



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the role of prolyl oligopeptidase in mouse trophoblast stem cell differentiation [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	丸山, 優樹
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第13170号
Issue Date	2018-03-22
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/70056
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Maruyama_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏 名 丸 山 優 樹

学 位 論 文 題 名

Studies on the role of prolyl oligopeptidase in mouse trophoblast stem cell differentiation
(マウス胎盤幹細胞分化におけるプロリルオリゴペプチダーゼ機能に関する研究)

プロリルオリゴペプチダーゼ(POP)は多機能プロテアーゼとして知られており、30 アミノ酸以下の生理活性ペプチドの -Pro-X- を切断する非常に特殊な酵素活性を持つ。ただし、POP はその一方で酵素機能とは無関係に相互作用タンパク質として機能することも報告されている。POP は細菌から哺乳類の様々な組織にまで幅広く発現していて、これまで阻害剤を用いた実験やノックアウトマウスの解析などが進んだ結果、脳機能や細胞分化、生殖、細胞分裂、代謝や分泌など様々な生理機能に関わることが明らかになっている。しかし、POP は発生過程において高い発現を示し、マウス胎盤でも高発現するにもかかわらず、発生における POP の機能は全く解明が進んでいなかった。胎盤を構成する主要な細胞は3種類存在し、それぞれ Trophoblast giant cell (TGC), Spongiotrophoblast (SpT), Syncytiotrophoblast (SynT) と呼ばれているが、POP が高発現するのは TGC と SpT である。つまり胎盤における POP の発現解析は進んでいたものの、胎盤における POP の機能は未解明のままだった。

本研究は発生において必須な組織である胎盤における POP の機能解明を目的としている。筆者は POP が細胞分化に機能することからここでは胎盤分化において機能するのではないかと考えた。この仮説を検証するため、胎盤分化研究において非常に有用なツールとして用いられている Trophoblast stem cell (TS 細胞) と、POP 特異的阻害剤を用いた解析を行った。

第一章

TS 細胞分化誘導前後における POP の発現や酵素活性レベルの解析を行ったところ、POP mRNA・タンパク質・酵素活性のいずれも TS 細胞分化過程を通してみられることがわかった。POP の発現局在を western blotting により調べてみたところ、細胞質と膜においてバンドが確認されたが、多くは細胞質に局在していた。次に POP の阻害剤である SUAM-14746 (SUAM) を用いた実験を行った。TS 細胞分化誘導時に SUAM と DMSO (コントロール) を添加したサンプルにおいて、顕微鏡下での形態観察と各種細胞のマーカー遺伝子の発現解析により、分化に与える影響を確認した。30 μ M SUAM 添加時における分化4日目の細胞形態を確認すると、コントロールと比較して、大きな核と細胞質を持ち見た目で判別しやすい TGC の細胞数が減少していることが確認された。30 μ M から 1 μ M まで濃度を変えて阻害剤実験を行ったときのマーカー遺伝子の発現パターンを解析したところ、TGC と SpT のマーカー遺伝子の発現が阻害剤の濃度依存的に減少していたことから、POP は TGC と SpT の分化に機能することが示唆された。この SUAM は確かに POP 活性を阻害しており、さらに TS 細胞において細胞毒性を持たないことを確認した。ここまでに得られた結果をさらに確認するため、異なる POP 阻害剤である KYP-2047 (KYP) を用いて同様の阻害実験を行った。60 μ M KYP 添加時の TGC と SpT マーカーの発現を解析したところ、予想に反していずれもコントロールと比べて発現に違いが見られず、SpT も TGC も分化が阻害されなかった。KYP も SUAM と同様に POP 活性を阻害し、Native-PAGE によって同様の立体構

造変化を引き起こした。これまでも POP 阻害剤の違いが結果に影響を与える報告が存在しているため、今回の実験結果も阻害剤の違いによってもたらされたものであると考えられる。結論として、POP は TGC と SpT 分化に重要な機能を持つことが明らかになった。

第二章

本章では具体的に POP がどのように TS 細胞の分化に関わっているのかを解明するために、SpT 分化におけるマスター遺伝子として知られている転写因子 *Mash2* に着目した。*Mash2* 遺伝子の発現は PI3K-Akt 経路、Wnt- β -Catenin 経路、MAPK 経路の ERK のリン酸化などといった様々なシグナリング系で調節を受けていることがすでに報告されている。その一方で POP が PI3K-Akt 経路を調節するという報告もあったため、POP は PI3K-Akt の経路で SpT 分化に関わるのではないかと考え、POP 阻害剤である SUAM と PI3K のリン酸化を阻害する LY294002 という薬剤を添加した時における TS 細胞の分化における影響を解析した。POP 阻害時の *Mash2* の発現を調べたところ *Mash2* の発現が有意に減少した。ここから、POP は *Mash2* の発現を調節することで SpT の分化を調節することが示唆された。しかしながら、LY294002 を添加しても SpT マスター遺伝子の *Mash2* と SpT マーカー遺伝子である *Tpbpa* の発現は共にコントロールと比較して有意な減少を示さなかった。すなわち、PI3K 阻害は SpT 分化に影響しないことが明らかになった。

本研究により、TS 細胞の分化過程において、POP 特異的阻害剤である SUAM は TGC と SpT の分化を大きく阻害した。このことから、POP が胎盤分化において TGC と SpT の分化促進に機能していることが分かった。さらに、POP は SpT のマスター遺伝子である *Mash2* を調節することで SpT 分化を調節するという新たなメカニズムを明らかにした。以上の成果は、POP の発生における新規生理機能を明らかにした点、胎盤分化研究における新たな知見を得た点、プロテアーゼのもつ細胞分化の機能やその多機能性に迫った点において大きな研究意義を持つものである。