

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2008 ～ 2009

課題番号：20790220

研究課題名（和文） Tsc-22 による幹細胞の増殖制御機構

研究課題名（英文） Regulation of stem cell proliferation by Tsc-22

研究代表者

鈴木 裕之（SUZUKI HIROYUKI）

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号：70375509

研究成果の概要（和文）：Tsc-22 の ES 細胞増殖抑制機構を検討したところ、Tsc-22 は転写因子 c-Myc、Oct4 と結合し、細胞増殖因子 p21 の発現を増強することを明らかにした。また Tsc-22 は ERas に結合することで、PI3-Akt 経路を抑制することも重要であることを見出した。

研究成果の概要（英文）：Tsc-22 inhibits ES cell proliferation with maintaining the pluripotency. By analyzing the transcriptional factors that interact with Tsc-22 among Yamanaka factors (Oct4, c-Myc, Klf4 and Sox2), we found that Tsc-22 interacts c-Myc and Oct4. Tsc-22 suppresses the c-Myc / Oct4-mediated inhibition of p21 promoters. Furthermore, Tsc-22 interacts with ERas and inhibits PI3 kinase-Akt pathway.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子生物学

科研費の分科・細目：基礎医学・医化学一般

キーワード：Tsc-22, c-Myc, Oct4, ERas, 幹細胞, 転写因子, 癌, p21

## 1. 研究開始当初の背景

c-Myc は、癌においてその遺伝子の増幅や機能亢進が認められ、細胞の癌化に重要な因子であることが知られている。近年 c-Myc は、ES 細胞の増殖や全能性の維持、組織幹細胞の維持に重要な役割を果たすことが報告されている。c-Myc は転写因子 Max とヘテロダイマーを形成し、E-box を介した転写を活性化する。これによって転写活性化される遺伝子の一つとしてテロメラーゼの触媒サブユニット (hTERT) が知られている。また c-Myc は

Miz-1 と結合することにより、Miz-1 による cdk inhibitor (p21 や p15) の転写活性化を抑制することで細胞の増殖を促進する。我々は、Transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) によって誘導される遺伝子を検索する過程で、Tsc-22 (TGF- $\beta$  stimulated clone-22) に着目した。Tsc-22 はロイシンジッパードメインを持つタンパク質で、核や細胞質に存在することが報告されているが、その機能は殆ど分かっていない。そこで Tsc-22 に結合するタンパク質を検索したところ、c-Myc と結合

することが明らかになった。

## 2. 研究の目的

Tsc-22 の細胞増殖抑制作用について明らかにする。

## 3. 研究の方法

【細胞培養】ヒト胎児腎細胞株 293T、ヒト角化細胞株 HaCaT は 10%FBS、penicillin streptomycin solution を添加した DMEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。ES 細胞は Leukemia inhibitory factor, 10%FBS、penicillin streptomycin solution を添加した GMEM を用いて 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。

【遺伝子導入】HaCaT-Tsc-22 安定発現株は、HaCaT 細胞に pCAGIP-FLAG-Tsc-22 を導入し、導入細胞を 1 µg/ml の puromycin で選択した。増殖したコロニーをクローニングし、抗 FLAG 抗体を用いて発現細胞を選択した。

【細胞増殖曲線】Tsc-22 安定発現株、を 12 well plate に 1x10<sup>4</sup> cells/well の密度で撒き、その後血球計算盤を用いて 6 日目まで 1 日おきに細胞数をカウントし、細胞増殖曲線を得た。

【Luciferase Assay】293T 細胞を 24 well plate に撒き、翌日 FuGENE6 を用いて遺伝子導入を行い、24 時間培養した。各 well から細胞培養液を除去し、lysis buffer を 200 µl 加え、20 分間振盪した。細胞溶解液を 1.5ml チューブに移し、遠心後、上清を 96 well plate に 15 µl ずつ入れ、発光基質として 50 µl の Luciferase Assay Reagent を用いて発光させ、Micro Lumat Plus で発光量を測定した。遺伝子導入の効率を補正するために CH110 を同時に遺伝子導入しておき、上清を 96 well plate に 30 µl ずつ分注し、そこに等量の 2 x β-gal を混和させた。その後、37°C で 30 分間反応させ、分光光度計を用いて吸光度 (405 nm) を測定した。

## 4. 研究成果

ヒトケラチノサイト HaCaT 細胞に Tsc-22 を恒常的に発現する細胞株 (クローン 11、17) を樹立したところ、親株に比べてクローン 11、17 では増殖速度が顕著に低下することを見出した。さらに cdk inhibitor p21 の発現を検討したところ、増殖速度の遅いクローン 11、17 では p21 の発現が上昇していることが明らかになった。さらにこの Tsc-22 発現株を用いて、Tsc-22 と c-Myc との結合について免疫沈降法により検討したところ、互いの結合が認められた (図 1)。また、Tsc-22 と c-Myc は核で共局在することが明らかになった。

さらに Tsc-22 と c-Myc の結合部位について、様々な欠失変異体を用いて検討したところ、c-Myc のロイシンジッパードメイン、

Tsc-22 のロイシンジッパードメインと N 末端の約 40 アミノ酸が必要であることが明らかになった。次に Tsc-22 が c-Myc の転写活性化・抑制に与える影響についてルシフェラーゼアッセイを用いて検討した。c-Myc は p15、p21 プロモーターの転写を抑制するが、そこに Tsc-22 を加えると c-Myc による転写抑制作用を解除する活性を持つことが明らかになった (図 2 A)。このことは Tsc-22 の発現株において p21 の発現が上昇する結果と一致する。また c-Myc は E-box を介した転写を活性化する。そこで hTERT プロモーターを用いて c-Myc による転写活性化における Tsc-22 の作用について検討したところ、Tsc-22 は c-Myc による転写活性化作用を増強することが明らかになった (図 2 B)。またこれらの作用は c-Myc の結合領域を欠損させた Tsc-22 では起こらなかった。これらのことから Tsc-22 は c-Myc の機能を全て抑制する因子ではなく、転写の活性化作用と抑制作用のうち転写活性化作用は増強し、転写抑制作用は阻害するという新しい機能を有するタンパク質であることが明らかとなった。

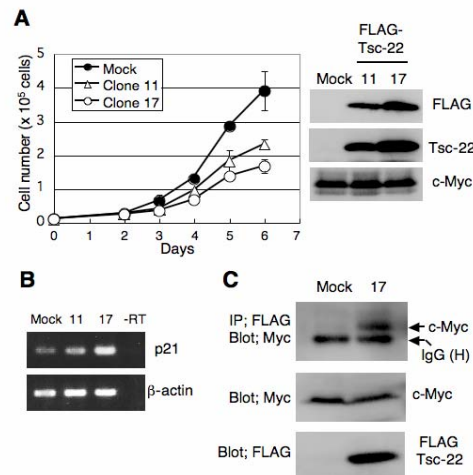


図1 Tsc-22による細胞増殖抑制作用とc-Mycとの結合 (A, B) FLAG-Tsc-22発現細胞では細胞増殖抑制が認められ、cdk inhibitor p21の発現上昇が認められる。 (C) Tsc-22とc-Mycは細胞内で結合する。

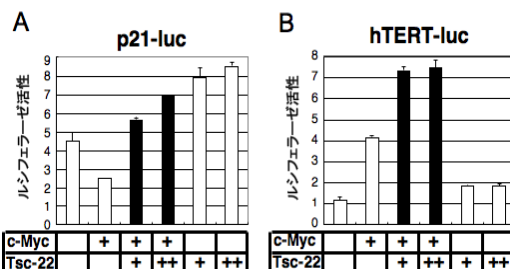


図2 Tsc-22によるc-Mycの転写制御 (A) c-Mycによって誘導されるp21プロモーターの転写抑制(Lane 2)が、Tsc-22によって解除される(Lane 3, 4 黒いバー) (B) c-Mycによって誘導されるhTERTプロモーターの転写活性化(Lane 2)が、Tsc-22によって増強される(Lane 3, 4 黒いバー)

近年 c-Myc は組織幹細胞の維持や ES 細胞の増殖や多能性の維持、リプログラミングに重要な役割を果たしている。そこで Tsc-22 の幹細胞の増殖・分化に与える影響について検討するためにマウス ES 細胞へ Tsc-22 を導入して、ES 細胞の増殖、多能性の維持における Tsc-22 の役割について検討した。ES 細胞への遺伝子導入は supertransfection 法を用い、未分化状態における ES 細胞の増殖について検討したところ、Tsc-22 は ES 細胞の未分化性を保ちながら増殖を低下させることができることが明らかになった (図 3)。

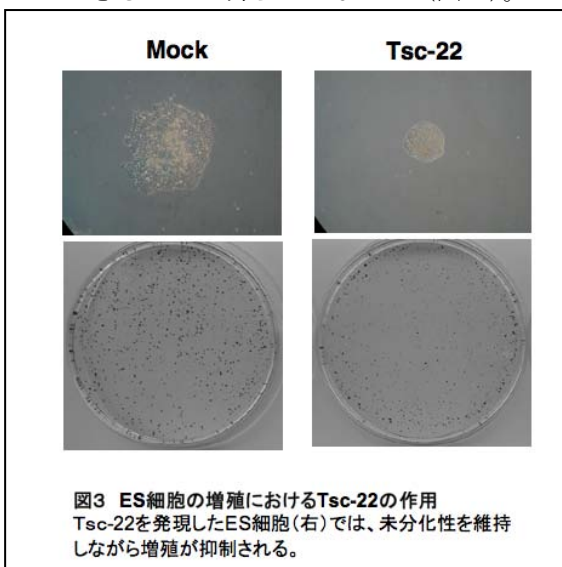


図3 ES細胞の増殖におけるTsc-22の作用  
Tsc-22を発現したES細胞(右)では、未分化性を維持しながら増殖が抑制される。

山中からは ES 細胞の初期化を誘導する転写因子として、Oct4, Sox2, Klf4, c-Myc の 4 つの転写因子を同定した。Tsc-22 は c-Myc と結合することから、その他 3 つの因子との相互作用についても検討した。すると Tsc-22 は c-Myc のみならず、Oct4 にも結合することが明らかになった。一方、Sox2, Klf4 には結合しなかった。Cdk インヒビター-p21 は山中因子による初期化を抑制することが報告されている。そこで p21 レポーターに対する c-Myc, Oct4 の作用について検討したところ、c-Myc だけでなく Oct4 も p21 レポーターを抑制する活性をもつことが明らかになった。さらにこれらの作用は Tsc-22 によって解除された。さらに我々は c-Myc と Oct4 が結合し、Oct4 による転写活性化を c-Myc が抑制することを見出した。さらにこの系に Tsc-22 を加えると、c-Myc による抑制が解除された。以上のことから ES 細胞における Tsc-22 の増殖抑制作用には c-Myc, Oct4 による p21 プロモーターの抑制作用の解除が重要であると考えられた。また Tsc-22 は c-Myc による Oct4 の抑制を阻害し、Oct4 による未分化性の維持作用に関与していると考えられた。現在 Tsc-22 を ES 細胞でノックダウンする実験系を確立し、Tsc-22 をノックダウンした際に細

胞増殖や分化にどのような影響をもたらされるか検討中である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

(1) 鈴木裕之、青山知恵、加藤光保  
TGF- $\beta$ , 間接リウマチ (日本臨床) 2010  
(査読無)

(2) Sonkoly E, Wei T, Loriè EP, Suzuki H, Kato M, Törmä H, Stähle M and Pivarcsi A  
Protein kinase C-dependent upregulation of miR-203 induces the differentiation of human keratinocytes. *J Invest Dermatol.* 130, 124-34, 2010 (査読有)

(3) Wang B, Suzuki H (corresponding author), and Kato M.

Roles of mono-ubiquitinated Smad4 in the formation of Smad transcriptional complexes. *Biochem Biophys Res Commun.* 376, 288-292, 2008 (査読有)

(4) Suzuki T, Tsutsumi A, Suzuki H, Suzuki E, Sugihara M, Muraki Y, Hayashi T, Chino Y, Goto D, Matsumoto I, Ito S, Miyazawa K and Sumida T

Tristetraprolin (TTP) gene polymorphisms in patients with rheumatoid arthritis and healthy individuals. *Mod Rheumatol* 18, 472-479, 2008 (査読有)

(5) 鈴木裕之、中条友香、加藤光保 TGF- $\beta$  シグナル伝達と癌治療, がんの分子標的治療 (南山道) 132-139, 2008 (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

(1) Suzuki H Nakajo Y Nakano A Nakayama Y and Kato M Tsc-22 inhibits cellular proliferation through regulation of c-Myc and Oct4 (Poster in English) AACR/JCA Joint Conference (Waikoloa, Hawaii) 2010 年 2 月 5 日

(2) Suzuki H Nakano A and Kato M Regulation of cellular proliferation by transforming growth factor- $\beta$  stimulated clone 22 (Poster in English) 68<sup>th</sup> Annual meeting of the Japanese Cancer Association 2009 年 10 月 1 日

(3) Suzuki H Tozuka R and Kato M Promotion of colony dispersion and

cell motility by cooperative action  
of TGF- $\beta$  and EGF signaling (Oral in  
Japanese) 98<sup>th</sup> Annual meeting of the  
Japanese Society of Pathology 2009  
年5月3日

[その他]

ホームページ等

<http://www.md.tsukuba.ac.jp/epatho/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 裕之 (SUZUKI HIROYUKI)

筑波大学・大学院人間総合科学研究科・助教

研究者番号 : 70375509