HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Studies on the role of prolyl oligopeptidase in mouse trophoblast stem cell differentiation [an abstract of entire text]
Author(s)	丸山, 優樹
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。【担当：理学部図書室】 https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/
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/2115/70057
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Maruyama_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 の 要 約

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。

胎盤は胎児の支持、母体と胎児間におけるガスや栄養の交換、ホルモンの産生や分泌など、発生に必須の組織である。胎盤形成に必要な遺伝子におけるノックアウトマウスにおいては、胎盤に欠陥を生じた結果、胚性致死を引き起こしてしまう場合も多いが、胎盤異常が見られるものの致死にならないものも存在する。さらに、胎盤で遺伝子が高発現しているにも関わらず胎盤における表現型が報告されていないノックアウトマウスも存在することから、胎盤形成や分化における解析は非常に複雑であり、他の適した実験系が必要とされてきた。この問題に対する答えとして、1998 年に樹立された胎盤の幹細胞である TS 細胞の存在が示される。TS 細胞は成長因子である FGF4 の有無によって簡単に分化を誘導でき、胎盤の構成細胞である TGC、SpT、SynT へと分化させることが可能である。このため、TS 細胞は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。

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。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、TS 細胞と POP 特異的阻害剤を用いた解析を行うことによってこの仮説を検証した。

第一章

はじめに､TS 細胞分化誘導過程における各細胞のマーカー遺伝子の発現パターンを解析した。その結果、いずれの遺伝子においてもこれまでの先行研究と同様の発現パターンを得ることに成功し、当研究室において実験系を確立させた。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。その結果、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ることがわかった。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 μM 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 μM から 1 μM 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 μM 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 TCG も分化阻害を起こさないことが明らかになった。KYP も SUAM と同様に確かに POP 活性を阻害することを確認した。この KYP は POP と結合することで POP の立体構造を変化させることが知られていたため、SUAM においても立体構造の変化が起こるかどうかを Native-PAGE で簡易的に解析した。その結果、この解析においては SUAM も KYP も同様に POP の立体構造変化に寄与していることが明らかになった。しかしながら、これまでにも 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 阻害剤の 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とから、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 *Tpbpα*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。