



Title	Alteration of cell adhesion and cell cycle properties of ES cells by an inducible dominant interfering Myb mutant
Author(s)	岩井, なおみ
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45374
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名 いわ 岩 井 な お み

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 18047 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 15 年 6 月 27 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 Alteration of Cell adhesion and cell cycle properties of ES cells
by an inducible dominant interfering Myb mutant
(ES 細胞における B-Myb の細胞接着および細胞周期の制御への関与)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 仲野 徹

(副査)

教 授 目加田英輔 教 授 宮崎 純一

論 文 内 容 の 要 旨

〔目的〕

病原遺伝子 Myb ファミリーは *c-myb*、*A-myb*、*B-myb* の三つのメンバーからなり、いずれも細胞の増殖や分化を制御する転写因子として機能する。三種の Myb の発現パターンは大きく異なり、*c-myb* は未分化な血球細胞で、*A-myb* は精巣や乳腺で強い発現がみられる。一方、*B-myb* は現在までに調べられた全ての細胞種で発現しており、細胞周期の G₁ 期から S 期にかけて強く発現することが知られている。*B-myb* ノックアウトマウスは着床直後、内部細胞塊の形成異常により致死となることが報告されている。

ES 細胞は胚盤胞の内部細胞塊由来の細胞株であり、全分化能の性質を持つ。ES 細胞では Myb ファミリーのうち *B-myb* が強く発現しており、*c-myb* と *A-myb* は発現が認められない。本研究では *B-myb* が初期胚の内部細胞塊、および内部細胞塊由来の未分化な細胞においてどのような機能を持つかを調べる目的で、ES 細胞における B-Myb の機能について解析を行った。

〔方法ならびに成績〕

解析手段として、コンディショナルに Myb の機能を阻害することのできる MERT (*Myb-Engrailed-estrogen receptor-tag*) 融合遺伝子を用いた。MERT は Myb の DNA 結合ドメイン、*Engrailed* 遺伝子の転写リプレッサー・ドメイン、そしてエストロゲンレセプターのホルモン結合ドメインからなる融合遺伝子である。MERT 蛋白はエストロゲン類似体の添加によって核へ移行し、Myb の認識配列に結合することができる。Myb の認識配列に結合した MERT 蛋白は、*Engrailed* 転写リプレッサーにより下流の遺伝子発現を抑制し、Myb の機能を阻害する。MERT 遺伝子を ES 細胞に導入した安定形質発現株を作製し、以下の解析に用いた。

MERT により B-Myb の機能を阻害した ES 細胞では G₁ arrest が認められ、細胞増殖能が低下していた。したがって ES 細胞で B-Myb が G₁ 期から S 期への移行の制御に働いていることがわかった。

B-Myb の機能を阻害した ES 細胞では細胞形態の著しい変化が観察された。未分化な ES 細胞は通常、コンパクトなコロニーを形成して増殖するが、B-Myb の機能を阻害したところ、細胞の形がまろくなり、浮遊するという形態変

化がみられた。 G_1 arrest による二次的な影響である可能性が考えられたが、薬剤により ES 細胞に人為的に G_1 arrest を誘導してもこのような形態変化はみられなかった。また様々な分化マーカーについて調べた結果、B-Myb の機能を阻害した ES 細胞において未分化性は保たれていた。そこで、細胞接着能の変化について検討した。細胞外基質に対する接着アッセイを行ったところ、ラミニン、コラーゲン、フィブロネクチン等、調べた全ての細胞外基質蛋白に対して、B-Myb の機能を阻害した ES 細胞では接着能が有意に低下していることが明らかとなった。ES 細胞の細胞外基質への接着においては $\beta 1$ integrin が重要な役割を担うことが知られている。そこで $\beta 1$ integrin の発現を FACS により調べたところ、B-Myb の機能を阻害した ES 細胞では細胞表面の $\beta 1$ integrin 蛋白の発現が大きく低下していた。

もう一つの細胞接着様式である細胞間接着について調べるため、胚様体の形成について検討した。その結果、B-Myb の機能を阻害した ES 細胞は正常な胚様体を形成することができなかった。ES 細胞どうしの細胞間接着に重要であることが知られている E-cadherin について FACS で調べたところ、B-Myb の機能を阻害した ES 細胞では細胞表面の E-cadherin 蛋白の発現が低下していた。

〔総括〕

ES 細胞において B-Myb は細胞外基質への接着に機能する $\beta 1$ integrin、そして細胞間接着に機能する E-cadherin、いずれの発現機構にも関与することがわかった。*B-myb* ノックアウトマウスにおける内部細胞塊の形成不全について、いままでは細胞周期の異常が原因であると考えられていたが、本研究の結果より、細胞接着の異常も大きな原因であることが示唆された。B-Myb の細胞接着への関与についてはいまだ知られておらず、転写因子 B-Myb の役割に新たな知見を加えるものである。

論文審査の結果の要旨

本論文では ES 細胞における転写因子 B-Myb の機能を解析する目的で、コンディショナルに Myb の転写活性化能を阻害することができるドミナントネガティブ変異体 MERT (Myb-Engrailed-estrogen Receptor-Tag) を ES 細胞に導入して安定形質発現株を樹立し、解析を行った。

MERT の誘導により B-Myb の機能を阻害した ES 細胞においては細胞周期の G_1 arrest および増殖抑制が認められた。また B-Myb の機能阻害により細胞形態の著しい変化が観察され、細胞外マトリックス蛋白への細胞接着活性、そして細胞間接着活性が低下していることがわかった。細胞表面における $\beta 1$ -integrin および E-cadherin の発現が低下しており、B-Myb は ES 細胞においてこれらの接着分子の発現機構に関与することがわかった。B-Myb の細胞接着への関与はこれまで知られていなかった知見である。

本論文の内容は学位の授与に値すると考えられる。