

鈴木 理, 今村 亨

(独立行政法人産業技術総合研究所 (AIST)

脳神経情報研究部門シグナル分子研究グループ)

Signaling of metabolic regulatory FGFs: Specificity determination by co-receptors

Masashi Suzuki and Toru Imamura (Signaling Molecules Research Group, Neuroscience Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan)

多能性幹細胞を維持する転写ネットワーク

はじめに

マウス胚性幹 (embryonic stem, ES) 細胞の由来は初期胚の胚盤胞 (3.5 日胚) で, その内部細胞塊 (inner cell mass, ICM) を取り出し培養した細胞である。ES 細胞や人工多能性幹 (iPS) 細胞などを総称して多能性幹細胞とよび, これらは身体を構成するあらゆる細胞 (生殖細胞を含む) に分化する能力を維持しつつ無限に増殖する¹⁾。多能性維持機構に関しては成長因子や細胞周期, タンパク質分解系など様々な角度から研究が進められているが, ここでは中心的とされる転写因子の働きに絞って概説する。

多能性幹細胞における中心的転写因子

1. Oct3/4

POU (Pit-Oct-Unc) ファミリーに属する *Oct3/4* は, 生殖細胞や ICM など多能性を保持した細胞系譜で特異的に発現する。*Oct3/4* を初期胚でノックアウトすると, 多能性をもった ICM が形成できない²⁾。この分化を引き起こす原因の一つとして, 転写因子 *Cdx2* (caudal type homeo box 2) が知られる。*Cdx2* は初期胚において栄養外胚葉 (胎盤を形成する) に発現しており, ICM や ES 細胞では *Oct3/4* によってその発現が抑制されている。*Oct3/4* は *Cdx2* を物理的相互作用を介して機能抑制できることがわかっており, 逆に *Cdx2* は *Oct3/4* の機能抑制を通じて ES 細胞を栄養外胚葉へと分化誘導できる。ところが, *Cdx2* 遺伝子非存在下 (*Cdx2* ノックアウト ES 細胞) においても *Oct3/4* をノックアウトすると分化するため³⁾, *Oct3/4* は *Cdx2* の

機能抑制以外にも重要な役割をもつとみられる。その一つが, 以下に述べる Oct-Sox エンハンサーを介した下流遺伝子制御である。

2. Sox2

Oct3/4 が制御する遺伝子には, octamer 配列と Sox 因子結合配列が隣接するエンハンサー構造がしばしばみられる (以下, Oct-Sox エンハンサー)。Oct-Sox エンハンサー依存性遺伝子には, *Fgf4*, *Utf1*, *Nanog* など, 多能性幹細胞特異的に発現する遺伝子の大多数が含まれる¹⁾。Oct-Sox エンハンサーにインビトロで結合する Sox 因子として最初に同定されたのが Sox2 (SRY-box containing gene 2) である⁴⁾。Sox2 は DNA 結合部位である HMG (high mobility group) ドメインとその C 末端側の転写活性化ドメインから構成される。HMG ドメインの中には二つの核移行シグナル配列が存在し, 主に核内に局在する⁵⁾。転写活性化ドメインは三つのサブドメインから構成され, HMG ドメインと *Oct3/4* の POU ドメインとの相互作用を介して Oct-Sox エンハンサーの活性化を行うとされる⁶⁾。生体内では *Sox2* は ICM, 生殖細胞や神経幹細胞などに発現している。*Sox2* のノックアウト初期胚ではその ICM から ES 細胞は単離できないことが報告されており, *Sox2* は多能性維持に必須である⁷⁾。

i) 多能性維持における Sox2 の役割

一般に, 遺伝子 X をノックアウトすると A という細胞が失われたとき, X は細胞 A の維持に重要な働きをする と解釈する。次に「X はどうして重要なのか」を考える, すなわち X の機能を推定する際には, 細胞 A において必須の分子経路 B が知られているとして, インビトロの解析で X が経路 B で機能するというデータがある場合, ほとんどのケースでは X の重要な機能は経路 B の制御であると解釈されている。「経路 B で重要な働きをしている」と決定するためには, X をノックアウトした直後に経路 B に効果が現れるかを検証する必要があるだろう。*Sox2* は多能性維持に必須の役割を果たすことはわかってはいたわけだが, その分子メカニズムはどのようなものだろうか。

ノックアウト直後の影響を解析する場合, 薬剤誘導的にノックアウトする ES 細胞を作成する必要がある。そこでテトラサイクリン誘導的 *Sox2* ノックアウト ES 細胞株を作成し, これを用いて Oct-Sox エンハンサー依存性遺伝子 (*Fgf4*, *Utf1*, *Fbxo15*, *Lefty1* および *Nanog*) のレポーターアッセイを行った。*Sox2* ノックアウト 24 時間後以

降において、Sox2 タンパク質はほぼ消失しているにもかかわらず、Oct-Sox エンハンサーの活性は野生型とほぼ変わらないレベルで検出された。活性低下と細胞分化はその後ゆっくりと進行する。したがって、Sox2 は Oct-Sox エンハンサー活性化に必要ではない。Sox2 は ES 細胞において発現している唯一の Sox 因子ではなく、他の Sox ファミリー遺伝子 (Sox4, Sox11, Sox15) も発現している。他の Sox 因子の抗体を用いてクロマチン免疫沈降実験を行うと、Sox2 を始め Sox4, Sox11, Sox15 も Oct-Sox エンハンサー上に結合していた。したがって、これらの因子が (それぞれの寄与度は不明だが) 機能冗長的に、いわば束になってエンハンサーの活性化を担うと考えるのが自然だろう (図 1)⁸⁾。

この実験から、Sox2 はそれが必要とされる経路と考えられていた Oct-Sox エンハンサー活性化 (経路 B) には必要でないにもかかわらず、Sox2 をノックアウトすると ES 細胞は分化することがわかった。すなわち、多能性維持機構において Sox2 は別の経路 C で主要な働きをしているといえる。

Sox2 のノックアウト直後に経路 C が影響を受けるはずと考え、Sox2 ノックアウト直後から一定時間ごとのグローバル遺伝子発現解析を行った結果、複数の核受容体遺伝子の発現変動を見出した。これまでに様々なオーファン核受容体遺伝子が Oct3/4 の発現に直接作用することが知られており、そのうちのひとつ *Nr5a2*

(*Lrh1*) は転写活性化に、一方 *Nr2f2* (*Coup-tfII*) は抑制的に働く。Sox2 ノックアウト開始後 24 時間後には *Nr5a2* の発現は顕著に低下しており、*Nr2f2* は上昇していた。これらの発現変動は Oct3/4 の発現を低下させる方向に働く。Oct3/4 の発現低下は分化を引き起こすため、Sox2 ノックアウト ES 細胞は Oct3/4 の発現低下を介して分化するといえる。もしそうなら、Sox2 ノックアウトによる分化は Oct3/4 の強制発現でレスキューできるかもしれない。

そこで Sox2 ノックアウトと同時に Sox2, *Nanog*, Oct3/4 の強制発現ベクターを導入し、未分化コロニー数計測に基づいたレスキューアッセイを行った。その結果、Oct3/4 ベクターでレスキューできることがわかった (図 2A)。こうして得られた Sox2-null-Oct3/4-rescue 細胞では、内在性 Oct3/4 の発現量は野生型と比べて半分以下に低下しており (つまり Sox2 は Oct3/4 発現量の半分強を担っていた)、外来 Oct3/4 遺伝子分を合わせた総 Oct3/4 タンパク質量は野生型とほぼ同じであった (つまり過剰量の Oct3/4 タンパク質によるアーティファクトで生じた細胞ではない)。この細胞では、*Uf1* などの多能性マーカー遺伝子や *Psx1* などの分化マーカー遺伝子の発現状態は野生型と変わらないレベルだが、Sox2 の直接制御を受ける

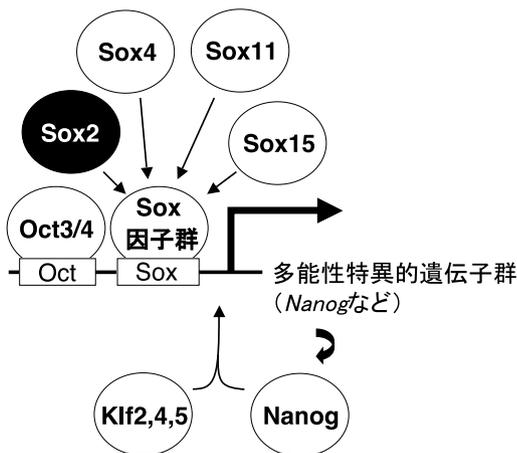


図 1 多能性維持機構モデル

Oct3/4 と Sox 因子群が協働して Oct-Sox エンハンサーを活性化させ、多能性特異的遺伝子群を発現させる。Nanog はこれに含まれ、発現された Nanog は Oct3/4, Sox2 および Klf ファミリーとも協働し、多能性特異的遺伝子群の活性化を行う。

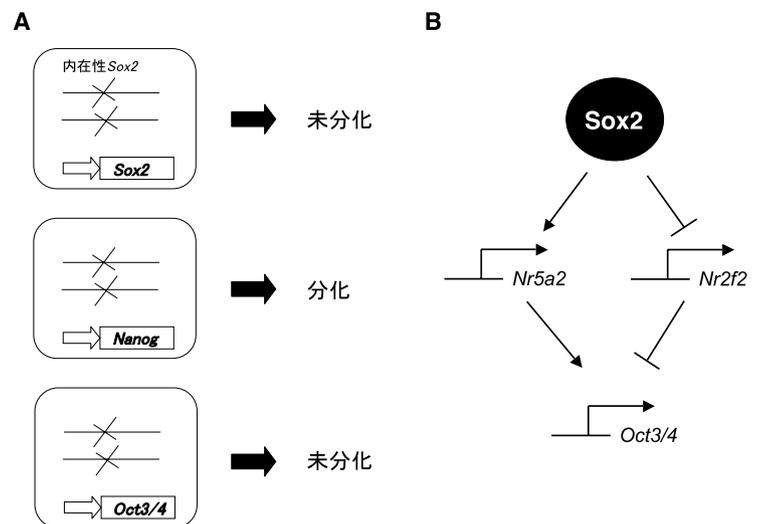


図 2 Sox2 が必要とされる経路の探索

A. 誘導的 Sox2 ノックアウト ES 細胞を用いたレスキュー実験。内在性 Sox2 ノックアウトと同時に強制発現ベクターを導入した。Oct3/4 ベクターは未分化性を維持した。

B. Sox2 が多能性維持に果たす必須の役割は、Nr5a2 の発現を促進すると同時に Nr2f2 を抑制し (他にも制御する遺伝子は存在する)、Oct3/4 の発現を維持することと考えられる。

とみられる遺伝子 (*Nr5a2*, *Nr2f2* など) は変動していた。このレスキュー細胞は三胚葉分化マーカーの発現を伴った胚様体 (ES細胞を凝集させて培養したもの。初期胚を或る程度模倣した環境とされ、三胚葉に分化する) 形成が可能で、キメラマウスでも全身の組織へと寄与していたことから、多能性を保持していると考えられる。結論として、*Sox2* は複数の遺伝子の発現制御を介し、間接的に *Oct3/4* の発現を維持することによって多能性維持に貢献していることがわかる (図 2B)⁸⁾。

ii) 分化制御における *Sox2* の役割

多能性維持を担う因子は同時に分化の抑制/制御も行っていると解釈できる。ICM から最初に分化するのは胚体外内胚葉とよばれる、胚を包む膜を形成する細胞である。上記の解析を行う中で、*Sox2* ノックアウトに伴って少数

だが胚体外内胚葉様細胞が同時に現れることを見出していた⁸⁾。この知見は、内部細胞塊において *Sox2* をノックアウトした場合に栄養外胚葉と胚体外内胚葉の両方の細胞が見られるとする報告とよく符合する⁷⁾。胚様体を形成させ *Sox2* をノックアウトすると、転写因子遺伝子 *Gata4* (GATA binding protein 4) の発現上昇が見られた。*Gata4* の強制発現は ES 細胞を胚体外内胚葉へと分化誘導することで知られる⁹⁾。さらに、胚様体では表面の胚体外内胚葉細胞の働きによって内部に囊状構造が形成されるが (図 3 A), *Sox2* ノックアウトによる *Gata4* 発現上昇と関連して囊状構造形成が昂進することがわかった (図 3B)。逆に、*Sox2* の発現を維持すると囊状構造形成が阻害される。これらの結果は、胚様体の少なくとも一部の細胞集団では *Sox2* は *Gata4* 抑制を介して胚体外内胚葉細胞への分化を抑制することを示唆する。

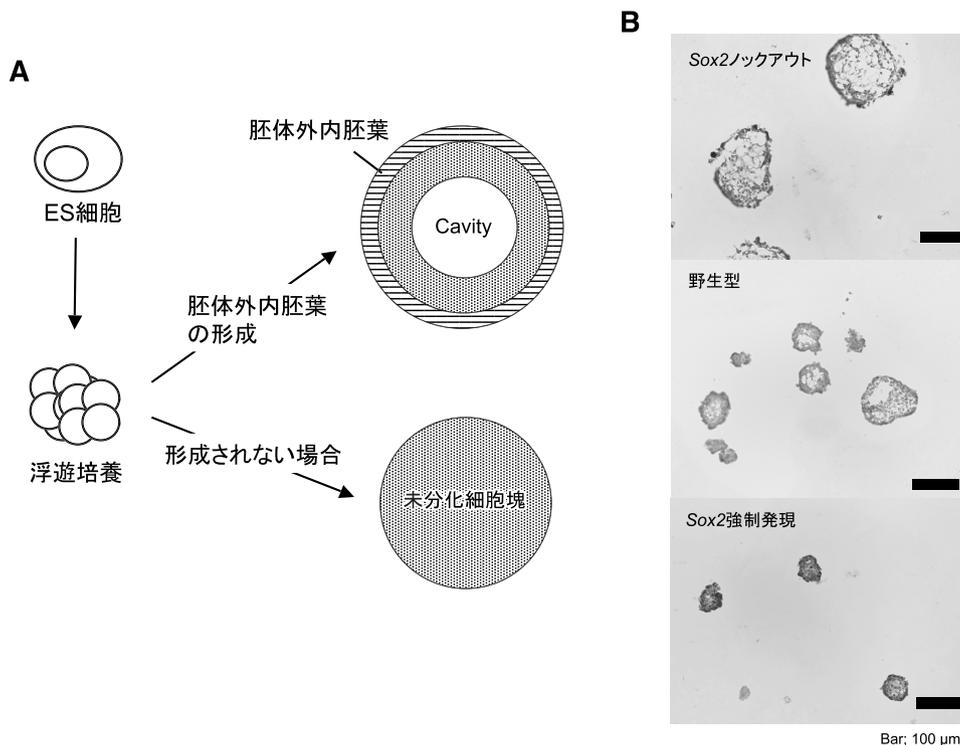


図 3 Sox2 は胚体外内胚葉分化制御を行う

A. 胚様体形成の過程では、表層にできた胚体外内胚葉からのシグナルを受け囊状構造が形成されるが、胚体外内胚葉形成を阻害すると囊状構造ができない (Mountford et al., (1998) *Reprod Fertil Dev.* 10, 527-533.)。

B. 上; *Sox2* をノックアウトしながら胚様体を形成させたもの。囊状構造の形成が促進されている。

中; 親株 (野生型) を用いたもの。

下; *Sox2* の発現を外来遺伝子によって維持しながら胚様体形成を行ったもの。囊状構造の形成が阻害されている。

3. その他の因子

i) Klfファミリー

ES細胞では *Klf* (*Krüppel-like factor*) 2, 4, 5 が強く発現している¹⁰⁾。このうち *Klf4* については, *Oct3/4* および *Sox2* と協調した転写活性化を行うことが知られている¹¹⁾。 *Klf4* ノックアウト ES細胞の報告は未だない。 *Klf5* のノックアウト ES細胞は多能性を維持するが, 分化しやすく増殖も遅くなる。一連の解析から, *Klf5* は *Tcl1-Akt* 経路を介して増殖を正に制御すると同時に, *Nanog* などの制御を介して分化を抑制していることがわかっている¹²⁾。

Klf2 の ES細胞での解析は進んでいないが, *Klf2*, 4, 5 の3者を同時にノックダウンすると ES細胞が分化することなどから, これらは機能冗長的に下流遺伝子を制御し, *Nanog* と協働することも示唆されている (図1)¹⁰⁾。

ii) *Nanog*

Nanog (ケルト語の常若の国 *Tir Na Nog* より) は ES細胞特異的に発現するホメオボックス転写因子遺伝子として¹³⁾, および分化抑制を指標とした発現スクリーニングによって同定された¹⁴⁾。 *Nanog* は *Oct3/4*, *Sox2* とともに共通の下流遺伝子を制御することがわかっている¹⁵⁾。しかし *Nanog* ノックアウト ES細胞は分化しやすくなるものの多能性は維持することが可能であるため, 多能性の転写ネットワークに必要ではない。 *Nanog* 強制発現によって ES細胞の分化を抑制できることなどをあわせ, *Nanog* は多能性を安定化させる因子と見られている (図1)¹⁶⁾。

おわりに

よく聞かれる質問に「ヒト ES細胞も同じ機構で自己複製するのか」というものがある。マウス ES細胞とヒト ES細胞で成長因子要求性が異なる (マウスは LIF (leukemia inhibitory factor), ヒトは bFGF (basic fibroblast growth factor) 依存性) ことから, 両者が全く同じ分子機構で自己複製するというのは考えにくい。しかし中心的転写因子の必要性に関しては現在のところ矛盾するデータは報告されていないので, 転写因子機能を論ずる場合には同じと推定してよいだろう。

「iPS細胞出現によって多能性は完全に理解されたのでは」という問いかけもしばしばいただく。2006年, 京都大学山中教授らは分化した細胞に *Oct3/4*, *Sox2*, *Klf4*, *c-Myc* の4因子を導入し iPS細胞の樹立を報告した。続いて *c-Myc* は導入しなくても iPS細胞の樹立は可能であるこ

とがわかり, 残った3因子の機能的な重要性を裏付ける結果となった。しかしながら, これらのウイルスを導入後, iPS細胞として判別できる (リプログラムされる) まで2~3週間の時間を要することから, これら3因子が多能性を規定する全ての役割を担っているわけではなく, 他の重要因子群の発現誘導 (およびその連鎖) を行うことで多能性を賦与すると考えられている。実際, 多能性維持に必要な他の因子として *Rest* や *Ronin*, ポリコム因子などの報告が最近も相次いでいる¹⁷⁾。見方を変えれば, これらの因子群でも時間をかければ iPS細胞を作れるのかもしれない。さらに, 「多能性の理解」は「分化とその抑制機構の理解」とセットであるべきだが, 多能性幹細胞が初期胚においてどのようなシグナルを受けて正しく分化していくのかはほとんど不明である。

ここで紹介した多能性維持機構については10年ほど前までは大部分がわかっておらず, 多数の研究者の流入により加速度的に研究が進められてきた (それ以前からこの分野に知見を蓄積/提供してきた研究者については, もっとリスペクトされるべきだろう)。網羅的解析による膨大なデータからも重要な知見は得られているが, 総体としてみると個人レベルでの精力的だが地道な研究から明らかになったことのほうが多い。今後もさらに多様な分野からの流入と連携により, 本分野が広がっていくことを期待したい。

- 1) Niwa, H. (2007) *Development (Cambridge, England)*, 134 (4), 635-646.
- 2) Nichols, J., Zevnik, B., Anastasiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius, D., Chambers, I., Scholer, H., & Smith, A. (1998) *Cell*, 95 (3), 379-391.
- 3) Niwa, H., Toyooka, Y., Shimosato, D., Strumpf, D., Takahashi, K., Yagi, R., & Rossant, J. (2005) *Cell*, 123 (5), 917-929.
- 4) Yuan, H., Corbi, N., Basilico, C., & Dailey, L. (1995) *Genes & Development*, 9 (21), 2635-2645.
- 5) Li, J., Pan, G., Cui, K., Liu, Y., Xu, S., & Pei, D. (2007) *The Journal of Biological Chemistry*, 282 (27), 19481-19492.
- 6) Ambrosetti, D.C., Scholer, H.R., Dailey, L., & Basilico, C. (2000) *The Journal of Biological Chemistry*, 275 (30), 23387-23397.
- 7) Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., & Lovell-Badge, R. (2003) *Genes & Development*, 17 (1), 126-140.
- 8) Masui, S., Nakatake, Y., Toyooka, Y., Shimosato, D., Yagi, R., Takahashi, K., Okochi, H., Okuda, A., Matoba, R., Sharov, A. A., Ko, M.S., & Niwa, H. (2007) *Nature Cell Biology*, 9 (6), 625-635.
- 9) Fujikura, J., Yamato, E., Yonemura, S., Hosoda, K., Masui, S., Nakao, K., Miyazaki, J., & Niwa, H. (2002) *Genes & De-*

- velopment, 16(7), 784-789.
- 10) Jiang, J., Chan, Y.S., Loh, Y.H., Cai, J., Tong, G.Q., Lim, C. A., Robson, P., Zhong, S., & Ng, H.H. (2008) *Nature Cell Biology*, 10(3), 353-360.
 - 11) Nakatake, Y., Fukui, N., Iwamatsu, Y., Masui, S., Takahashi, K., Yagi, R., Yagi, K., Miyazaki, J., Matoba, R., Ko, M.S., & Niwa, H. (2006) *Molecular and Cellular Biology*, 26(20), 7772-7782.
 - 12) 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(5), 555-567.
 - 13) Mitsui, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., & Yamanaka, S. (2003) *Cell*, 113(5), 631-642.
 - 14) Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., & Smith, A. (2003) *Cell*, 113(5), 643-655.
 - 15) Loh, Y.H., Wu, Q., Chew, J.L., Vega, V.B., Zhang, W., Chen, X., Bourque, G., George, J., Leong, B., Liu, J., Wong, K.Y., Sung, K.W., Lee, C.W., Zhao, X.D., Chiu, K.P., Lipovich, L., Kuznetsov, V.A., Robson, P., Stanton, L.W., Wei, C.L., Ruan, Y., Lim, B., & Ng, H.H. (2006) *Nature Genetics*, 38(4), 431-440.
 - 16) Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., & Smith, A. (2007) *Nature*, 450(7173), 1230-1234.
 - 17) Dejosez, M., Krumenacker, J.S., Zitur, L.J., Passeri, M., Chu, L.F., Songyang, Z., Thomson, J.A., & Zwaka, T.P. (2008) *Cell*, 133(7), 1162-1174.

升井 伸治

(国立国際医療センター研究所 細胞組織再生医学研究部
形質転換ベクター開発研究室)

Transcriptional network controlling pluripotency in embryonic stem cells

Shinji Masui (Division of Molecular Biology and Cell Engineering, Department of Regenerative Medicine, Research Institute, International Medical Center of Japan, 1-21-1 Toyama, Shinjyuku-ku, Tokyo 162-8655, Japan)

Ubc13 依存的ユビキチン化によるゲノム維持機構

はじめに

染色体 DNA は、酸素ラジカルや化学物質による化学修飾、放射線や複製フォークの崩壊などによる DNA 鎖の切

断など、様々な損傷を受ける。生物はこれら多様な DNA 損傷を常に感知し、適切に修復することで膨大なゲノム情報を維持している。例えば、細胞に γ 線を照射すると、重篤な DNA 損傷である DNA 二本鎖切断 (DNA double strand break; DSB) が生じる。DNA DSB は、切断末端同士を単純に再結合させる非相同末端結合 (non-homologous end joining; NHEJ) 及び、切断された DNA に相同な配列を持つ鎖を鋳型とした相同組換え (homologous recombination; HR)¹⁾ によって修復される。相同組換えは、鋳型となる姉妹染色分体 (複製によって生じた相同な配列を持つ鎖) が存在する S/G₂ 期で主に働くのに対し、非相同末端結合は細胞周期の G₁ 期で働く。また、紫外線は隣り合うチミン間で架橋されたピリミジンダイマーを形成する。これらは主にヌクレオチド除去修復 (nucleotide excision repair; NER) という修復機構によって除去されるが、複製を阻害する場合は複製後修復 (post-replication repair; PRR)²⁾ と呼ばれる機構によってまず複製ブロックが解除される (図 1 A, B)。このように、細胞は損傷の種類・細胞周期などに応じて DNA 修復機構を使い分けることで正確な修復を遂行している。そのため、様々な DNA 損傷に対する適切な修復機構の選択・アクセスは極めて厳密な制御を受けている。近年の研究から、様々な DNA 修復機構はユビキチン化により制御を受けていることが急速に明らかになってきた。特に、ユビキチン結合酵素 Ubc13 (E2) と共役して働く複数のユビキチンリガーゼ (E3) が相次いで同定され、それらの作用点・作用機序、機能的重複・差異の解明が活発な研究対象になっている。本稿では、脊椎動物の Ubc13 に焦点をあて、最近のトピックスを中心に概論する。

1. ユビキチン化による複製ブロック解除の制御

ユビキチンは、ユビキチン活性化酵素 (E1)、ユビキチン結合酵素 (E2)、ユビキチンリガーゼ (E3) の三つの異なる因子によって基質タンパク質に共有結合される。典型的には、基質に結合したユビキチンは、自身の 48 番リシン残基 (K48) に次のユビキチンの C 末端グリシンが共有結合することでポリマー化 (K48 結合型ポリユビキチン化) し、基質タンパク質をプロテアソームによる分解経路に導く。一方で、K48 結合型ユビキチン化とは異なる様式のユビキチン修飾も存在し、これらは基質の機能転換や下流因子の誘導など、タンパク質分解とは異なる機能を有すると考えられている³⁾。特に、単一のユビキチンによる修飾 (モノユビキチン化) や 63 番リシン残基 (K63) を介したポ