

スクリーニングには適していると考えられる。ただし、この種のスクリーニング法は、増幅と選別の繰り返しによる濃縮操作を含まないため、特異結合と非特異結合を如何に効果的に分離し活性種のみを選別できるかが重要となる。現時点でその選別技術は十分とはいえないので、新しい装置や方法論などの開発が求められるだろう。

実用化に向けて解決すべき課題がいくつか挙げられるが、核酸アプタマーには、抗体にはない核酸ならではの長所がいくつもあり、さらに化学修飾による生体内安定性の向上や機能拡張と相まって、医薬・検査薬などへ展開が期待される。

謝辞

本研究は独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 平成 20 年度産業技術研究助成事業より研究費の支援を受けています。また、本研究の端緒となった研究課題について独立行政法人科学技術振興機構 (JST) 戦略的創造研究推進事業個人型研究 (PRESTO) 「構造機能と計測分析」より研究費の支援を受けました。一連の研究を進めるにあたり、有益なる御鞭撻ならびに御助力を賜りました群馬大学名誉教授 澤井 宏明 先生および同大学教授 尾崎 広明 先生、大阪大学名誉教授 今西 武 先生、同大学教授 小比賀 聡 先生に心より厚く御礼申し上げます。

- 1) Ellington, A.D. & Szostak, J.W. (1990) *Nature*, 346, 818–822.
- 2) Tuerk, C. & Gold, L. (1990) *Science*, 249, 505–510.
- 3) Nitsche, A., Kurth, A., Dunkhorst, A., Pänke, O., Sielaff, H., Junge, W., Muth, D., Scheller, F., Stöcklein, W., Dahmen, C., Pauli, G., & Kage, A. (2007) *BMC Biotechnol.*, 7, 48, 1–12.
- 4) 栗原正靖, 澤井宏明 (2003) 未来材料, 3, 51–57.
- 5) Andreola, M.L., Calmels, C., Michel, J., Toulmé J.J., & Litvak, S. (2000) *Eur. J. Biochem.*, 267, 5032–5040.
- 6) Tsai, C.H., Chen J., & Szostak, J.W. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 14598–14603.
- 7) Kuwahara, M., Takeshima, H., Nagashima, J., Minezaki, S., Ozaki, H., & Sawai, H. (2009) *Bioorg. Med. Chem.*, 17, 3782–3788.
- 8) Thum, O., Jäger, S., & Famulok, M. (2001) *Angew. Chem. Int. Ed.*, 40, 3990–3993.
- 9) Sawai, H., Ozaki, A.N., Satoh, F., Ohbayashi, T., Masud, M. M., & Ozaki, H. (2001) *Chem. Commun.*, 24, 2604–2605.
- 10) Kuwahara, M., Takahata, Y., Shoji, A., Ozaki, A., Ozaki, H., & Sawai, H. (2003) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 13, 3735–3738.
- 11) Kuwahara, M., Nagashima, J., Hasegawa, M., Tamura, T., Kitagata, R., Hanawa, K., Hososhima, S., Kasamatsu, T., Ozaki, H., & Sawai, H. (2006) *Nucleic Acids Res.*, 34, 5383–5394.
- 12) Kuwahara, M., Obika, S., Nagashima, J., Ohta, Y., Suto, Y.,

- Ozaki, H., Sawai, H., & Imanishi, T. (2008) *Nucleic Acids Res.*, 36, 4257–4265.
- 13) Singh, S.K., Koshkin, A.A., Wengel, J., & Nielsen, P. (1998) *Chem. Commun.*, 4, 455–456.
 - 14) Obika, S., Nanbu, D., Hari, Y., Morio, K., In, Y., Ishida, T., & Imanishi, T. (1997) *Tetrahedron Lett.*, 38, 8735–8738.
 - 15) Kuwahara, M., Obika, S., Takeshima, H., Hagiwara, Y., Nagashima, J., Ozaki, H., Sawai, H., & Imanishi, T. (2009) *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 19, 2941–2943.
 - 16) Berezovski, M., Musheev, M., Drabovich, A., & Krylov, S.N. (2006) *J. Am. Chem. Soc.*, 128, 1410–1411.
 - 17) Masud, M.M., Kuwahara, M., Ozaki, H., & Sawai, H. (2004) *Bioorg. Med. Chem.*, 12, 1111–1120.
 - 18) Shoji, A., Kuwahara, M., Ozaki, H., & Sawai, H. (2007) *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 1456–1464.
 - 19) Ohsawa, K., Kasamatsu, T., Nagashima, J., Hanawa, K., Kuwahara, M., Ozaki, H., & Sawai, H. (2008) *Anal. Sci.*, 24, 167–172.
 - 20) 栗原正靖, 杉本直己 (2009) 化学, 64, 44–49.

栗原 正靖

(群馬大学大学院工学研究科)

Polymerase reactions using artificial nucleic acids and creation of artificial nucleic acid aptamers

Masayasu Kuwahara (Department of Chemistry and Chemical Biology, Graduate School of Engineering Gunma University, 1-5-1 Tenjin-cho, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan)

マウス ES 細胞の未分化性維持における *Klf* 転写因子群の役割

はじめに

マウス内部細胞塊から樹立された胚性幹 (ES, embryonic stem) 細胞は、多能性を維持しつつ、ほぼ無限に増殖する幹細胞である¹⁾。ヒト ES 細胞もサイトカイン依存性や増殖速度などの特性上の差がマウス ES 細胞との間に存在するものの、多能性を有していることから、様々な再生医療への応用が期待されている。一方、人工多能性幹 (iPS, induced pluripotent stem) 細胞は、絨毛芽細胞などの体細胞から特定の遺伝子セットの強制発現により樹立された多能性幹細胞である²⁾。iPS 細胞は多能性、増殖性、遺伝子発現状態、エピジェネティック状態まで ES 細胞に酷似しているため、倫理的障壁が高いヒト ES 細胞を置換し得る多能性幹細胞と期待されている。マウス ES 細胞の未分化性維持の分子機構については優れた総説があるため¹⁾、本稿においては、筆者らが研究を行ってきた *Klf* 遺伝子を中心

Klf5 の生理的な役割を明らかにする目的で、*Klf5* ノックアウトマウスを作製したところ発生の初期に致死となることが判明した。この表現型は、2002年に永井良三博士らによって報告された *Klf5* ノックアウトマウスの表現型、胎生 8.5 日以前に致死となるという報告に一致している⁸⁾。初期過程における詳細な遺伝子型解析から、*Klf5* ノックアウトマウス胚は、胚盤胞の段階では存在するが 6 日胚の段階では存在しないこと、空の脱落膜が存在しないことから、着床していないことが示唆された⁹⁾。そこで胚盤胞における *Klf5* の発現を検討したところ、着床反応に重要な栄養膜細胞に高発現していることが分かった。着床反応に関わるホメオボックス遺伝子である *Cdx2* の発現が減弱していることから、*Cdx2* が下流遺伝子の一つと推定されるが、*Cdx2* との表現型上の差が存在することから、*Cdx2* 以外の下流遺伝子の存在も考えられる。一方、*Klf5* は胚盤胞の内部細胞塊に高発現するが、内部細胞塊を免疫除去法で単離し、ES 細胞の樹立を行ったところ、*Klf5* ノックアウト胚からは ES 細胞を樹立できないことが判明した (図 1)。このようなことから、*Klf5* は ES 細胞の樹立過程 (= 内部細胞塊細胞の ES 化) に必須であることが示唆される。

Klf5 ノックアウトマウスの内部細胞塊から ES 細胞は樹立できない一方、野生型の ES 細胞において二つの *Klf5* アリルをノックアウトすることにより ES 細胞を樹立することは可能であった。*Klf5* ノックアウト ES 細胞は、*Oct3/4* 遺伝子座に薬剤耐性遺伝子をノックインした細胞で薬剤存在下で維持されることから *Oct3/4* 陽性集団の維持には必須ではない。しかしながらこの細胞は増殖速度に顕著な低下が見られるとともに、細胞周期解析から G_1 期停止状態の細胞が多く認められた (図 1)。一方、*Klf5* 過剰発現 ES 細胞では顕著な増殖促進効果が認められるとともに、 G_1 期停止状態の細胞数の低下が認められた (図 1)。以上のことから、*Klf5* は G_1 期制御を通して、ES 細胞の増殖制御に関わっていることが示唆された。また、*Klf5* は ES 細胞の未分化性維持にも関わっており、*Klf5* ノックアウト ES 細胞は、*Oct3/4* 陽性集団においても分化マーカーの発現が亢進する一方、*Klf5* 過剰発現細胞では、分化マーカーの抑制と共に、LIF 非存在下でも未分化性維持が認められた (図 1)。興味深いことに、*Klf4* との機能比較の結果、*Klf4*、*Klf5* とともに分化に対しては抑制的に作用するものの、増殖に対しては *Klf4* は抑制的に作用することが明らかになった。この点は、腫瘍細胞において *Klf4*、*Klf5* が正反対の増殖効果をもたらすという知見

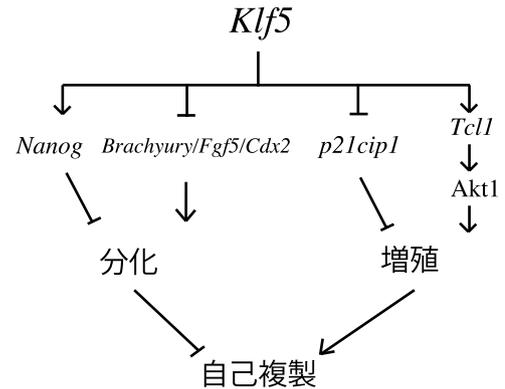


図 2 *Klf5* による自己複製過程の制御機構

と一致している。

3. *Klf* の下流遺伝子群

先述したように、*Klf5*、*Klf2*、*Klf4* は ES 細胞の自己複製過程に重要である。Jiang らは、これら 3 因子について chip-on-chip 解析、多重ノックダウン体のマイクロアレイ解析を行い、直接的な標的遺伝子を同定した (図 2)。興味深いことに、これら三つに対する直接的標的遺伝子の中には、*Nanog*、*Tcl1*、*Fgf5* などの共通の標的遺伝子が存在することを同定した。一方、我々はマイクロアレイ解析からマウス ES 細胞における *Klf5* の下流遺伝子として、*Tcl1* (*T-cell leukemia 1*) を同定し、*Tcl1* が *Akt1* のリン酸化を制御することにより、増殖に関わっていることを示した (図 2)。ごく最近丹羽らは、*Klf4* が *LIF-STAT* の下流に位置し、*Sox2* の発現を調節することにより *Oct3/4* の発現を維持することを示した⁶⁾。

Klf5 は胚盤胞の段階で内部細胞塊、栄養膜細胞に発現しているが、5 日胚になると胚体外胚葉では発現するが、原始外胚葉では殆ど発現していない。このような時空間的な *Klf5* の発現を支える分子基盤はまだ分かっていない。

4. *Klf* による体細胞の初期化

2006年に京都大学の山中らによってマウス繊維芽細胞から、*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc* の 4 因子の強制発現による、人工多能性幹細胞の作製が報告された。2007年にはヒト繊維芽細胞の初期化が報告された¹⁰⁾。この 4 因子による初期化の分子機構は殆ど分かっていないが、アルカリホスファターゼ活性、*Oct3/4* 遺伝子発現などのパラメーターが時間に伴って出現することから、段階的に初期化が起こることが示唆されている¹¹⁾。この過程において *Klf4* がどのような遺伝子発現を制御するのか殆ど分かっ

ていない。 *Klf1*, *Klf2*, *Klf5* によっても初期化が可能であることが報告されており, ES 細胞の未分化性維持同様, *Klf* 遺伝子間での類似機能が示唆される一方, 初期化効率に差が認められることから, 機能上の差も存在すると推察される¹²⁾。

EpiS 細胞は, マウスの原始外胚葉から単離された多能性幹細胞であるが, 内部細胞塊由来の ES 細胞とは異なり, LIF 非依存性・bFGF 依存性である¹³⁾。加えて, 形態が単層であり, 単一細胞になると細胞死が起こるなど, ヒト ES 細胞に類似した性状を示す¹³⁾。興味深いことに, マウス EpiS 細胞に *Klf4* を強制発現させると, ES 細胞と酷似した状態になることが報告された¹⁴⁾。逆に, *Klf4* は必ずしも ES から EpiS 細胞への分化を抑制しないことが分かった¹⁴⁾。また, 今までマウス系統間で ES 細胞の樹立効率が大きく異なることが知られており, NOD (non-obese diabetes) マウスからは ES 細胞樹立が報告されていなかった。Hanna らは, NOD マウスから LIF 存在下 ES 細胞を樹立する過程で, EpiS 様の細胞が出現することを見出すと共に, ES 細胞樹立過程に *Klf4* 強制発現レンチウイルスを用いて過剰発現させると, ES 細胞が樹立できることを見出した¹⁴⁾。さらに, *Klf4* 強制発現の代わりに, *Klf4* 活性を模倣する化合物である kenpaullon 添加によっても樹立が可能であることを示した。このように *Klf4* は体細胞または EpiS 細胞から ES 細胞への脱分化を促進することによって, ES 細胞の樹立に至ることが示唆されている。

おわりに

Klf4 だけでなく *Klf5* やその他のいくつかの *Klf* ファミリー遺伝子群も, iPS 細胞化能を有していることが分かっているが, なぜ *Klf* 遺伝子が万能細胞化に重要であるのかはよく分かっていない。今回我々の研究で, *Klf5* が内部細胞塊からの ES 細胞樹立過程に必須であること, *Klf5* が ES 細胞の分化を抑制すると同時に増殖を促進することで, ES 細胞の自己複製を制御していることが明らかとなった。今後, 内部細胞塊からの ES 細胞化過程での *Klf5* の機能をより詳細に理解できれば, 類似の過程と考えられる体細胞からの iPS 細胞化の分子レベルでの理解に繋がることが期待される。また, *Klf5* ノックアウト ES 細胞は, ヒト ES 細胞や EpiS 細胞に部分的に類似した生物特性および遺伝子発現を示していることから, マウス ES 細胞と EpiS 細胞, ヒト ES 細胞との関係に興味を持たれる。さらに, *Klf5* がマウス ES 細胞の自己複製を強く促進するため, 増殖が緩やかあるいは未分化性を維持することが困難である

幹細胞に対する応用が今後期待される。

謝辞

Klf5 ノックアウトマウスの解析では, 筑波大学 TARA センター 藤井義明教授, 筑波大学人間総合科学研究科基礎医学系 高橋智教授, 東北大学大学院医学系研究科 山本雅之教授に深謝致します。また ES 細胞の解析は, 理化学研究所発生・再生科学総合研究センターの丹羽仁史先生との共同研究の下に行われました。

引用文献の数が限られているため, 多くの論文が引用できなかったことをこの場を借りてお詫び致します。

- 1) Niwa, H. (2007) *Development*, 134, 635–646.
- 2) Takahashi, K. & Yamanaka, S. (2006) *Cell*, 126, 663–676.
- 3) McConnell, B.B., Ghaleb, A.M., Nandan, M.O., & Yang, V.W. (2007) *Bioessays*, 29, 549–557.
- 4) Sogawa, K., Imataka, H., Yamasaki, Y., Kusume, H., Abe, H., & Fujii-Kuriyama, Y. (1993) *Nucleic Acids Res.*, 21, 1527–1532.
- 5) Imataka, H., Sogawa, K., Yasumoto, K., Kikuchi, Y., Sasano, K., Kobayashi, A., Hayami, M., & Fujii-Kuriyama, Y. (1992) *EMBO J.*, 11, 3663–3671.
- 6) Li, Y., McClintick, J., Edenberg, H.J., Yoder, M.C., & Chan, R.J. (2005) *Blood*, 105, 635–637.
- 7) Jiang, J., Chan, Y.S., Loh, Y.H., Cai, J., Tong, G.Q., Lim, C. A., Robson, P., Zhong, S., & Ng, H.H. (2008) *Nat. Cell Biol.*, 10, 353–360.
- 8) Shindo, T., Manabe, I., Fukushima, Y., Tobe, K., Aizawa, K., Miyamoto, S., Kawai-Kowase, K., Moriyama, N., Imai, Y., Kawakami, H., Nishimatsu, H., Ishikawa, T., Suzuki, T., Morita, H., Maemura, K., Sata, M., Hirata, Y., Komukai, M., Kagechika, H., Kadowaki, T., Kurabayashi, M., & Nagai, R. (2002) *Nat. Med.*, 8, 856–863.
- 9) Ema, M., Mori, D., Niwa, H., Hasegawa, Y., Yamanaka, Y., Hitoshi, S., Mimura, J., Kawabe, Y., Hosoya, T., Morita, M., Shimosato, D., Uchida, K., Suzuki, N., Yanagisawa, J., Sogawa, K., Rossant, J., Yamamoto, M., Takahashi, S., & Fujii-Kuriyama, Y. (2008) *Cell Stem Cell*, 3, 555–567.
- 10) Niwa, H., Ogawa, K., Shimosato, D., & Adachi, K. (2009) *Nature*, 460, 118–122.
- 11) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., & Yamanaka, S. (2007) *Cell*, 131, 861–872.
- 12) Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., & Yamanaka, S. (2008) *Nat. Biotechnol.*, 26, 101–106.
- 13) Brons, I.G., Smithers, L.E., Trotter, M.W., Rugg-Gunn, P., Sun, B., Chuva de Sousa Lopes, S.M., Howlett, S.K., Clarkson, A., Ahrlund-Richter, L., Pedersen, R.A., & Vallier, L. (2007) *Nature*, 448, 191–195.
- 14) Guo, G., Yang, J., Nichols, J., Hall, J.S., Eyres, I., Mansfield, W., & Smith, A. (2009) *Development*, 136, 1063–1069.
- 15) Hanna, J., Markoulaki, S., Mitalipova, M., Cheng, A.W., Casady, J.P., Staerk, J., Carey, B.W., Lengner, C.J., Foreman, R.,

Love, J., Gao, Q., Kim, J., & Jaenisch, R. (2009) *Cell Stem Cell*, 4, 513-524.

依馬 正次

(筑波大学人間総合科学研究科基礎医学系
解剖学・発生学講座)

Role of Klf gene family in the self-renewal of mouse ES cells

Masatsugu Ema (Department of Anatomy and Embryology, Institute of Basic Medical Sciences, University of Tsukuba, Tennodai, Tsukuba, Ibaraki 305-8575, Japan)

ラミニン 5 α 3 鎖由来ペプチドの細胞遊走および創傷治癒への関与：シンデカン 4 とインテグリン β 1 凝集形成

初めに

創傷治癒過程は一般に炎症期、増殖期、リモデリング期と進み、各時期において種々のサイトカイン、細胞の関与が知られている。皮膚創傷治癒において、とくに再上皮化へ向かう機構はいまだ完全に理解されているとはいえない。皮膚への機械的組織障害は基底膜を含んだ組織構成成分（細胞外マトリックス：ECM）の破壊を引き起こし、細胞と ECM との安定した関係は破綻し、創傷部位に特有な新たな細胞-ECM 関係が構築されることになる。皮膚創傷辺縁では、定常状態の角化細胞から発生した leading keratinocyte (KC) が出現し、ラミニン 5 を生産・沈着させ細胞遊走・再上皮化に関与している。細胞接着受容体であるインテグリン β 1 は、1980 年代半ばに同定され、ECM と細胞の相互作用の主役である。遅れてシンデカンがフィブロネクチン、ラミニンなどの受容体として本格的に解析され始めたのは、1990 年代後半である。近年では、この二つの受容体はある ECM 分子の異なった部位を独立に認識する機能以外に、「機能的」にクロストークしているという報告が出始めている。

1. ラ ミ ニ ン

ラミニンはコラーゲン 4 とならんで基底膜の代表的構成 ECM であり、 α 、 β 、 γ の三本鎖からなる糖タンパク質で 10 種類以上のアイソフォームが存在する。いずれも多数の α -ヘリックスを有する α 、 β 、 γ 鎖を持ち、600 アミノ

酸におよぶ triple-stranded coiled-coil 構造で会合部分を形成し、十字架の形状を有する巨大分子である¹⁾。ラミニン 5 は皮膚基底膜に特有で、 α 3、 β 3、 γ 2 鎖の三本鎖からなり、ラミニン 332 とともに表記される。ヒト疾患の先天性表皮水疱症の原因遺伝子であり、皮膚の物理的安定性にも関与している。ラミニン 5 α 3 鎖では、C 末端に約 200 アミノ酸からなる五つの繰り返し構造が存在し (LG1~5)、球状ドメインを形成する。その C 末端 LG4-5 番は切り離され、成熟型となる。LG4-5 は定常状態の皮膚基底膜では切断されてもはや存在しない。一方 LG4-5 を保持する前駆体は創傷部位の基底膜にのみ存在する²⁾。また近年 α 3LG4-5 ドメインは扁平上皮がんの局所浸潤に関与していることも示された³⁾。これらの報告は LG4 ドメインが細胞遊走に関与していることを示唆している。

ラミニン 5 α 3 鎖にはインテグリン α 3 β 1、 α 6 β 4 により認識される部位があるが、我々はインテグリンで認識されない α 3LG4 ドメイン内にシンデカン 2、4 が認識するアミノ酸配列を同定した⁴⁾。レコンビナントタンパク質 α 3LG4 ドメイン、またそのシンデカン結合配列を含んだ合成ペプチド PEP75 を用いて、ラミニン 5 とシンデカンの結合が細胞接着促進、神経突起の伸長促進、MMP1 の分泌増加⁵⁾、MMP9 分泌を誘導することを示した。

2. シンデカン

シンデカンには 1~4 のアイソフォームがあり、それぞれが組織特異性を持って分布している。シンデカンは細胞外ドメインに数本のヘパラン硫酸をグリコサミノグリカン (GAG) として有する細胞表面プロテオグリカン (PG) であり (図 1)、ECM への細胞接着受容体、成長因子との結合などの機能を有する。皮膚創傷辺縁ではシンデカン 1,4 が過剰発現し、シンデカン 1,4 のノックアウトマウスは創傷治癒遅延を起こすことから、シンデカンは創傷治癒に関与していると考えられる。

3. インテグリンの特性

インテグリン β 1 は種々の α 鎖とヘテロダイマーを形成し、ECM 接着受容体として機能することから、細胞遊走・創傷治癒に必須であることが知られている。インテグリン活性は細胞外ドメインへのマンガンイオン、活性化抗体、基質の直接結合等により変化し、この制御機構は outside-in pathway とよばれる。一方、リンパ球の活性化の際などにインテグリンの接着性に变化が出る現象の制御機構は inside-out pathway で説明される⁶⁾。この活性化はアロ