

平成22年4月15日現在

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19057001

研究課題名 細胞増殖から細胞分化への分岐点を解明する

研究課題名（英文）The turning point from cell proliferation to cell differentiation

研究代表者

中山 啓子 (NAKAYAMA KEIKO)

東北大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60294972

研究分野：細胞生物学・発生工学

科研費の分科・細目：生物科学・細胞生物学

キーワード：細胞増殖・分化・Geminin・転写制御・複製ライセンスング

1. 研究計画の概要

(1) 本研究の目的 細胞は分化とともに細胞増殖が止まる傾向にある。しかしながらいまだに分化と増殖の両者の関係を分子レベルで解明できてはいない。この両者の接点を探するために、Geminin を起点として細胞が増殖または分化を選択する際に核内で生じる変化を分子レベルで明らかにすることが目標である。分化の分子機構を解明するために、in vitro 分化系を駆使しつつ、マウス個体を試験管とみなし研究を進めたい。

(2) 本研究の計画 細胞増殖とは DNA 複製と細胞分裂を順序よく正しく繰り返す、均質な娘細胞が生じる過程である。Geminin は、DNA 複製を制御する分子であり、一方で分化に強く関わる Hox タンパク質と結合し、その転写活性を制御することが知られている。そこで Geminin またはその変異型の発現を制御したマウスや細胞を用いることによって、それらが DNA 複製・細胞増殖と分化にどのような影響を与えるかを検討する。

すでに研究代表者は Geminin ノックアウトマウスを作製し胎生初期に死亡することを報告した。このことは Geminin が細胞の正常な増殖に必須の分子であることを証明したものである。本研究課題では、このノックアウトマウス胚を用いると同時に、コンデ

ィショナルノックアウトマウスや細胞周期に影響を与えないものの分化に関与する領域のみを欠損したノックインマウスを作製し、そのマウスを解析することから分化の異常が細胞周期にどのような影響を与えるのか、それはどのような分子メカニズムに依るのかを検討する。

本研究は、Geminin の機能解析を目指した研究から発展しており、Geminin を分子ツールとして利用し細胞周期と分化の接点を探るものである。

2. 研究の進捗状況

Geminin 遺伝子を lox 配列で挟んだコンディショナルノックアウトマウス(cKO)と、組織特異的に発現制御するプロモーターにより発現を調節されている Cre recombinase 発現トランスジェニックマウスを交配し、組織特異的 Geminin ノックアウトマウスを作製した。

本年度は、lck-promoter によって発現が制御されている Cre-recombinase トランスジェニックマウスと交配することによって、T リンパ球特異的な Geminin ノックアウトマウスを作製した。Lck-Cre Tg と交配した Geminin cKO の胸腺 T リンパ球は、Geminin タンパク質の発現量は、低下しており Cre-recombinase によって Geminin 遺

伝子が欠失したことが確認された。胸腺 T 細胞の CD4 および CD8 の発現によって最も未分化な CD4/CD8 ダブルネガティブ細胞の減少を認め、Geminin は T 細胞の初期分化に必須であることが判明した。

次に、Mx-1 Cre-recombinase 発現トランスジェニックマウスと交配し、骨髄幹細胞で Geminin を欠失させた。欠失誘導後、3 週間後に、末梢血を調べたところ、重度の貧血に加え、血小板の異常な増加を認めた。このとき骨髄中の系譜マーカー陰性である骨髄幹細胞の減少とともに、巨核球数は著しい増加を示した。巨核球の DNA 含量が増加していることが予想される。以上のことから、Geminin の欠失によるライセンス異常が、骨髄幹細胞の維持を不能にするものの、巨核球はそのような環境に耐性であり、過剰な増殖の結果、血小板数の増加をきたしたのだと示唆される。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

当初計画していた、Geminin コンディショナルノックアウトマウスと組織特異的 Cre-recombinase 発現トランスジェニックマウスとの交配は、順調に遂行されている。いくつかの興味深い結果を得ることができている。特に、骨髄幹細胞での Geminin の機能は、示唆に富むものであると考えている。

4. 今後の研究の推進方策

骨髄は、幹細胞からの様々な細胞系譜への分化が観察される環境であり、各系譜への経路の解析は、細胞表面マーカーの発見と、フローサイトメーターによって、非常に良く解析されている。本研究課題では、そのような過去の知見に加え、細胞イメージングシステムや、in vitro 分化系を用いることによって、分子機構の解明を目指す。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計 28 件)

1. Masuda K, Ishikawa Y, Onoyama I, Unno M, de Alborán IM, Nakayama KI, and Nakayama K.: Complex

regulation of cell-cycle inhibitors by Fbxw7 in mouse embryonic fibroblasts. 査読有, *Oncogene* **29**, 1798 (2010).

2. Wang H, Bauzon F, Ji P, Xu X, Sun D, Locker J, Sellers RS, Nakayama K, Nakayama KI, Cobrinik D, and Zhu L.: Skp2 is required for survival of aberrantly proliferating Rb1-deficient cells and for tumorigenesis in Rb1(+/-) mice. 査読有, *Nat Genet* **42**, 83 (2010).
3. Susaki E, Nakayama K, Yamasaki L, and Nakayama KI.: Common and specific roles of the related CDK inhibitors p27 and p57 revealed by a knock-in mouse model. 査読有, *Proc Natl Acad Sci USA* **106**, 5192 (2009).
4. Matsuoka S, Oike Y, Onoyama I, Iwama A, Arai F, Takubo K, Mashimo Y, Oguro H, Nitta E, Ito K, Miyamoto K, Yoshiwara H, Hosokawa K, Nakamura Y, Gomei Y, Iwasaki H, Hayashi Y, Matsuzaki Y, Nakayama K, Ikeda Y, Hata A, Chiba S, Nakayama KI, and Suda T.: Fbxw7 acts as a critical fail-safe against premature loss of hematopoietic stem cells and development of T-ALL. 査読有, *Genes Dev* **22**, 986 (2008).
5. Ishikawa Y, Onoyama I, Nakayama KI, and Nakayama K.: Notch-dependent cell cycle arrest and apoptosis in mouse embryonic fibroblasts lacking Fbxw7. 査読有, *Oncogene* **27**, 6164 (2008).

[学会発表] (計 41 件)

[図書] (計 2 件)