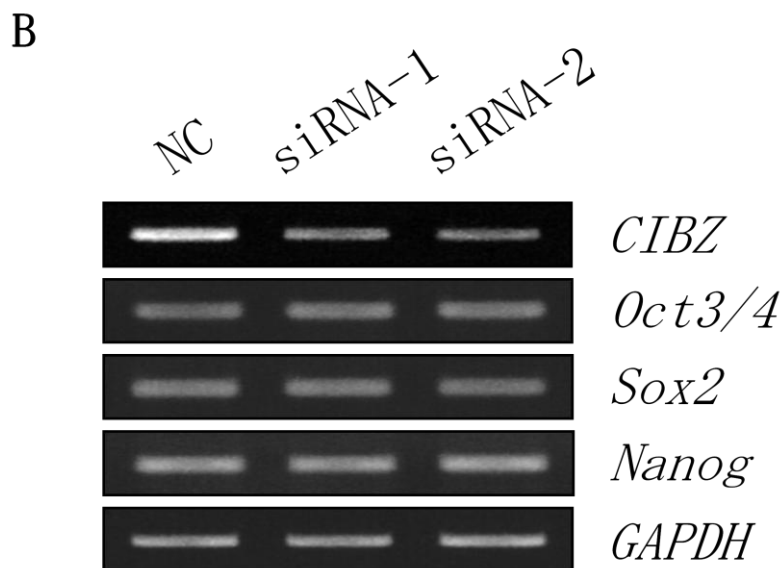
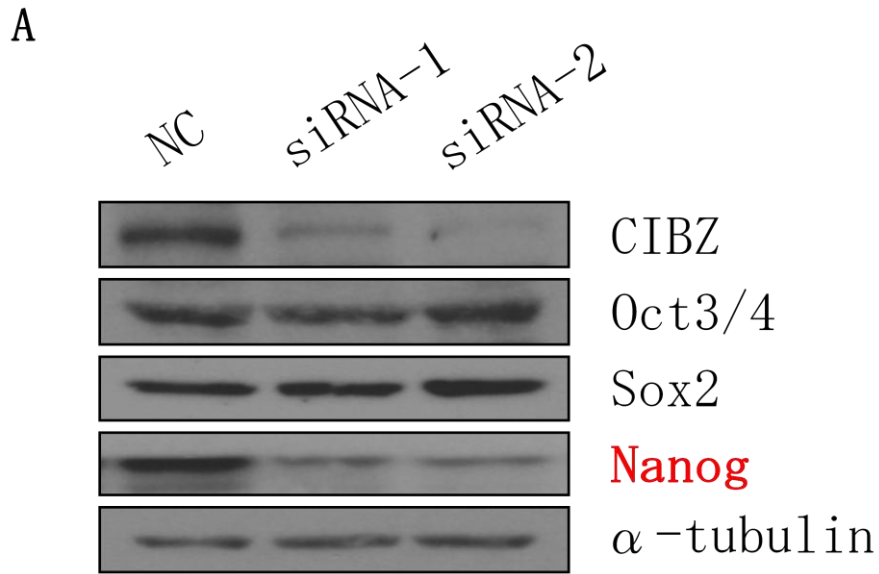


図 12. CIBZ が一過性に発現低下した ES 細胞における CIBZ のタンパク質と mRNA の発現

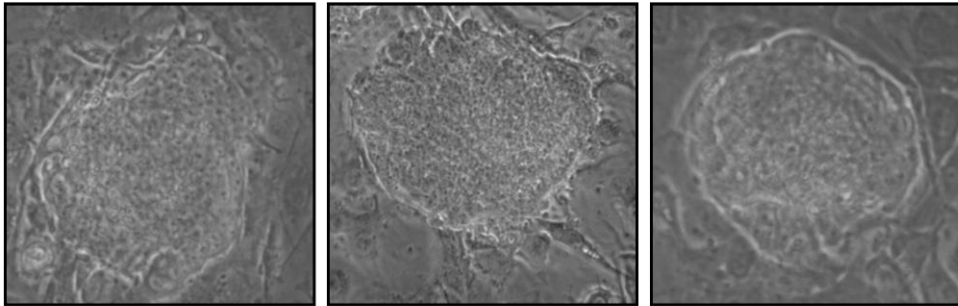
ES 細胞で 2 種類の siRNA を使用して、CIBZ を一過性にノックダウンした。CIBZ が発現低下した ES 細胞から、タンパク質と mRNA を抽出し、Western blot 法 (A) と半定量 RT-PCR 法 (B) でそれぞれの発現量を解析した。同時に、未分化マーカーの Oct3/4、Sox2、Nanog のタンパク質と mRNA の発現も解析した。 α -tubulin と GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をそれぞれの内部標準とした。

A

NC

siRNA-1

siRNA-2



B

NC

siRNA-1

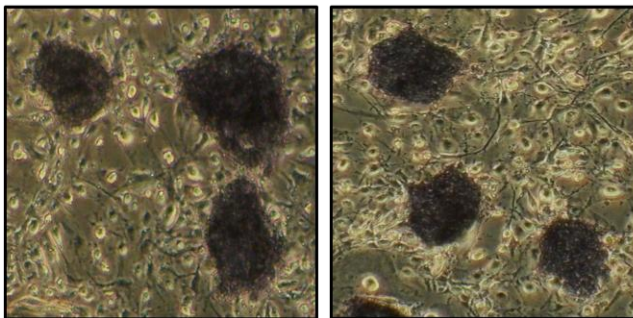


図 13. CIBZ が一過性に発現低下した ES 細胞の未分化性状態

- A. フィーダー細胞上のコントロールと発現低下した ES 細胞を明視野顕微鏡で観察した。
- B. コントロールと発現低下した ES 細胞をアルカリファスファターゼで染色し、明視野顕微鏡で観察した。

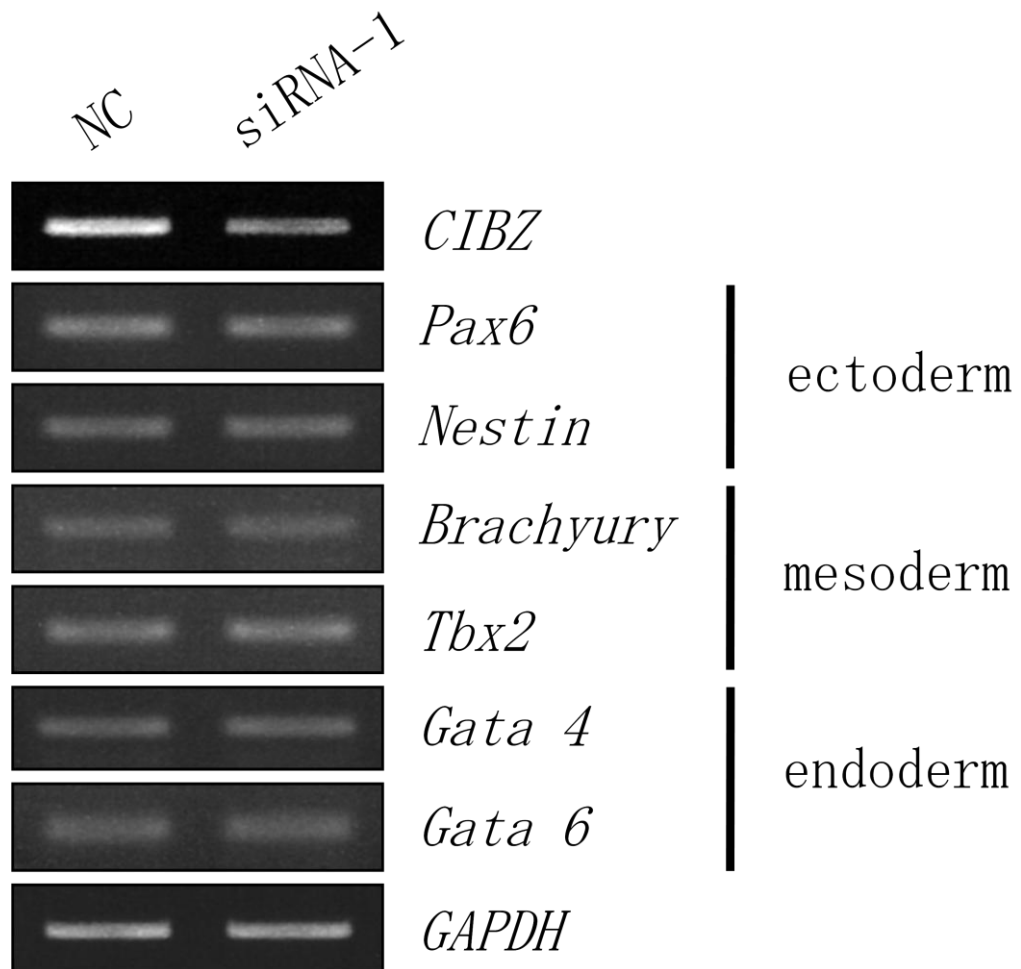


図 14. CIBZ が一過性に発現低下した ES 細胞の分化マーカーの発現

コントロールと発現低下した ES 細胞から、mRNA を抽出し、半定量 RT-PCR 法で分化マーカーの発現量を解析した。Gata4 と Gata6 は内胚葉分化マーカー、Brachyury と Tbx2 は中胚葉分化マーカー、Pax6 と Nestin は外胚葉分化マーカーである。

GAPDH (Glyceralaldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を内部標準とした。

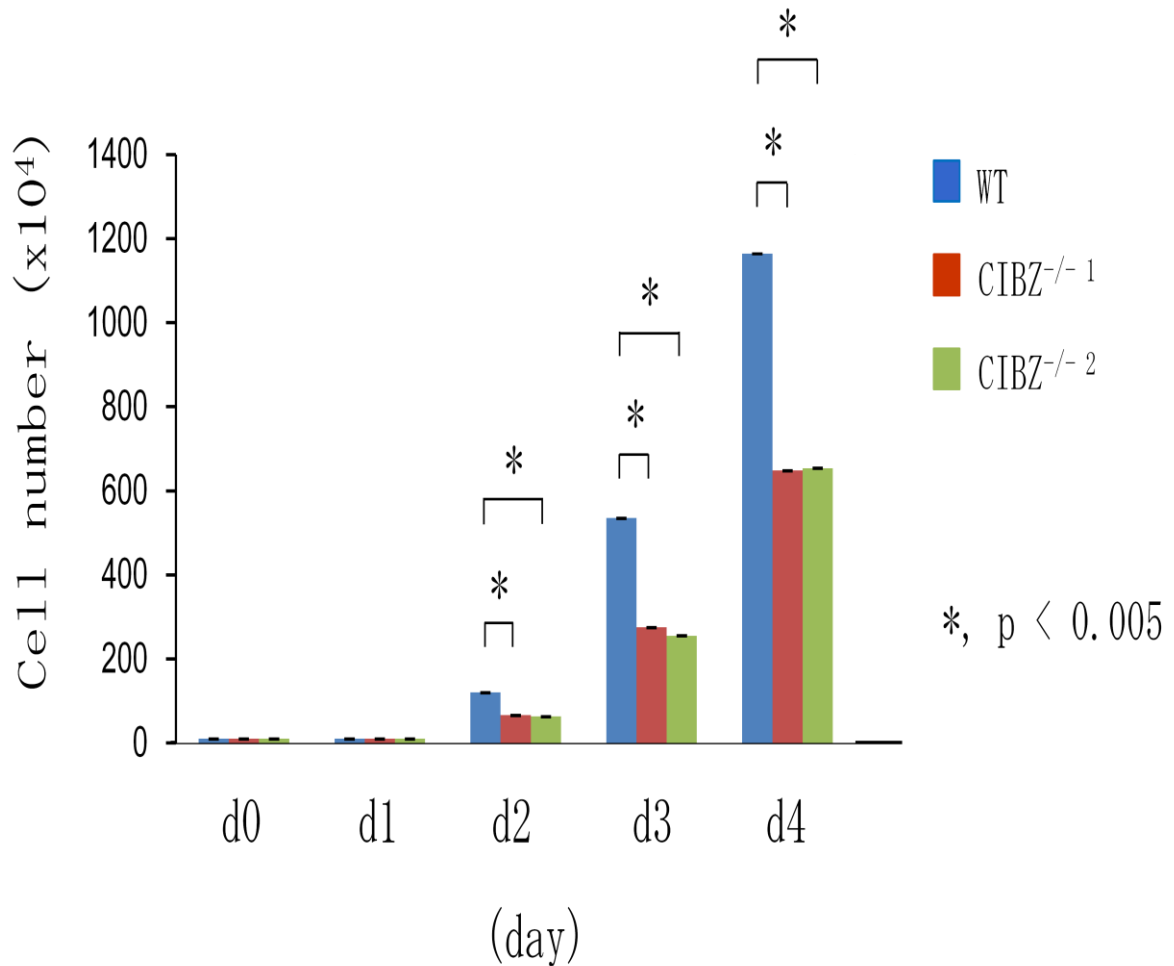


図 15. CIBZ が欠損した ES 細胞の細胞数減少

野生型と CIBZ 欠損型の ES 細胞をそれぞれ 6cm ディッシュに 1×10^5 個の細胞数を播種し、1、2、3、4 日毎に細胞数をカウントした。p は、野生型とホモ欠損型の細胞数の平均値の差の検定値を示す。

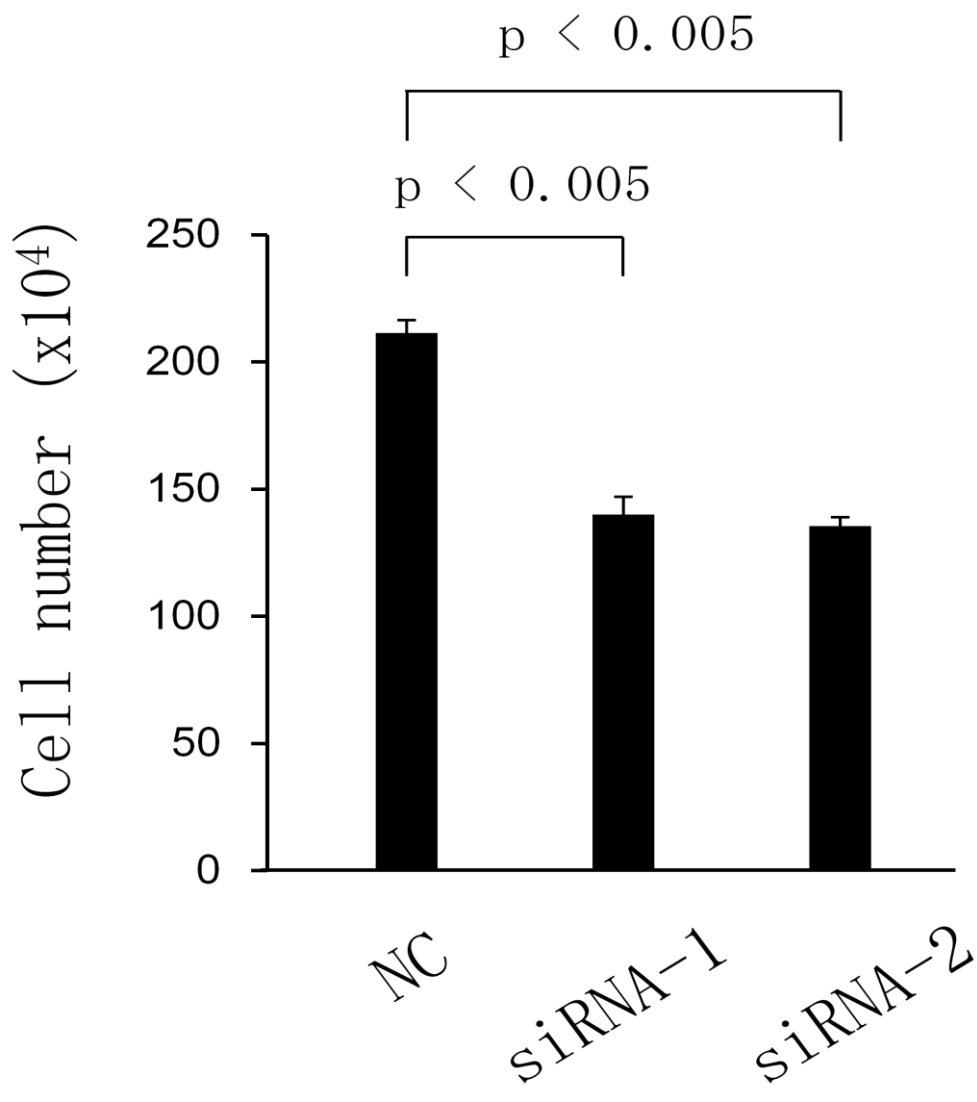


図 16. CIBZ が一過性に発現低下した ES 細胞の細胞数減少

コントロールと 2 種類の siRNA を使用してノックダウンした ES 細胞をそれぞれ 6 穴プレートに 4×10^5 個の細胞数を播種し、2 日後の細胞数をカウントした。

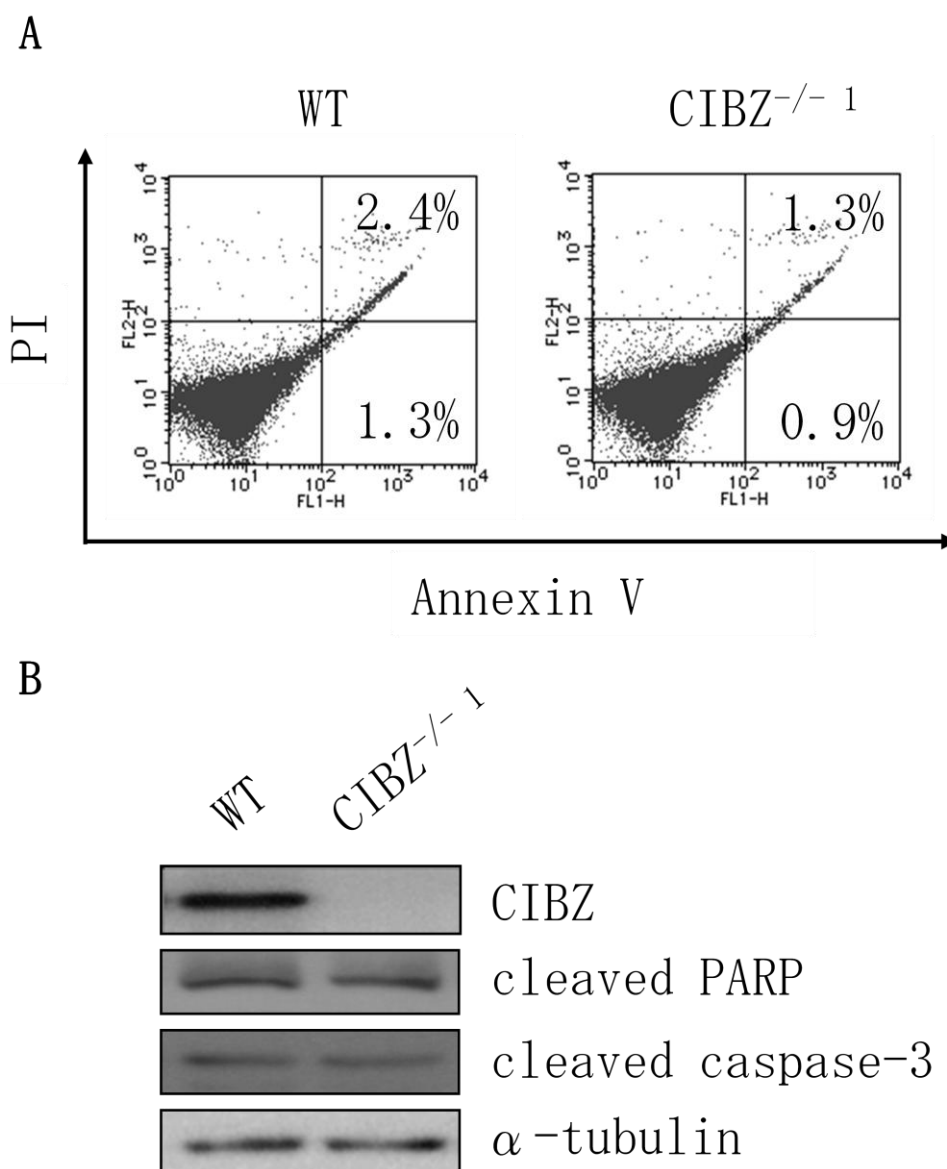


図 17. CIBZ が欠損した ES 細胞の細胞死

- A.** 野生型とホモ欠損型の ES 細胞を用いて、死細胞数の違いを AnnexinV-FITC/PI 染色によりフローサイトメトリーを用いて解析を行った。AnnexinV-FITC 陽性と PI 陰性の領域(右下;初期細胞死)、AnnexinV-FITC 陽性と PI 陽性の領域(右上;後期細胞死)の細胞数の割合を示した。
- B.** 野生型とホモ欠損型の ES 細胞において、細胞死マーカーの cleaved PARP と cleaved caspase-3 の発現を Western blot 法を用いて解析した。 α -tubulin を内部標準とした。

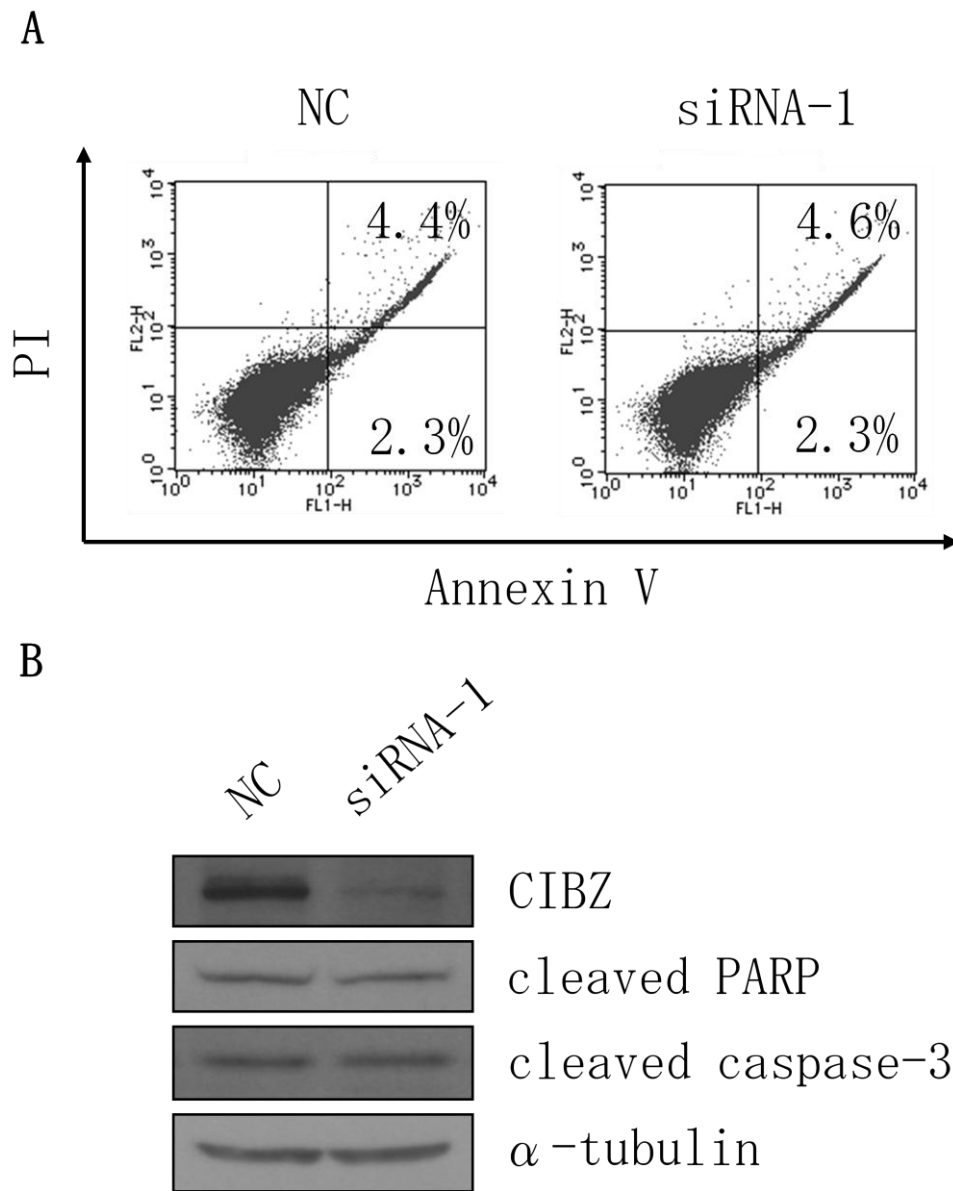


図 18. CIBZ が一過性に発現低下した ES 細胞の細胞死

- A. コントロールと発現低下した ES 細胞を用いて、死細胞数の違いを AnnexinV-FITC/PI 染色によりフローサイトメトリーを用いて解析を行った。AnnexinV-FITC 陽性と PI 陰性の領域(右下；初期細胞死)、AnnexinV-FITC 陽性と PI 陽性の領域(右上；後期細胞死)の細胞数の割合を示した。
- B. コントロールと発現低下した ES 細胞において、細胞死マーカーの cleaved PARP と cleaved caspase-3 の発現レベルを Western blot 法を用いて解析した。 α -tubulin を内部標準とした。

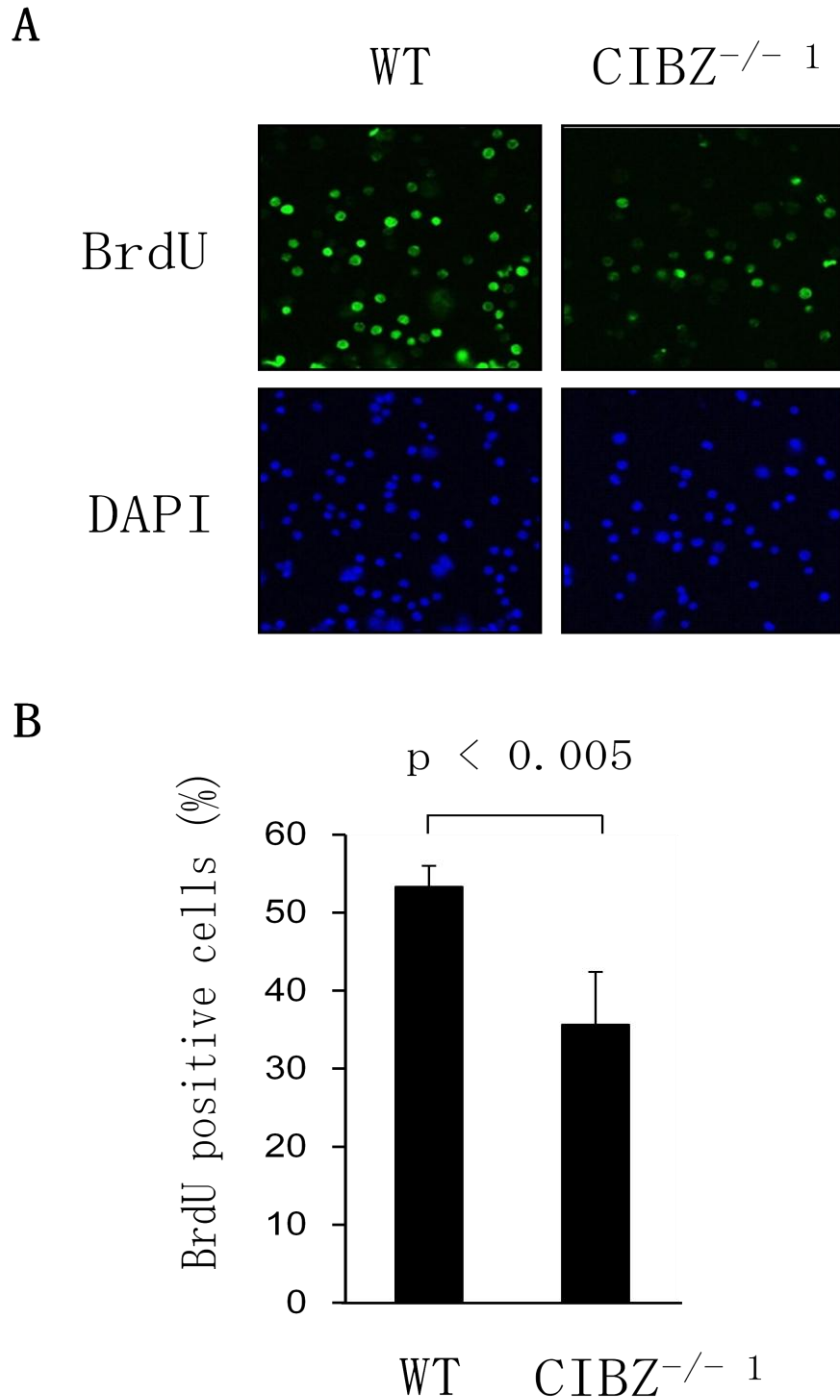


図 19. CIBZ が欠損した ES 細胞の増殖抑制

- A. 野生型とホモ欠損型の ES 細胞において、BrdU を取り込ませ免疫蛍光染色法を行った。最後に、DAPI で核を染色し蛍光顕微鏡で観察した。
- B. DAPI 陽性に占める BrdU 陽性の細胞数を免疫蛍光顕微鏡で 10 枚観察し、細胞数をカウントし、割合にした。

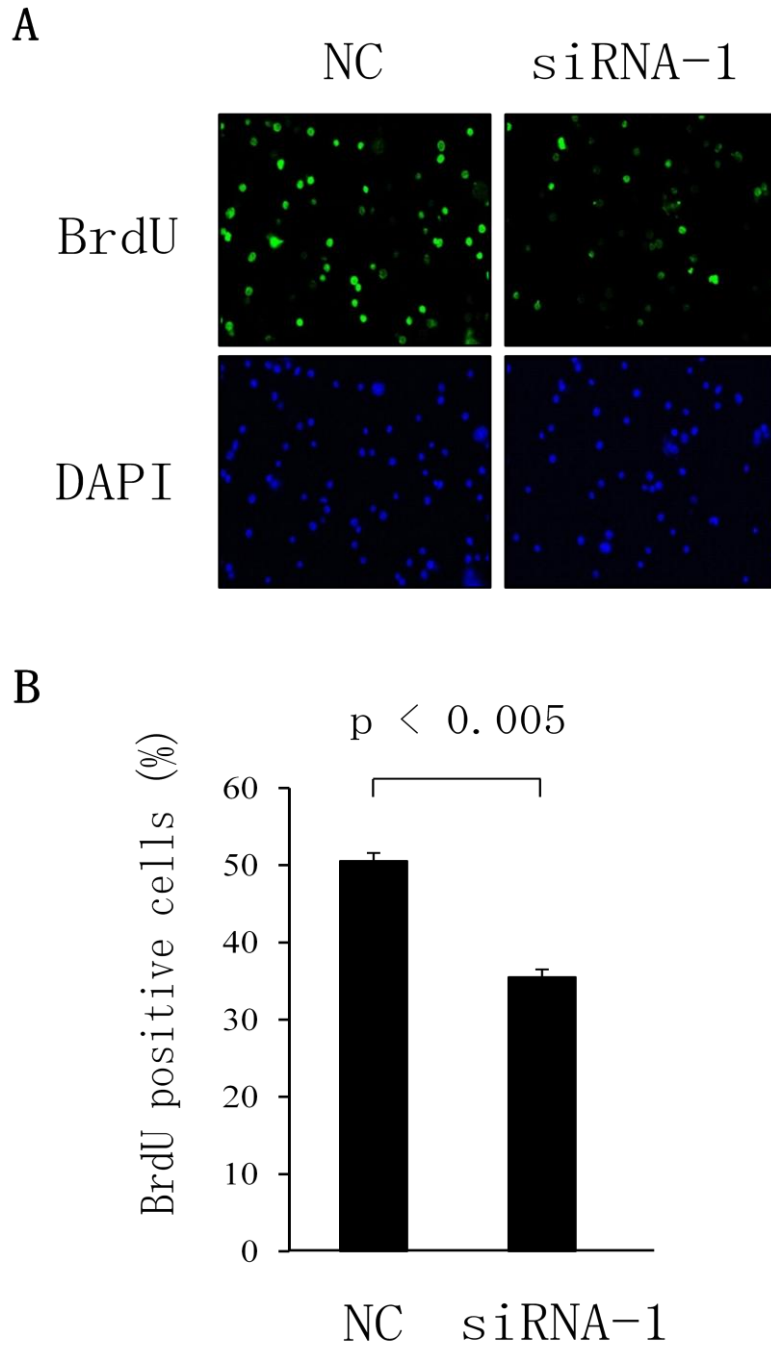
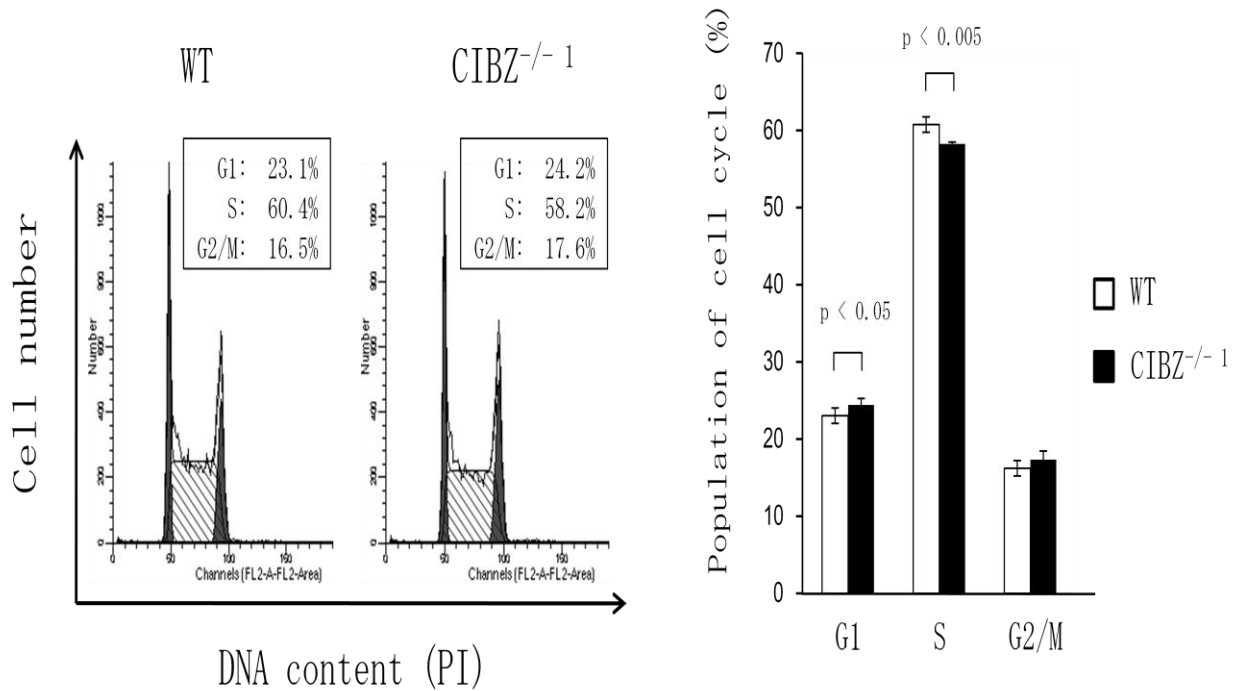


図 20. CIBZ が一過性に発現低下した ES 細胞の増殖抑制

- A. コントロールと発現低下した ES 細胞において、BrdU を取り込ませ、免疫蛍光染色法を行った。最後に、DAPI で核を染色し、蛍光顕微鏡で観察した。
- B. DAPI 陽性に占める BrdU 陽性の細胞数を免疫蛍光顕微鏡で 10 枚観察し、細胞数をカウントし、割合にした。

A



B

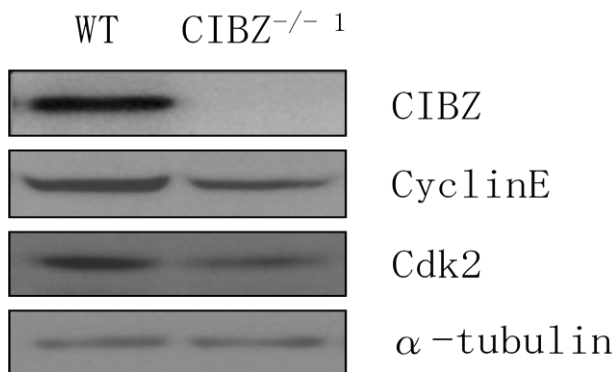


図 21. CIBZ の欠損による細胞周期 (G1 期から S 期への移行) の遅延

- A. 野生型と欠損型の ES 細胞において、PI 染色を行い、細胞周期をフローサイトメトリーを用いて解析した。代表的な細胞周期の構成 (左図) と 3 回の実験の平均の図を示した (右図)。
- B. 野生型と欠損型の ES 細胞において、CyclinE と Cdk2 の発現を Western blot 法を用いて解析した。 α -tubulin を内部標準とした。

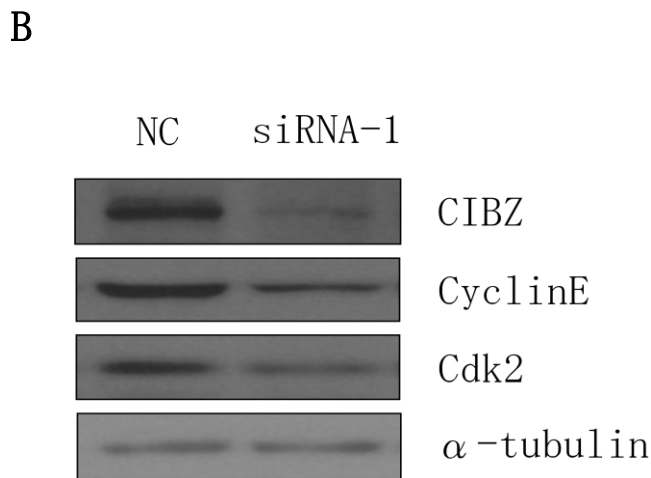
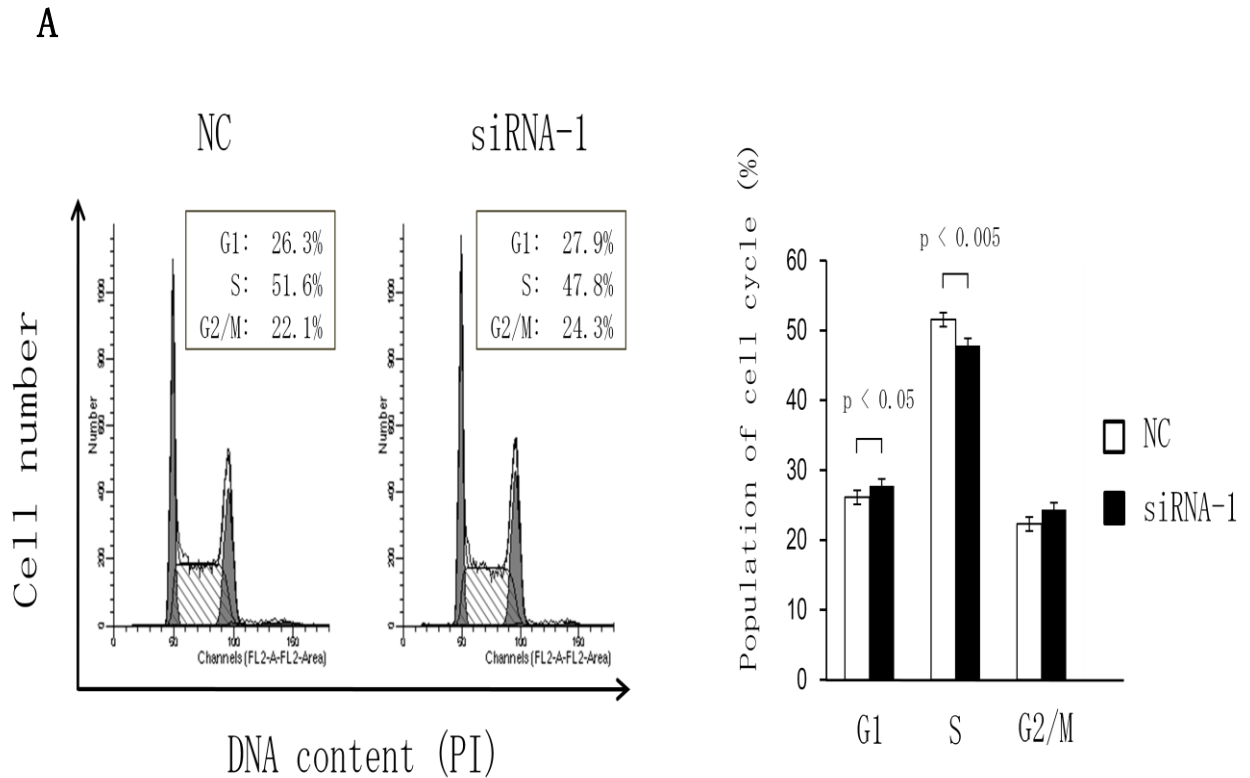


図 22. CIBZ の一過性発現低下による細胞周期(G1 期から S 期への移行)の遅延

- A. コントロールと発現低下した ES 細胞において、PI 染色を行い、細胞周期をフローサイトメトリーを用いて解析した。代表的な細胞周期の構成(左図)と 3 回の実験の平均の図を示した(右図)。
- B. コントロールと発現低下した ES 細胞において、CyclinE と Cdk2 の発現を Western blot 法を用いて解析した。 α -tubulin を内部標準とした。

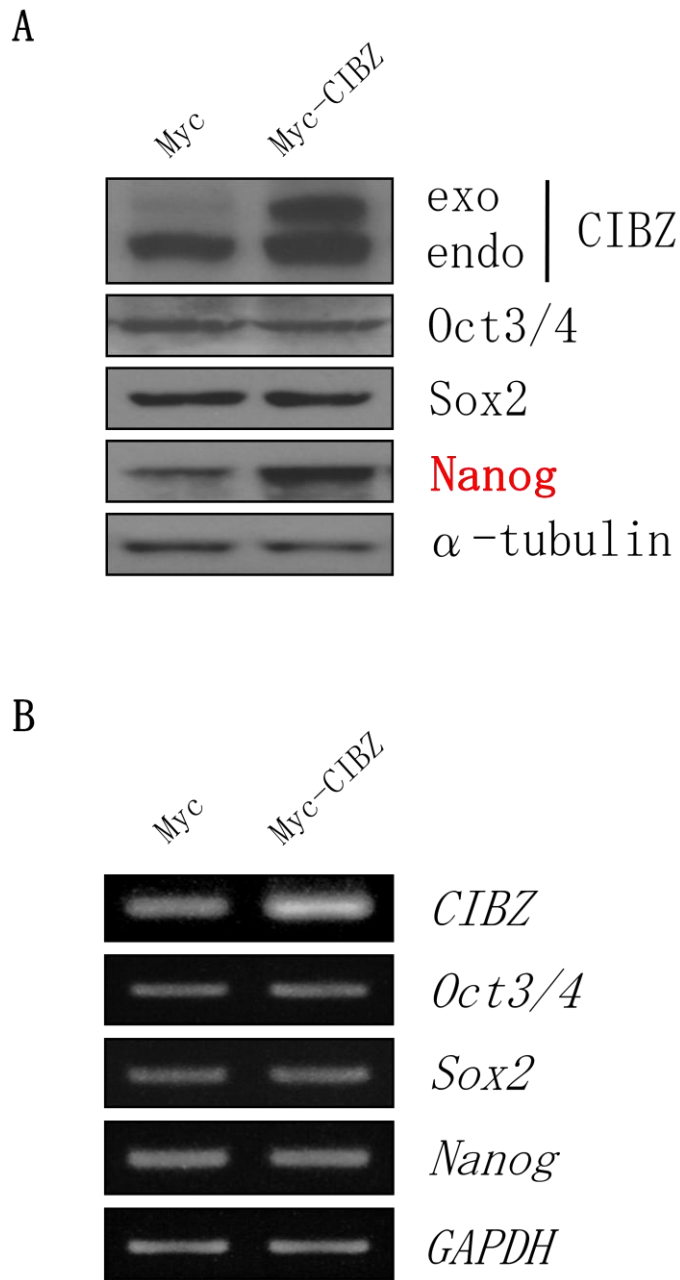


図 23. CIBZ が過剰発現した ES 細胞の未分化性状態

CIBZ を恒常的に発現させた ES 細胞から、タンパク質と mRNA を抽出し、Western blot 法 (A) と半定量 RT-PCR 法 (B) でそれぞれの発現量を解析した。Endo は内在性の CIBZ を、exo は外来性の CIBZ を表す。未分化マーカーである Oct3/4、Sox2、Nanog のタンパク質と mRNA の発現を解析した。 α -tubulin と GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をそれぞれの内部標準とした。

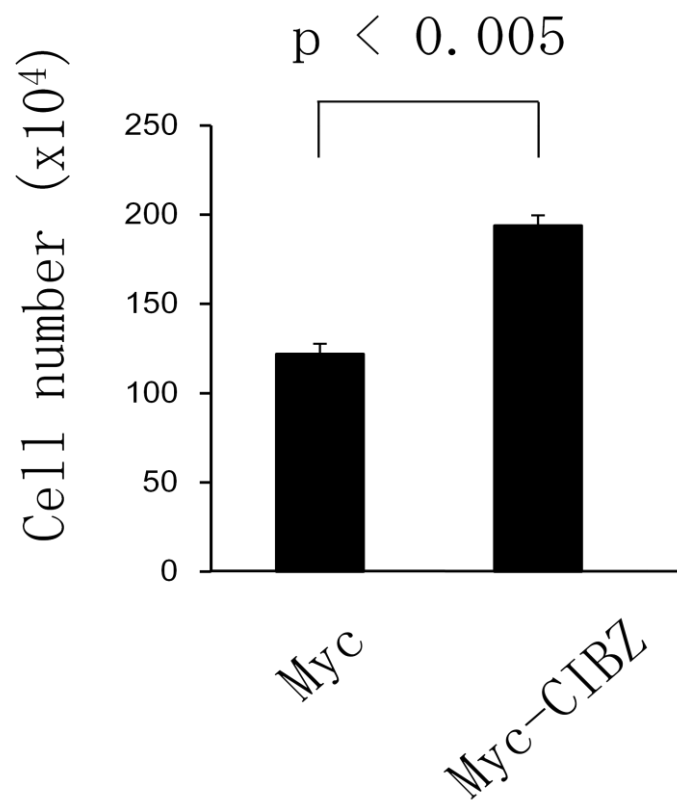


図 24. CIBZ が過剰発現した ES 細胞の増殖促進

コントロールと CIBZ を過剰発現した ES 細胞において、それぞれ 6 穴プレートに 2×10^5 個の細胞数を播種し、2 日後に細胞数をカウントした。

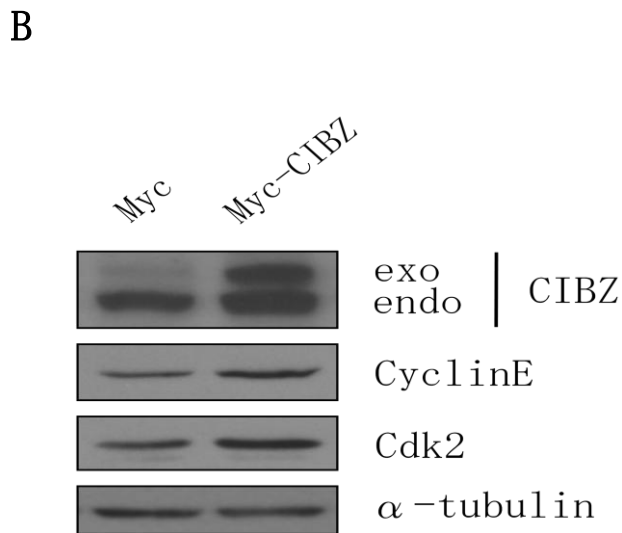
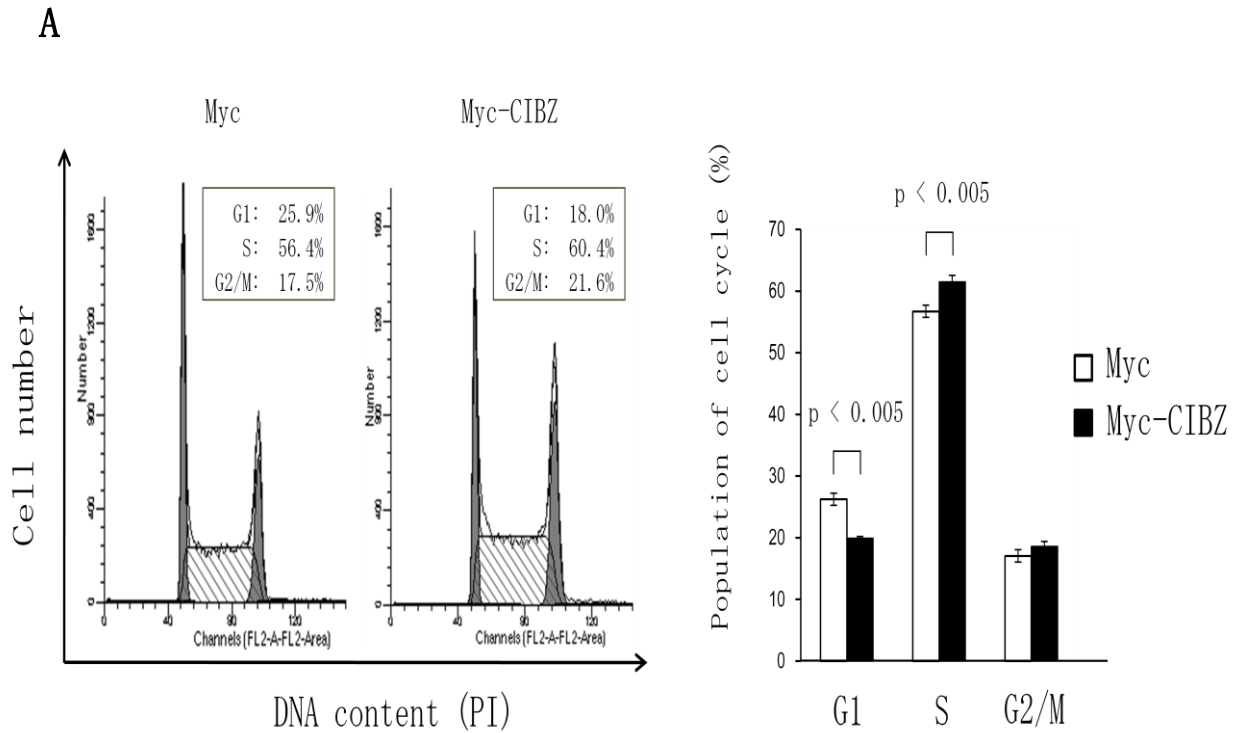
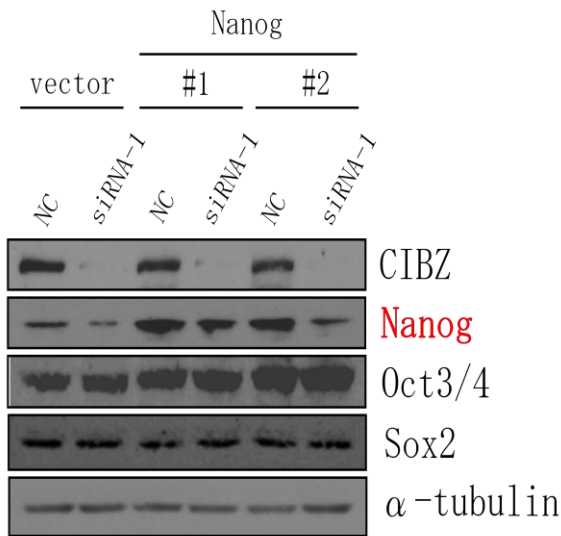


図 25. CIBZ の過剰発現による細胞周期 (G1 期から S 期への移行) の促進

- A.** コントロールと CIBZ を過剰発現した ES 細胞において、PI 染色を行い、細胞周期をフローサイトメトリーを用いて解析した。代表的な細胞周期の構成 (左図) と 3 回の実験の平均の図を示した (右図)。
- B.** コントロールと CIBZ を過剰発現した ES 細胞において、CyclinE と Cdk2 の発現レベルを Western blot 法を用いて解析した。 α -tubulin を内部標準とした。

A



B

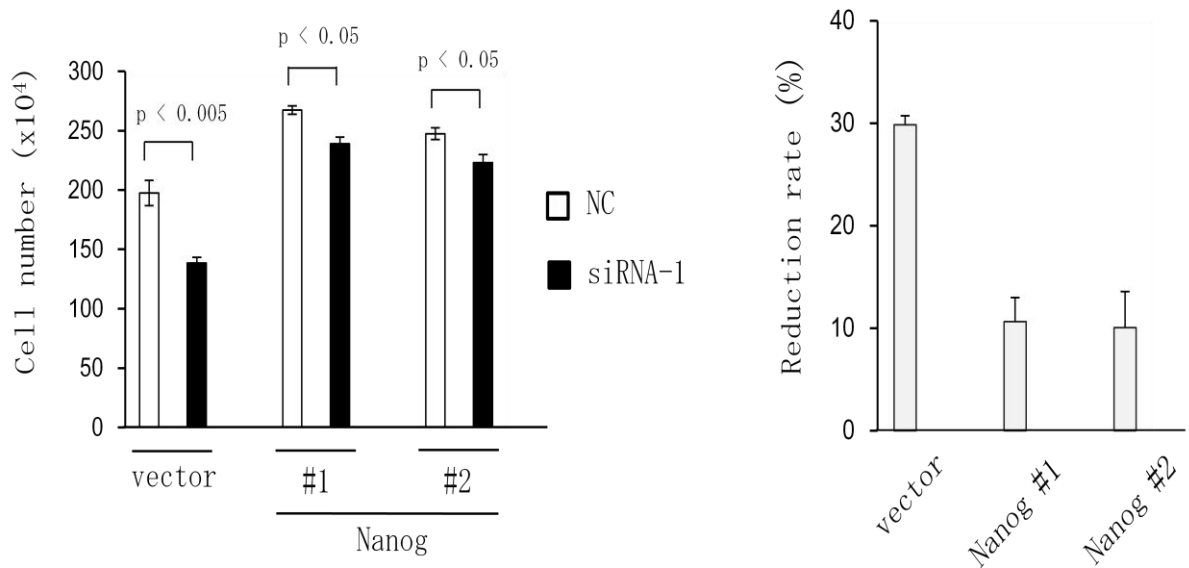


図 26. Nanog が過剰発現した ES 細胞の樹立、及び Nanog の過剰発現が CIBZ の一過性発現低下に及ぼす効果

- A. 恒常的に Nanog を過剰発現した ES 細胞において、CIBZ を一過性に発現低下した ES 細胞からタンパク質を抽出し、Western blot 法で CIBZ 及び未分化マーカーの発現を解析した。 α -tubulin を内部標準とした。
- B. 恒常的に Nanog を過剰発現した ES 細胞において、CIBZ を一過性に発現低下し、2 日後に細胞数をカウントした(左図)。コントロールに対する CIBZ を一過性に発現低下した際の細胞数の減少の割合を数値化した(右図)。

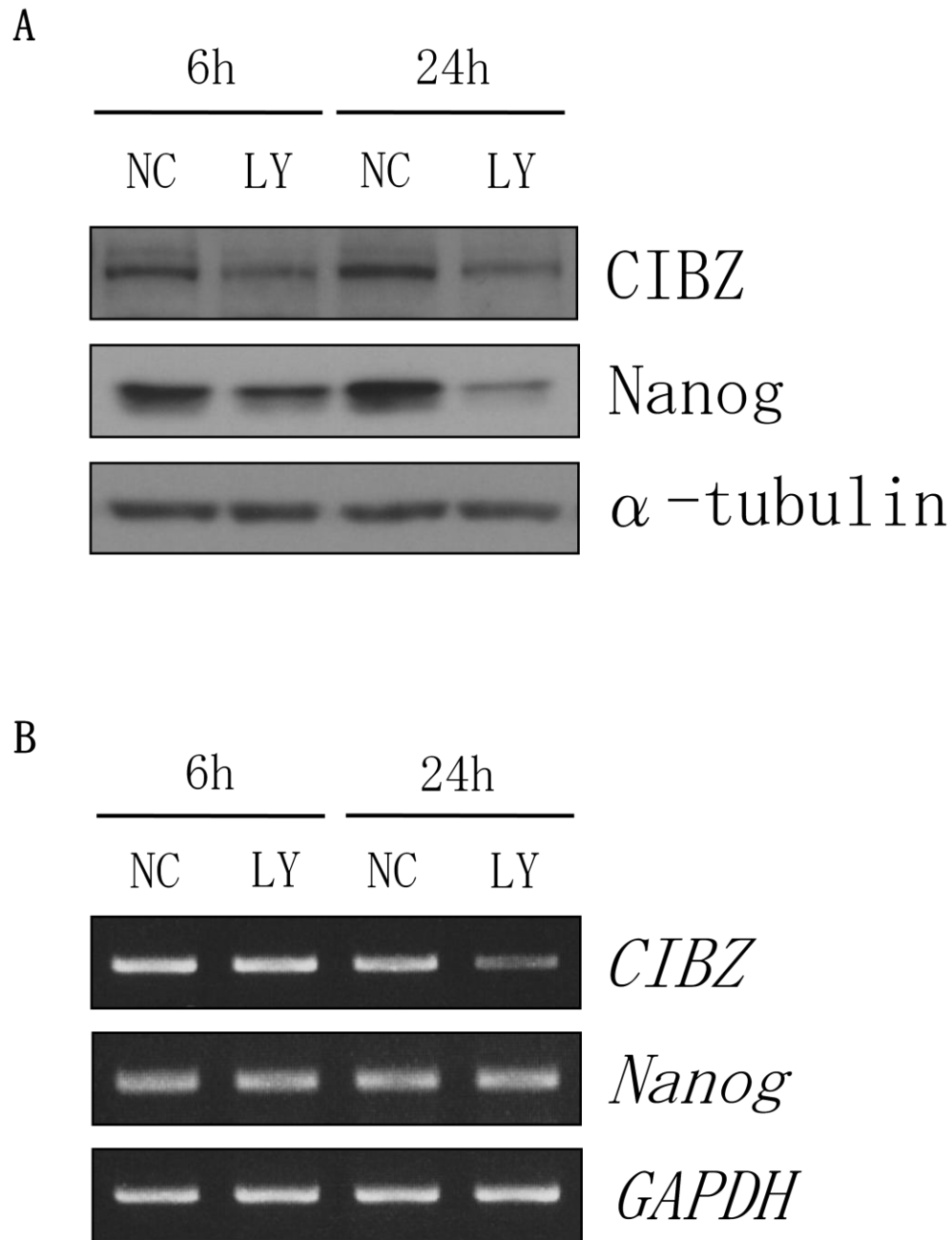


図 27. ES 細胞の増殖における CIBZ と PI3K/AKT シグナル経路の関係

PI3K キナーゼ阻害剤の LY294002 (10nM) を添加後、6 時間後と 24 時間後の ES 細胞から、タンパク質と mRNA を抽出し、Western blot 法 (A) と半定量 RT-PCR 法 (B) でそれぞれの発現量を解析した。コントロールには、LY294002 の粉末を溶解させるための DMSO (Dimethyl sulfoxide) を加えた。 α -tubulin と GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をそれぞれの内部標準とした。

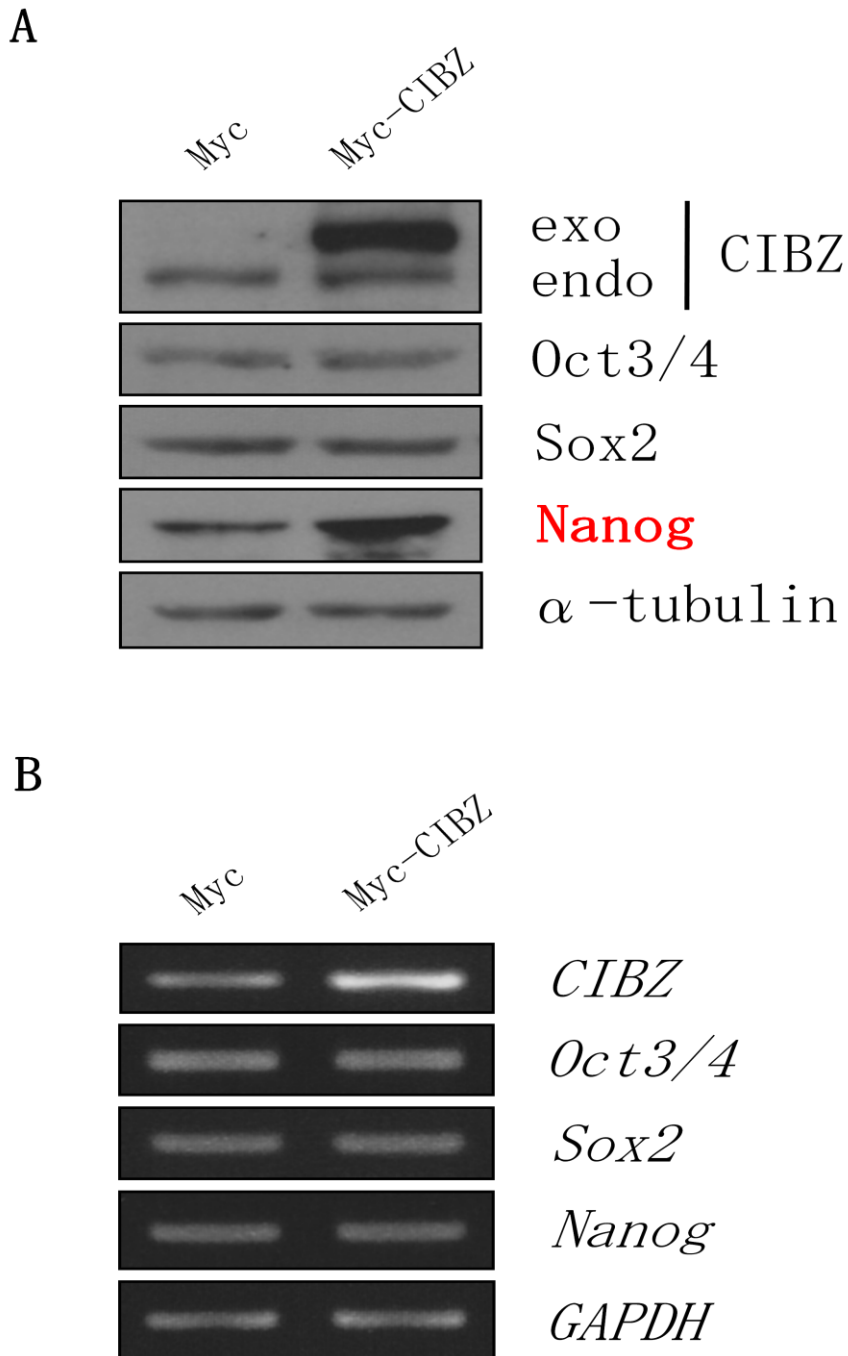


図 28. CIBZ の一過性過剰発現による Nanog タンパク質の発現変化

CIBZ を一過性に過剰発現した ES 細胞から、タンパク質と mRNA を抽出し、Western blot 法 (A) と半定量 RT-PCR 法 (B) でそれぞれの発現量を解析した。Endo は内在性の CIBZ を、exo は外来性の CIBZ を表す。 α -tubulin と GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) をそれぞれの内部標準とした。

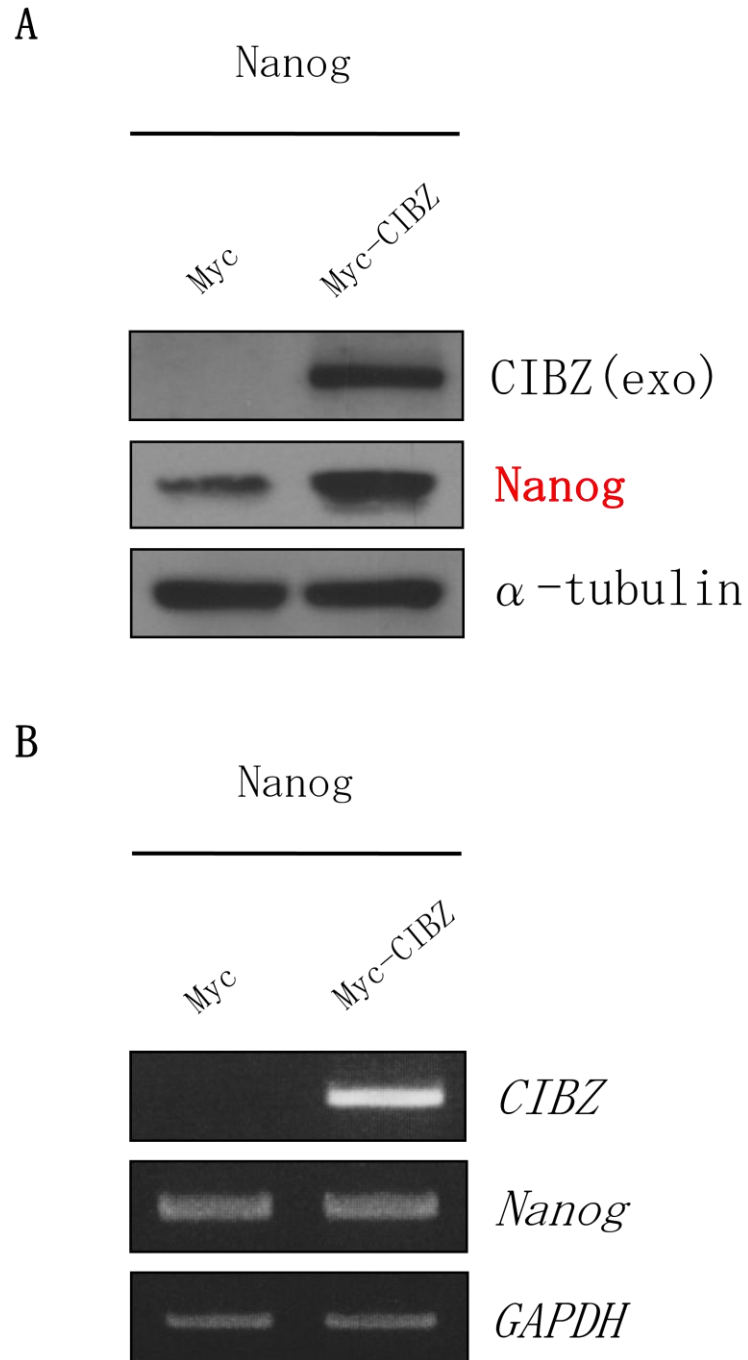


図 29. ヒトの胚性腎細胞における CIBZ の一過性過剰発現による Nanog タンパク質の発現変化

CIBZ と Nanog を共に一過性に過剰発現した HEK293T 細胞から、タンパク質と mRNA を抽出し、Western blot 法(A)と半定量 RT-PCR 法(B)でそれぞれの発現量を解析した。 α -tubulin と GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)をそれぞれの内部標準とした。

考察

CIBZ による ES 細胞の未分化性状態に及ぼす影響

本研究では、CIBZ の発現変化(欠損、発現低下、過剰発現)した ES 細胞を用いて、CIBZ の ES 細胞における機能解析を行った。ES 細胞の 2 つの重要な特性の内、自己複製能に着目し、研究を進めた。ES 細胞の自己複製能は、未分化性状態を維持しつつ、細胞増殖を行うことが知られている。まず、未分化性状態を維持しているかを、① ES 細胞の形態観察、② アルカリフォスファターゼの染色観察、③ 未分化性状態を維持する中心的な転写因子である Oct3/4、Sox2、Nanog のタンパク質と mRNA の発現観察 の 3 つの点で検証した。

その結果、CIBZ の発現変化(欠損、発現低下、過剰発現)した ES コロニーは、野生型と同様にコンパクトで丸い形態を示した(図 9A、13A)。また、ES 細胞の未分化性状態を評価するアルカリフォスファターゼ染色より、CIBZ の発現変化した ES 細胞は未分化性状態を維持していた(図 9B、13B)。さらに、CIBZ の発現変化した ES 細胞は、コントロール ES 細胞と比較しても Oct3/4、Sox2、Nanog の mRNA の発現には変化はなかった(図 10B、12B、23B、28B)。タンパク質の発現において、Oct3/4 と Sox2 には変化はなかったが、Nanog には変化が見られた(図 10A、12A、23A、28A)。CIBZ の欠損と発現低下において、ES 細胞の分化マーカーの発現は上昇していなかった(図 11、14)。

CIBZ の欠損と発現低下では、Nanog タンパク質のみ発現が減少し、CIBZ の過剰発現では、Nanog タンパク質のみ発現が増加していた。Nanog を欠損した ES 細胞は、Oct3/4、Sox2 の発現(タンパク質、mRNA)が変化せず、未分化性状態を維持することが知られている。

これらの結果より、CIBZ の発現変化は Nanog タンパク質の発現に影響を及ぼしているが、CIBZ は ES 細胞の未分化性状態の維持に必須ではないことが判明した。

CIBZ による ES 細胞の細胞死に及ぼす影響

未分化性状態の維持を確認後、細胞増殖の解析を進めた。野生型と CIBZ が欠損した ES 細胞を同じ培養条件下で培養すると、CIBZ が欠損した ES 細胞は細胞数の低下が観察された。細胞数は、細胞増殖と細胞死によって制御されている。筋芽細胞では、CIBZ の発現低下において、細胞死を誘導することが判明した(図 5A)。よって、CIBZ の欠損と発現低下により、細胞死を誘導し、ES 細胞の増殖が抑制されている可能性が示唆された。

そこで、フローサイトメーターと細胞死マーカーのタンパク質の発現により、細胞死を検証した。その結果、CIBZ の欠損と発現低下において、フローサイトメーターにおける初期細胞死と後期細胞死に変化は見られず、また細胞死マーカーの発現にも変化は見られなかった(図 17A-B、18A-B)。つまり、ES 細胞における CIBZ の欠損と発現低下は、筋芽細胞とは異なり細胞死には関与しないことが判明した。

しかし、マウスの繊維芽細胞である NIH3T3 細胞では、CIBZ の発現低下において、直接細胞死を引き起こさず、UV 照射やアクチノマイシン D などの外部からの誘導刺激により細胞死を引き起こすことを確認している。それ故、ES 細胞も NIH3T3 細胞と同様に、外部からの刺激による細胞死の感受性が高まる可能性が考えられる。

CIBZ による ES 細胞の増殖に及ぼす影響

Nanog は、ES 細胞の未分化状態の維持のほかに、増殖に重要であることが知られている。CIBZ の発現変化は、細胞死を誘導しないこと、及び ES 細胞の Nanog タンパク質のみ発現が変化したことから、細胞増殖に着目した。CIBZ の発現変化による細胞増殖の変化を細胞数をカウントすることで比較した。その結果、CIBZ の欠損と発現低下により、ES 細胞の細胞数は低下し(図 15、16)、CIBZ の過剰発現により、ES 細胞の細胞数は増加した(図 24)。さらに、細胞増殖を BrdU の取り込み実験においても検証した結果、CIBZ の欠損と発現低下により、BrdU の取り込まれた細胞数は減少した(図 19A-B、20A-B)。

これらの結果より、CIBZ は ES 細胞の増殖を「正」に制御している転写因子であることが判明した。

CIBZ の発現変化において、ES 細胞以外の NIH3T3 細胞に恒常的に CIBZ を過剰発現すると、ES 細胞と同様に細胞増殖が促進された。このように、CIBZ は NIH3T3 細胞の増殖にも影響を及ぼすことが確認された(data not shown)。

CIBZ による ES 細胞の細胞周期(G1 期から S 期への移行)に及ぼす影響

細胞増殖の中心的な役割を担うのが、細胞周期であり、フローサイトメーターを用いて解析した。CIBZ の欠損と発現低下した ES 細胞は、G1 期に占める細胞数の割合が増加し、S 期に占める細胞数の割合が減少した(図 21A、22A)。CIBZ を過剰発現した ES 細胞では、G1 期に占める細胞数の割合が減少し、S 期に占める細胞数の割合が増加した(図 25A)。よって、CIBZ は、G1 期から S 期への移行を「正」に制御することが示唆された。

CyclinE-Cdk2 複合体は、G1 期から S 期への移行に重要であることが報告されている。CIBZ の欠損と発現低下は、ES 細胞での CyclinE と Cdk2 のタンパク質の発現を低下させ(図 21B、22B)、過剰発現では、CyclinE と Cdk2 のタンパク質の発現を増加させた(図 25B)。よって、CIBZ は、ES 細胞の増殖の G1 期から S 期への移行の制御に影響を及ぼすことが判明した。CIBZ が、CyclinE と Cdk2 の発現を制御するメカニズムに関して、それらの転写を直接制御している可能性も考えられる。

ヒト ES 細胞では、Nanog は S 期の制御に関与する脱リン酸化酵素 CDC25A (Cell Division Cycle 25A) とリン酸化酵素 CDK6 (Cyclin-Dependent Kinase 6) の転写を直接制御し、G1 期から S 期への移行を制御することが知られている (Zhang et al., 2009) (図 30A)。しかし、マウス ES 細胞では CIBZ の発現低下において、CDC25A と CDK6 の mRNA に変化はなかった(図 30B)。つまり、マウス ES 細胞では CIBZ による G1 期から S 期への移行の関与は、直接的にこれらの遺伝子を介していないことが判明した。この相異は、マウスとヒトの ES 細胞で異なる増殖メカニズムが存在していると考えられる。

異なるメカニズムの存在として、マウス ES 細胞の増殖では、LIF 及びその下流の gp130-Stat3 シグナル経路は必須であるが、ヒト ES 細胞の増殖では必要ではないという報告もある。

ES 細胞の増殖における CIBZ と Nanog との関係

CIBZ の欠損と発現低下では、Nanog タンパク質の発現が減少し、過剰発現では Nanog タンパク質の発現が増加した。このことより、CIBZ による ES 細胞の増殖の制御は、Nanog タンパク質の発現に関与していることが示唆された。そこで、CIBZ の一過性な発現低下による細胞増殖の低下が、Nanog の過剰発現によって回復できるかを検証した。その結果、Nanog の過剰発現は CIBZ の発現低下による ES 細胞の増殖低下を回復させることが判明した(図 26B)。つまり、CIBZ は Nanog のタンパク質を介して、増殖に影響を与えていることが判明した。

PI3K/AKT シグナル経路は、ES 細胞の増殖に必須で、G1 期から S 期への移行に重要である。PI3K/AKT シグナル経路を阻害すると、Nanog のタンパク質と同様に CIBZ のタンパク質の発現も減少することが確認された(図 27A)。

よって、CIBZ による Nanog のタンパク質の発現制御は、PI3K/AKT シグナル経路を介して ES 細胞の G1 期から S 期への移行に関与することが示唆された。

CIBZ が Nanog の発現に及ぼす影響

Nanog は、ES 細胞の増殖を制御する中心的な転写因子である。Nanog が、様々な転写因子により、転写を制御されている報告は多いが、転写後の修飾で制御する転写因子の報告はない。転写因子以外においては、Pin1 と miRNA-134 の報告がある。CIBZ の発現変化(欠損、一過性発現低下、恒常的過剰発現、一過性過剰発現)は、Nanog mRNA の発現に変化を及ぼさず、Nanog タンパク質の発現を制御することが確認された(図 31)。

これらの結果より、CIBZ は Nanog を転写後の修飾で制御していることが示唆された。

まとめ

本論文の研究目的を解明するため、CIBZ の発現変化(欠損、発現低下、過剰発現)によって解析を試みた。その結果、CIBZ の発現が、ES細胞の未分化性状態の維持に必須ではなく、細胞増殖と細胞周期(G1 期からS 期への移行)に影響を及ぼすことが判明した。CIBZ の発現変化による ES 細胞の増殖と細胞周期(G1 期から S 期への移行)への表現型は、Nanog の発現変化による表現型とよく類似している。

さらに、CIBZ の発現変化が Nanog タンパク質の発現に影響を与え、Nanog の過剰発現が CIBZ の発現低下による細胞増殖の低下を回復させることから、CIBZ が Nanog のタンパク質を介して、細胞増殖に影響を与えていることが判明した。さらに、CIBZ の発現変化は Nanog mRNA の発現に変化を与えず、Nanog タンパク質の発現に変化を及ぼすことから、CIBZ は、転写後の修飾で Nanog の発現を制御していることも示唆された。ES 細胞において転写後の修飾で Nanog の発現を調節する転写因子の報告は、CIBZ が初めてである。

以上より、詳細に解明が進んでいない ES 細胞の増殖と細胞周期の理解に、CIBZ が Nanog のタンパク質を介して制御しているという新たな知見をもたらすことができた。

今後の研究課題

国内で唯一 CIBZ の研究をしている当研究室において、下記の研究課題について、転写因子 CIBZ の機能を解明することは極めて重要である。

CIBZ が Nanog を制御する分子メカニズム解明

この課題は、本論文の継続研究である。CIBZ が Nanog を制御する分子メカニズムを解明することは、詳細に解明が進んでいない ES 細胞の増殖と細胞周期の理解、及び Nanog の転写後の修飾での発現制御を詳細に明らかにすることであり、大いに意義がある。

本課題の研究は、① マウス ES 細胞内での CIBZ タンパク質と Nanog タンパク質の共局在の観察、② CIBZ が Nanog タンパク質の安定化に関与するかを解明、③ CIBZ が Nanog タンパク質の安定化に関与しない場合、Nanog を制御していると報告のある miRNA との関連を解明 することである。

一方、CIBZ が他の転写因子の制御を介して、結果的に Nanog タンパク質の発現制御をしている可能性も考えられる。このような場合の研究は、① PI3K/AKT シグナル経路の阻害剤を複数使用し、CIBZ が PI3K/AKT 経路のどの位置で機能しているかを解明、② 上記の阻害剤の結果より、PI3K/AKT シグナル経路に関連する細胞増殖や細胞周期の遺伝子群の発現をスクリーニングし、候補遺伝子を同定、③ CIBZ の発現変化(欠損、発現低下、過剰発現)した ES 細胞を用いて、マイクロアレイ解析やプロテオーム解析を行い、網羅的に CIBZ と関連する遺伝子やタンパク質と相互作用する転写因子を解明 することである。

マウス ES 細胞の多分化能に及ぼす CIBZ の解明

ES 細胞は、分化する際に DNA のメチル化が必須であり、メチル化 CpG に結合する転写因子 CIBZ は重要であると考えられる。よって、CIBZ において ES 細胞の自己複製能だけでなく、多分化能に及ぼす機能を解明することは大いに意義がある。

本課題の研究は、野生型及び CIBZ を恒常的に欠損した株と過剰発現した株を用いて、EB(Embryoid body, 胚様体)を形成させ、内胚葉、外胚葉、中胚葉のどの系列に分化が促進あるいは抑制されているかを解明することである。EB とは、付着培養しているマウス ES 細胞を、分化培地中で浮遊培養することで胚のような形態をした細胞塊のことを指す。EB 形成は、マウス ES 細胞における代表的な分化誘導方法である。表現型に違いが観察されない場合、様々な分化誘導法(レチノイン酸添加による分化誘導方法、付着培養による分化誘導方法など)を用いて解明する。

CIBZ ノックアウトマウスの作製及び生体内での生理機能の解明

マウス ES 細胞レベルでの機能解析には限界があるため、CIBZ ノックアウトマウスを作製し、CIBZ の生体内における生理機能を明らかにすることは、極めて重要である。

本課題の研究は、① 作製した相同組換え体 CIBZ^{+/-} ES 細胞(129 系統由来)を使用し、キメラマウス作製後、CIBZ ノックアウトマウスを作製、② ノックアウトマウス作製後は、遺伝的背景を均一にするために B6 系統へのコンジェニック系統を作製し、表現型を詳細に観察し異常があるかを解明、③ ノックアウトマウスが胎生致死の場合、どの発生段階で死亡するかを解明、④ p53 ノックアウトマウスと掛け合わせたダブルノックアウトマウスを作製し、胎生致死がレスキューされるかを解明 することで、CIBZ の生体内での生理機能を明らかにする。

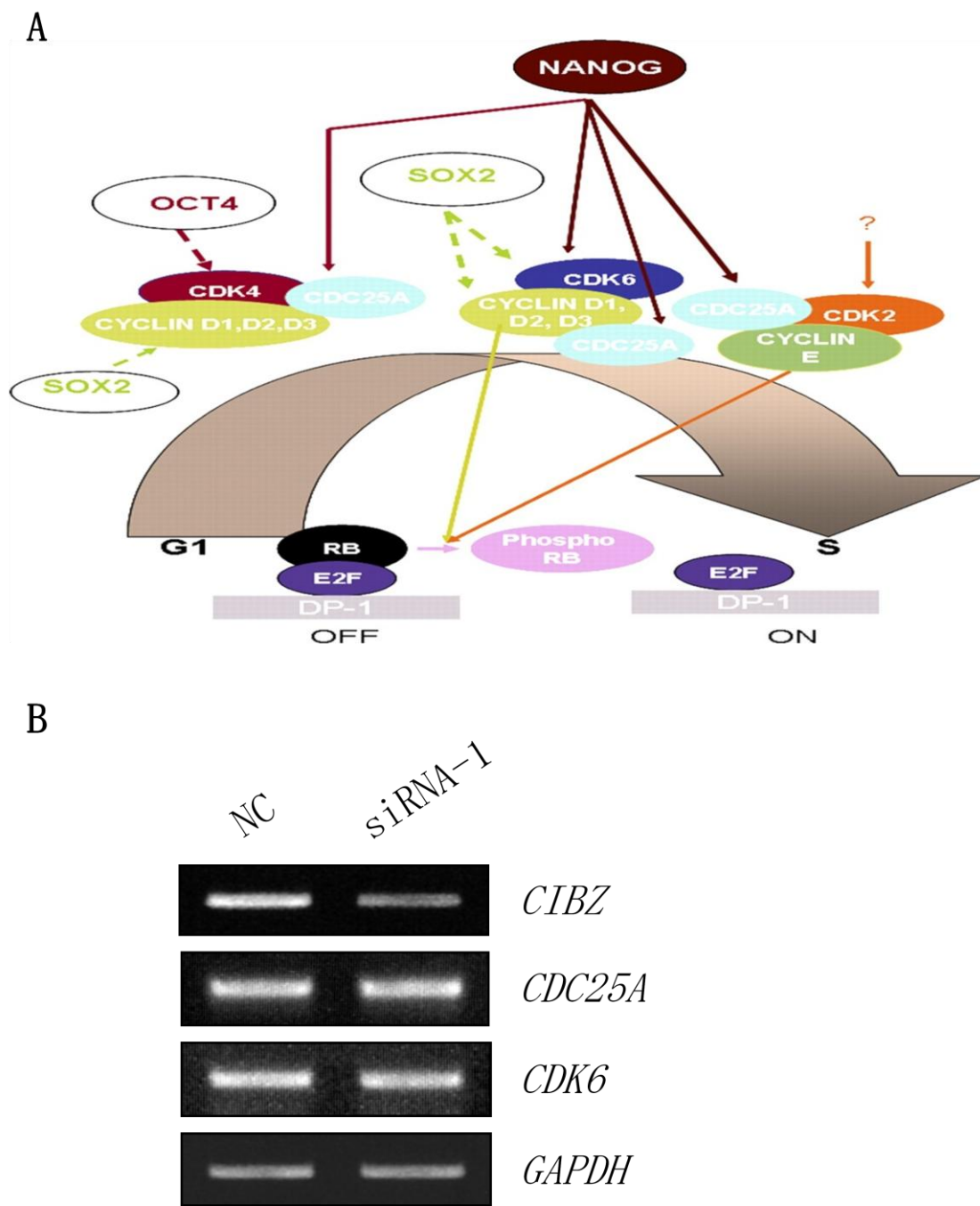
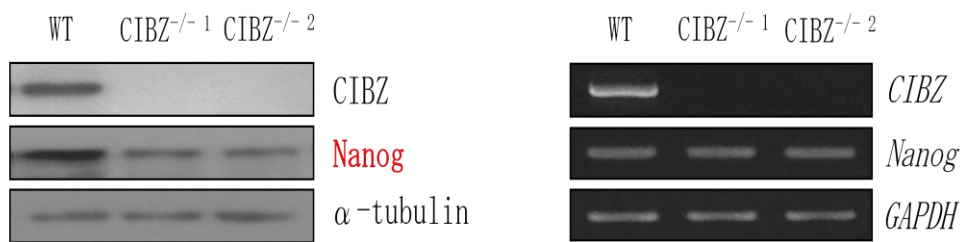


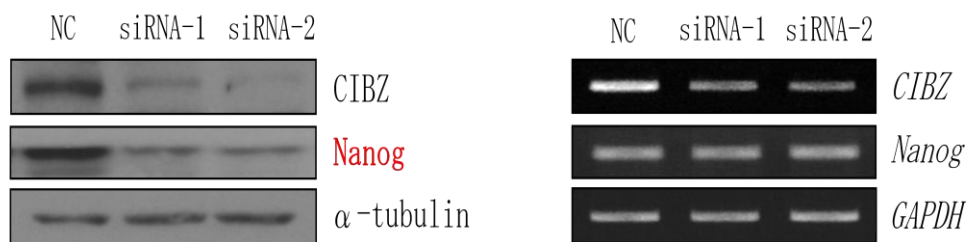
図 30. CIBZ が CDC25A と CDK6 の mRNA に及ぼす影響

- A. ヒト ES 細胞における G1 期から S 期への移行における Nanog、CDC25A、CDK6 の役割の概略図。 *J. Cell. Biol.* 184, 67-82. (2009) を参照。
- B. CIBZ の発現低下した ES 細胞から、mRNA を抽出し、半定量 RT-PCR 法で CDC25A と CDK6 の発現量を解析した。GAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) を内部標準とした。

CIBZ の欠損における Nanog タンパク質の発現



CIBZ の一過性発現低下における Nanog タンパク質の発現



CIBZ の恒常的過剰発現における Nanog タンパク質の発現



CIBZ の一過性過剰発現における Nanog タンパク質の発現



図 31. CIBZ による Nanog タンパク質の発現制御(まとめ)

CIBZ の発現変化(欠損、一過性発現低下、恒常的過剰発現、一過性過剰発現)における Nanog タンパク質(左図)と mRNA(右図)の発現変化をまとめた。
 α -tubulin と GAPDH(Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)をそれぞれの内部標準とした。

謝辞

本研究を行うに当たり、最高の研究環境と多くの貴重な助言を賜りました川市正史教授に厚く御礼申し上げます。また、研究を進めるに際し、直接ご指導いただきました松田永照助教授に心から感謝いたします。貴重な助言をいただきました石田靖雅准教授、岡千緒助教授、動物遺伝子機能研究室の皆様に御礼申し上げます。また、京都大学医学研究科の菅井学講師には、研究に使用した抗体を数多く頂き、誠にありがとうございました。

これまでに当研究室を卒業されていった先輩、同輩、後輩達のおかげで学生生活を豊かにして頂き、この場を借りて御礼を申しあげます。ありがとうございました。

最後に、大学院進学に理解を示し、これまで経済的に支えてくれた両親に感謝を捧げます。

参考文献

- Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G., and Leprin, D. (1995) The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.* 6, 1193-1198.
- 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.
- Bestor, T.H. (2000) The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2395-2402.
- 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., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., and Smith, A. (2007) Nanog safeguards pluripotency and mediates. *Nature* 450, 1230-1234.
- Chen, T., Du, J., and Lu, G. (2011) Cell growth arrest and apoptosis induced by Oct4 or Nanog knockdown in mouse embryonic stem cells: a possible role of Trp53. *Mol. Biol. Rep.* DOI: 10.1007/s11033-011-0928-6.
- Chuang, L.S., Ian, H., Koh, T., Ng, H., Xu, G., and Li, B. (1997) Human DNA-(Cytosine-5) Methyltransferase-PCNA Complex as a Target for p21^{WAF1}. *Science* 277, 1996-2000.
- 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.
- Evans, M.J., and Kaufman, M.H. (1981) Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292, 154-156.
- Filion, G.J., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., and Defossez, P.A. (2006) A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* 26, 169-181.

Gudbjartsson, D.F., Walters, G.B., Thorleifsson, G., Stefansson, H., Halldorsson, B.V., Zusmanovich, P., Sulem, P., Thorlacius, S., Gylfason, A., Steinberg, S., Helgadóttir, A., Ingason, A., Steinthorsdóttir, V., Olafsdóttir, E.J., Olafsdóttir, G.H., Jonsson, T., Borch-Johnsen, K., Hansen, T., Andersen, G., Jorgensen, T., Pedersen, O., Aben, K.K., Witjes, J.A., Swinkels, D.W., Heijer, M., Franke, B., Verbeek, A.L., Becker, D.M., Yanek, L.R., Becker, L.C., Tryggvadóttir, L., Rafnar, T., Gulcher, J., Kiemeneý, L.A., Kong, A., Thorsteinsdóttir, U., Stefansson, K. (2008) Many sequence variants affecting diversity of adult human height. *Nat Genet.* 40, 609-615.

Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E., and Jaenisch, R. (2001) Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genet.* 27, 31-39.

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.

Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S. H. (2008) An Extended Transcriptional Network for Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *Cell* 132, 1049-1061.

Koledova, Z., Kafkova, L. R., Calabkova, L., Krystof, V., Dolezel, P., and Divoky, V. (2010) Cdk2 Inhibition Prolongs G1 Phase Progression in Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cells Dev* 19, 181-194.

Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915-926.

Liu, N., Feng, X., Fang, Z., Ma, F., Lu, S., Lu, M., and Han, Z. (2008) Identification of Genes Regulated by Nanog Which Is Involved in ES Cells Pluripotency and Early Differentiation. *J. Cell. Biochem.* 104, 2348-2362.

Martin, G. R. (1981) Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 78, 7634-7638.

Matsuda, E., Shigeoka, T., Iida, R., Yamanaka, S., Kawaichi, 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. U. S. A.* 101, 4170-4174.

Moretto-Zita, M., Jin, H., Shen, Z., Zhao, T., Briggs, S. P., and Xu, Y. (2010) Phosphorylation stabilizes Nanog by promoting its interaction with Pin1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 13312-13317.

Mortensen, R. M., Conner, D. A., Chao, S., Geisterfer-Lowrance, A. A. T., and Seidman, J. G. (1992) Production of homozygous mutant ES cells with a single targeting construct. *Mol. Cell. Biol.* 12, 2391-2395.

Neganova, I., and Lako, M. (2008) G1 to S phase cell cycle transition in somatic and embryonic stem cells. *J. Anat.* 213, 30-44.

Neganova, I., Zhang, X., Atkinson, S., and Lako, M. (2009) Expression and functional analysis of G1 to S regulatory components reveals an important role for CDK2 in cell cycle regulation in human embryonic stem cells. *Oncogene* 28, 20-30.

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-regulation 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.

Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* 99, 247-257.

Paling, N. R. D., Wheadon, H., Bone, H. K., and Welham, M. J. (2004) Regulation of Embryonic Stem Cell Self-renewal by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling. *J. Biol. Chem.* 279, 48063-48070.

Ramakrishna, S., Suresh, B., Lim, K., Cha, B., Lee, S., Kim, K., and Baek, K. (2011) PEST Motif Sequence Regulating Human NANOG for Proteasomal Degradation. *Stem Cells Dev.* 20, 1511-1519.

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.

Storm, M. P., Bone, H. K., Beck, C. G., Bourillot, P.Y., Schreiber, V., Damiano, T., Nelson, A., Savatier, P., and Welham, M. J. (2007) Regulation of Nanog Expression by Phosphoinositide 3-Kinase-dependent Signaling in Murine Embryonic Stem Cells. *J. Biol. Chem.* 282, 6265-6273.

Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006) Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.

Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell* 131, 861-872.

Tanaka, Y., Era, T., Nishikawa, S., and Kawamata, S. Forced expression of Nanog in hematopoietic stem cells results in a gammadelta T-cell disorder. (2007) *Blood* 110, 107-115.

Tay, Y.M., Tam, W.L., Ang, Y.S., Gaughwin, P.M., Yang, H., Wang, W., Liu, R., George, J., Ng, H.H., Perera, R.J., Lufkin, T., Rigoutsos, I., Thomson, A.M., and Lim, B. (2008) MicroRNA-134 Modulates the Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells, Where It Causes Post-Transcriptional Attenuation of Nanog and LRH1. *Stem Cells* 26, 17-29.

Tsumura, A., Hayakawa, T., Kumaki, Y., Takebayashi, S., Sakaue, M., Matsuoka, C., Shimotohno, K., Ishikawa, F., Li, E., Ueda, H.R., Nakayama, J., and Okano, M. (2006) Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. *Genes Cells*. 11, 805-814.

White, J., and Dalton, S. (2005) Cell Cycle Control of Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reviews* 1, 131-138.

Zhang, J., Wang, X., Chen, B., Suo, G., Zhao, Y., Duan, Z., and Dai, J. (2005) Expression of Nanog gene promotes NIH3T3 cell proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1098-1102.

Zhang, X., Neganova, I., Przyborski, S., Yang, C., Cooke, M., Atkinson, S.P., Anyfantis, G., Fenyk, S., Keith, W.N., Hoare, S.F., Hughes, O., Strachan, T., Stojkovic, M., Hinds, P.W., Armstrong, L., and Lako, M. (2009) A role for NANOG in G1 to S transition in human embryonic stem cells through direct binding of CDK6 and CDC25A. *J. Cell. Biol.* 184, 67-82.