

平成 27 年 4 月 29 日現在

機関番号：34521

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25870902

研究課題名(和文) 栄養膜幹細胞の増殖シグナルに関わる酸性オルガネラ膜融合因子(Vam8)の役割

研究課題名(英文) Role of acidic organelle membrane fusion factor (Vam8) involved in trophoblast stem cell growth signal

研究代表者

田畑 裕幸 (Hiroyuki, Tabata)

姫路獨協大学・薬学部・講師

研究者番号：70378785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ほ乳類細胞の酸性オルガネラは細胞内において、細胞増殖シグナルに関わる分子の輸送や分解を担っている。その過程では、複数の膜融合因子からなる複合体がオルガネラの膜同士の融合を制御する。我々はこれまでに、胚の胎盤組織(栄養外胚葉)を特異的に欠失するマウス(Vam8遺伝子欠損マウス)を得ている。本研究では、コンディショナルVam8遺伝子欠損マウスから栄養膜幹細胞(TS細胞)の樹立を試みた。また、Vam8遺伝子の欠損がTS細胞の増殖を制御するシグナル伝達分子の発現や活性に及ぼす影響について検証した。その結果、Vam8がmTORシグナル非依存的な機構によってTS細胞の増殖を制御していることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：In mammalian cells, acidic organelles play roles in transportation and degradation of the signaling molecule that is involved in cell growth. In the process, complex consisting of multiple membrane fusion factors regulates membrane fusion between organelles. We have previously obtained the Vam8 gene deficient mice that reveal specific lack of placental tissue (trophectoderm) in embryos. In this research, we tried to establish trophoblast stem cell (TS cell) lines from the conditional Vam8 gene deficient mice. Then, we examined the influence of Vam8 gene deficiency on the expression and activities of the signaling molecule that regulate TS cell growth. As a result, we found that Vam8 regulate TS cell growth by mTOR-independent mechanism.

研究分野：細胞生物学

キーワード：栄養膜幹細胞 酸性オルガネラ シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

マウスでは、胚盤胞期 (3.5 日胚) に将来胎盤となる栄養外胚葉を構成する細胞群が出現する。胎盤形成の初期を担うこの細胞群の増殖機構は不明な点が多い。申請者らは哺乳類細胞の酸性オルガネラ (リソソーム、エンドソーム) について解析を行い、これまでに酸性オルガネラが胚の成長に必須であることを報告してきた (Aoyama et al. Dev Cell 2012, Kawamura et al. Nature commun 2012)。他のグループも細胞増殖シグナルにおけるリソソームの重要性を報告している。

酸性オルガネラは細胞内において、シグナル伝達に関わる分子の輸送や分解を行う。その過程では、複数の膜融合因子からなる複合体がオルガネラの膜同士の融合をコントロールする。申請者らは酸性オルガネラの膜融合機構について解析を行う過程で、胚の胎盤組織 (栄養外胚葉) を特異的に欠失するマウス (Vam8 遺伝子欠損マウス) を得た。

Vam8 は酸性オルガネラの膜融合に必須の因子である。申請者は栄養外胚葉に特異的な表現型を示す Vam8 遺伝子欠損マウスが、将来胎盤になる細胞の増殖機構を解明する上で大変有用なツールになると考えた。そこで本研究では、Vam8 遺伝子欠損マウスから 3.5 日胚を採取して、栄養膜幹細胞 (TS 細胞) を単離し、その増殖に必要なシグナル伝達分子を特定する。これにより、胎盤形成の初期を担う細胞群の増殖機構を解明する。

2. 研究の目的

本研究では、酸性オルガネラの膜融合因子 (Vam8) が栄養外胚葉の成長を制御する分子機構を明らかにする。

申請者らは、マウス線維芽細胞を用いた解析から、Vam8 遺伝子を欠損させると mTOR シグナルの活性が低下することを既に確認している。本研究では、栄養膜幹細胞 (TS 細胞) において、Vam8 が関わる mTOR シグナル伝達分子を特定する。

3. 研究の方法

(1) 実験動物

マウス初期胚を得るために、Vam8 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスを使用した。実験動物は同志社女子大学遺伝子組換え実験安全委員会および同志社女子大学実験動物

委員会の承認を得て行われた。

(2) Vam8 遺伝子欠損胚の培養

Vam8 遺伝子欠損マウスおよび野生型マウスから 3.5 日胚を採取し、FCS と LIF を含有する DMEM 培地で培養した。各 3 ロットの Vam8 欠損 TS 細胞を樹立した。

(3) Vam8 遺伝子欠損栄養膜幹細胞 (Vam8 欠損 TS 細胞) の樹立

Vam8 遺伝子コンディショナル欠損マウスおよび野生型マウスから 3.5 日胚を採取し、FCS、FGF およびヘパリンを含有する TS 培地で培養した。

(4) mTOR シグナルの解析

Vam8 や Cdx2 の発現量および mTOR シグナル伝達分子 (phospho-S6K (Thr389)、phospho-ERK1/2 (Thr185、Tyr187、Thr202、Tyr204)、RagB、Rheb) の発現量やリン酸化レベルは、TS 細胞から細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法により解析した。

4. 研究成果

(1) Vam8 遺伝子欠損マウス由来 3.5 日胚の outgrowth 培養

TS 細胞を調製するためには、受精後 3.5 日胚を培養する必要がある。そこで、Vam8 欠損マウスおよび野生型マウスから受精後 3.5 日胚を採取し、それぞれ FGF およびヘパリン存在下で培養した。その結果、野生型胚では、正常な細胞増殖が観察されたが、Vam8 欠損胚では培養 6 日目において細胞増殖が停止していた。

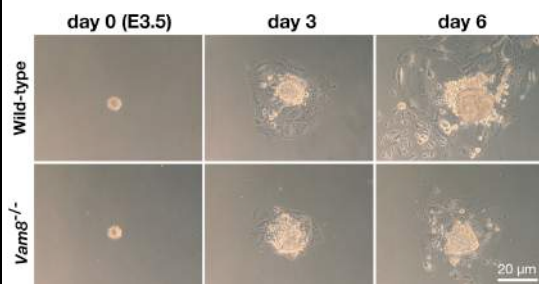


図1 Vam8 欠損マウス由来 E3.5 日胚の培養

野生型および Vam8 欠損マウスから 3.5 日胚を採取し、LIF 存在下で 6 日間培養した。

(2) Vam8 遺伝子欠損マウス由来 TS 細胞の調製

上記(1)の結果を受けて、Vam8 遺伝子欠損マウス胚から直接 TS 細胞を調製することは困難であることが判明した。そこで、任意の時期に Vam8 遺伝子を欠損できるマウス (Vam8 遺伝子コンディショナル欠損マウス) から 3.5 日胚を採取・培養した後、Cre 発現アデノウイルスを感染することで、Vam8 遺伝子欠損マウス由来 TS 細胞を調製した (図 2)。樹立した Vam8 欠損 TS 細胞について、TS 細胞マーカーの Cdx2 の発現を確認したところ、野生型 TS 細胞と同程度の発現が認められた (図 3)。

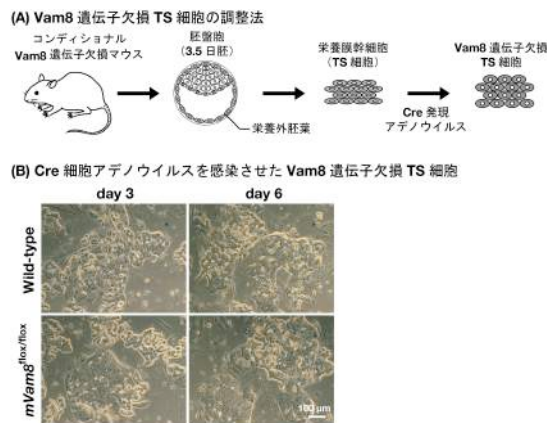


図 2 Vam8 遺伝子欠損マウス由来 TS 細胞
 (A) Vam8 遺伝子コンディショナル欠損マウスの胚盤胞から TS 細胞を調製し、Vam8 遺伝子をノックアウトさせるまでの概略図。
 (B) Cre 発現アデノウイルスの感染 3 および 6 日後の TS 細胞。

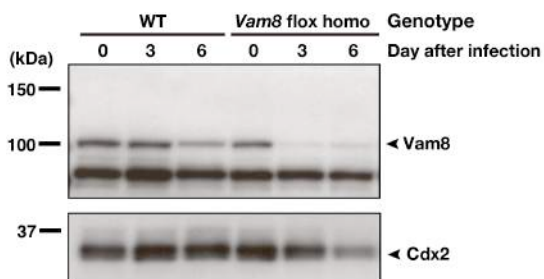


図 3 Vam8 欠損 TS 細胞における Cdx2 発現量
 野生型 (WT) および Vam8 コンディショナル欠損 TS 細胞 (Vam8 flox homo) について、Cre 発現アデノウイルス感染 0、3、6 日後に細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法を用いて Vam8 および Cdx2 の発現量を調べた。

(3) mTOR シグナル分子の発現 Vam8 遺伝子欠損マウス由来 TS 細胞における mTOR シグナル分子の発現

上記(2)で樹立した Vam8 欠損 TS 細胞について、細胞増殖シグナルの一つである mTOR シグナルの活性化状態をウエスタンブロット法により解析した。その結果、phospho-mTOR (Ser2448) の発現に顕著な差は認められなかった (図 4)。また、phospho-S6K (Thr389)、phospho-ERK1/2 (Thr185、Tyr187、Thr202、Tyr204)、RagB、Rheb の発現にも顕著な差は認められなかった。これらのことから、Vam8 による TS 細胞の増殖は、mTOR シグナル伝達以外の機構によって制御されていると考えられた。

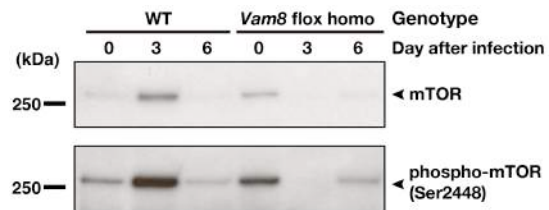


図 4 Vam8 欠損 TS 細胞における mTOR 発現量
 野生型 (WT) および Vam8 コンディショナル欠損 TS 細胞 (Vam8 flox homo) について、Cre 発現アデノウイルス感染 0、3、6 日後に細胞抽出液を調製し、ウエスタンブロット法を用いて mTOR および phospho-mTOR (Ser2448) の発現量を調べた。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

(1) 川村暢幸, 森田梨紗, 殿村真優, 田畑裕幸, 和田洋, 和田 (孫) 戈虹. マウス低分子量 GTPase Rab7 の初期胚発生における機能解析. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 京都府京田辺市. 2013 年 10 月 12 日

(2) 川村暢幸, 青山美奈子, 井堀仁美, 栗林葉子, 田畑裕幸, 和田洋, 和田 (孫) 戈虹. マウス初期胚におけるマイクロオートファジーの解析. 第 63 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 京都府京田辺市. 2013 年 10 月 12 日

(3) 信貴美里, 寺井唯, 竹内美智, 川村暢幸, 田畑裕幸, 和田洋, 和田 (孫) 戈虹. リソソーム膜輸送における mVam2 および低分子量 GTPase Ar18b と rab7 の役割. 第 63 回日本薬

学会近畿支部総会・大会. 京都府京田辺市.
2013年10月12日

(4) 山中加也, 川村暢幸, 田畑裕幸, 和田洋,
和田(孫) 戈虹. プロトンポンプ V-
ATPase a サブユニットアイソフォーム
のマウス初期胚における発現. 第63回日本
薬学会近畿支部総会・大会. 京都府京田辺市.
2013年10月12日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田畑 裕幸 (TABATA HIROYUKI)
姫路獨協大学・薬学部・講師
研究者番号: 70378785

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: