

Title	Differentiation status dependent function of FOG-1
Author(s)	田中, 誠人
Citation	大阪大学, 2005, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45541">https://hdl.handle.net/11094/45541</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

氏名	田中誠人
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第19326号
学位授与年月日	平成17年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科臓器制御医学専攻
学位論文名	Differentiation status dependent function of FOG-1 (転写コファクターFOG-1の機能は細胞分化段階に依存する)
論文審査委員	(主査) 教授 吉川 秀樹 (副査) 教授 金倉 讓 教授 宮崎 純一

### 論文内容の要旨

#### [ 目的 ]

Friend of FOG-1 (FOG-1) は造血に重要な転写因子である GATA-1 を bait として two-hybrid screening により同定された新規の Zn フィンガータンパクである。FOG-1 は GATA-1 と同様に赤血球、巨核球に発現が認められ、GATA-1 の転写コファクターと考えられている。FOG-1 欠損マウスの赤血球では GATA-1 欠損マウスと同様な障害が認められるにもかかわらず、巨核球系細胞の異常は GATA-1 欠損マウスと大きく異なる。また、アフリカツメガエルやショウジョウバエの実験においては、FOG-1 は赤血球産生に抑制的に働くことが示されているが、ほ乳類の細胞株を用いた実験では赤血球および巨核球の分化を促進するとされ、種間で差異が見られる。以上のように、血球分化において FOG-1 の機能は詳しくわかっていない。

そこで、血液細胞分化における FOG-1 の役割を明らかにするため、外来性 FOG-1 遺伝子の発現を抗生物質テトラサイクリンにより調節できるマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 株を樹立し、OP9 ストローマ細胞との共培養によって血液細胞に分化誘導をおこない、FOG-1 の機能を検討した。

#### [ 方法ならびに成績 ]

まず、テトラサイクリン (TET) を培養液中から除去することにより、FOG-1 遺伝子の発現を調節できる ES 細胞株を樹立した。この細胞株を OP9 ストローマ細胞との共培養により血液細胞に分化誘導し、TET を除去し FOG-1 を発現させる時期を変化させ、血球細胞の分化における影響を検討した。

EPO 存在下で赤血球に分化させ、共培養5日目から FOG-1 を発現させたところ、胚型赤血球の増殖と分化が抑制された。また、共培養5日目、8日目から FOG-1 を発現させた場合も同様に成体型赤血球の増殖が抑制された。TPO 存在下で巨核球に分化させ、共培養5日目から発現させたところ、巨核球の増殖は抑制された。しかし、共培養8日目から発現させた場合は、巨核球の増殖は著明に促進された。また、この巨核球は proplatelet の形成が少なく、多倍体化も減弱しており、未分化のまま増殖することが示された。これらのことから後期血球分化において、FOG-1 は未分化な巨核球の増殖を促進することが示唆された。

FOG-1 は転写の抑制に関与する C-terminal binding protein (CtBP) の結合部位を持ち、アフリカツメガエルで

は血球産生において CtBP との結合が FOG-1 の機能に重要であることが示されている。そこで、CtBP と結合できない FOG-1 の変異体 (FOG-1 Δ CtBP) を作成し、同様に TET 非存在下において FOG-1 Δ CtBP を発現する細胞株を樹立し、赤血球および巨核球分化における影響を検討したところ、野生型 FOG-1 と同様の発現型が見られた。このことから、血球分化において CtBP との相互作用は不必要であることが示された。

次に、巨核球分化における GATA-1 と FOG-1 の協調的な作用を明らかにするため、GATA-1 を欠損する ES 細胞で FOG-1 を TET 非存在下に発現する細胞株を樹立し、GATA-1 非存在下での FOG-1 の機能を検討した。共培養 5 日目から FOG-1 を発現させたところ、野生型と同様に、巨核球の増殖は抑制された。共培養 8 日目から FOG-1 を発現させたところ、未分化な巨核球細胞は出現したが、野生型とは異なり、巨核球の増殖は促進されなかった。このことから、早期血球分化において FOG-1 は GATA-1 非依存的に巨核球の増殖を抑制し、後期血球分化において FOG-1 は GATA-1 依存的に巨核球の増殖を促進し、GATA-1 非依存的に巨核球の成熟を抑制することが明らかとなった。

最後に、ES 細胞において FOG-1 がどのように作用するかを検討した。LIF 存在下で FOG-1 を発現させたところ、ES 細胞の増殖は抑制された。形態的には分化しておらず、また、分化マーカーの発現も認められなかった。さらに細胞周期を検討したところ、G0/G1 期で停止していることが示された。次に、ES 細胞に FOG-1 Δ CtBP を発現させたところ、細胞増殖の抑制は認めなかった。このことから、ES 細胞において FOG-1 は CtBP 依存的に増殖を抑制することが示された。

#### [ 総 括 ]

TET-off system を用いたコンディショナル遺伝子発現系を OP9 分化誘導システムと組み合わせることにより FOG-1 の機能解析をおこなった。

FOG-1 は全ての分化段階において、赤血球の増殖を抑制した。巨核球分化において、早期では GATA-1 非依存的に増殖抑制が認められたが、後期においては GATA-1 依存的に未分化状態での増殖が促進された。また、ES 細胞の増殖は CtBP 依存的に抑制され、FOG-1 は細胞の分化段階において、異なる分子と協調的に作用することにより、多彩に機能することが示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

FOG-1 は転写因子 GATA-1 と結合する Zn フィンガータンパクであり、FOG-1/GATA-1 複合体は赤血球および巨核球の分化に重要であるといわれている。しかし、FOG-1 欠損マウスの赤血球では GATA-1 欠損マウスと同様な障害が見られるにもかかわらず、巨核球系細胞の異常は GATA-1 欠損マウスと大きく異なる。

そこで、血液細胞分化における FOG-1 の役割を明らかにするため、外来性 FOG-1 遺伝子の発現を抗生物質テトラサイクリンにより調節できるマウス胚性幹細胞 (ES 細胞) 株を樹立し、OP9 ストロマ細胞との共培養によって血液細胞に分化誘導をおこない、FOG-1 の機能を検討した。

FOG-1 は全ての分化段階において赤血球の増殖を抑制した。しかし、巨核球分化においては、早期の分化段階では巨核球の増殖を抑制するが、後期においては未分化性を維持したまま増殖を促進した。また、FOG-1 は赤血球や巨核球と異なる分子メカニズムによって、ES 細胞の増殖を抑制した。

以上のことから、FOG-1 は細胞の分化段階において異なる分子メカニズムを介して機能することがわかった。

以上の内容は、学位の授与に値すると考えられる。