

論文内容要旨

Manipulation of Cell Cycle and Chromatin Configuration by Means of Cell-Penetrating Geminin

(膜透過型ジェミニンによる細胞周期
およびクロマチン構造の操作)

PLoS One, 11(5) : e0155558., 2016.

主指導教員：瀧原 義宏 教授

(原爆放射線医科学研究所 幹細胞機能学研究分野)

竹立 恭子

(原爆放射線医科学研究所 幹細胞機能学研究分野)

私の所属する研究室では造血幹細胞の活性を制御する分子基盤を解明することを目的に、造血幹細胞の活性を制御する内的因子であるポリコム遺伝子群(PcG)複合体と Hox について研究を進めてきた。そして PcG 複合体と Hox それぞれが共に DNA 複製ライセンス化制御因子 Geminin タンパク質の分解制御を介して造血幹細胞の活性を制御していることを明らかにした。これらの結果から Geminin が造血幹細胞の活性制御において中核的役割を果たしていることが推測された。DNA 複製には、ライセンス化という制御機構があり Geminin は DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 と直接結合して、その機能を阻害することで DNA 複製を制御することが知られている。一方で、Geminin はクロマチンリモデリング因子である Brahma や Brg1 と直接結合し機能阻害することで神経幹細胞や胚性幹細胞、さらに人工多能性幹細胞の未分化性維持に関与していることが知られている。これらの知見と私の所属する研究室での解析結果から、Geminin が造血幹細胞の増殖と分化を掛け分ける因子として機能していることが予測された。そこで私は、造血幹細胞における Geminin の機能を詳細に解析することを目的として、Geminin の発現を操作するための新たな技術開発を目指し、本研究を計画した。

研究室ではこれまでに、レトロウィルスベクターと shRNA 技術を用いた Geminin の高発現系と発現抑制系を作製してきた。しかし、これらの方法は恒常的に Geminin を高発現もしくは発現抑制を行うために細胞周期制御を破綻させてしまう可能性がある。さらに造血幹細胞においては、Geminin の発現は高く保たれ、前駆細胞に分化し、成熟血球を活発に産生する際には、その発現は低下する。つまり、Geminin の機能を詳細に解明するためには Geminin の発現を自由自在にコントロールできる実験系を構築する必要がある。そこで私は、FGF4 の membrane translocating motif 配列を融合することで Geminin タンパク質を細胞内に直接導入できる遺伝子組換え型 cell-penetrating (CP-) Geminin の開発を計画した。まず大腸菌を用いた発現系で CP-Geminin を大量に産生させ、アフィニティ精製を行った。この CP-Geminin は、培養液中に添加することによって、濃度依存的、かつ時間依存的に NIH3T3 細胞の細胞内に導入されることが解った。そこで、CP-Geminin が元々の Geminin 分子同様に Cdt1 や Brahma/Brg1 と細胞内で結合することを免疫沈降法で確認した。次に細胞レベルで分子機能を調べたところ、この導入された CP-Geminin は核に移行し、細胞周期の S 期への移行を阻害すること、さらに CP-Geminin を導入することで、クロマチンリモデリングが抑制されることが明らかになった。興味深いことに、培養液中から CP-Geminin を除くと、細胞中の CP-Geminin は速やかに減少する。これらの結果から、CP-Geminin を用いることで細胞中の Geminin の発現量を自由に操作し、Geminin の活性を制御できることが解った。今後は、CP-Geminin を用いて、Geminin による造血幹細胞の自己複製と分化の誘導を掛け分ける分子機構の解析を進め、造血幹細胞や白血病幹細胞をはじめとして幹細胞の活性を制御することのできる新技術の開発に貢献したいと考えている。