

FLASH 変異マウスと ES 細胞を用いた

FLASH/casp8ap2 の生理機能解析

南田佳孝

## 目次

要旨	3
第一章 序論	5
1-1. Fas を介するアポトーシスについて	6
1-2. FLASH について	8
第二章 実験材料と実験方法	13
第三章 結果	28
3-1. FLASH 変異マウスのゲノム構造解析	29
3-2. 変異型 FLASH は精巣でのみ発現している	29
3-3. ホモ型 FLASH 変異マウスは発生初期で死滅する	32
3-4. ホモ型 FLASH 変異胚は透明帯からハッチングできず、 ゼラチンコート dish に接着できない	32
3-5. 誘導型 FLASH ノックアウト ES 細胞の作製	38
3-6. FLASH KO ES は野生型 ES と同様に増殖し、初期分化も誘導できる	40
3-7. FLASH は血球系および血管内皮細胞分化に関与する	42
3-8. FLASH KO ES は栄養芽細胞への分化とその増殖に関与しない	43
3-9. FLASH KO ES ではコアヒストンの発現が低下している	47
第四章 考察	51
引用文献	59
謝辞	65

## 要旨

FLASH (FLICE associated huge protein)/casp8ap2 は 1999 年に caspase-8 (FLICE) に結合する分子としてマウス T 細胞株由来の cDNA ライブラリーより同定、クローニングされ、Fas を介するアポトーシスのシグナル伝達で機能を持つ分子として報告された。その後、FLASH は核内受容体の転写活性を制御するという報告や、急性白血病の予後に関与するという報告もなされている。また、近年になり FLASH は主に核内の Histone Locus Body に存在し、細胞周期 S 期の進行や細胞周期 S 期特異的ヒストンの発現制御に機能していることが明らかになり、FLASH は様々な生理機能を持つ重要な分子であることが示されている。

一方、動物個体における FLASH の生理機能は不明であった。そこで申請者は、動物個体における FLASH の生理機能を解明するため、FLASH 遺伝子内に trapping vector が挿入された FLASH 変異マウスの解析を行った。その結果、この FLASH 変異マウスは FLASH のプロモーターの変異マウスであり、精巣以外のほとんど全ての組織で FLASH の発現が欠損していることを明らかにした。また、FLASH を欠損すると、受精後 3.5 日の胚盤胞で栄養芽細胞が透明帯を破って増殖するハッチングが引き起こされず、この時期に胎生致死となることを明らかにした。このように、FLASH は個体発生において着床前の胚盤胞期に必須であることが明らかになった。

さらに、FLASH の発生期における機能を詳細に解析するため、申請者は gene targeting 法により誘導的に FLASH をノックアウトできる ES 細胞株を作製し、解析を行った。その結果、これまでの報告では FLASH の発現を抑制すると細胞周期の進行が S 期でアレストすることが様々な細胞株において知られていたのに対し、ES 細胞で FLASH を欠損させても増殖に影響がなく、さらに ES 細胞の外胚葉、中胚葉、内胚葉への分化にも影響がないという予想外の事実が明らかになった。また、FLASH は血球や血管内皮細胞への分化に機能することが示唆されたものの、胚盤胞の着床に重要な役割を担う栄養芽細胞への分化、生存には関与が認められなかった。

一方、FLASH を欠損した ES 細胞では他の細胞株で FLASH を抑制した場合と同様に細胞周期依存的ヒストン H3, H4 の発現が抑制されていることが明らかになった。

本研究により、FLASH は胎児の初期発生に必要不可欠であるが ES 細胞の増殖と分化には必要ではないこと、および FLASH が細胞増殖に必須の細胞と必須ではない細胞が存在することを明らかにした。

# 第一章

## 序論

## 1-1. FAS を介するアポトーシスについて

アポトーシス (apoptosis)は自発的な細胞死機構であり、発生期における器官形成や自己を認識する免疫細胞の除去、ウイルス感染細胞や癌細胞等の異常な細胞の除去といった生命の恒常性の維持に重要な役割を担っている。そのため、生体内の細胞でアポトーシス機構に異常が生じると、自己免疫疾患、癌、ウイルス感染等の疾患が引き起こされる。

アポトーシスは、抗がん剤等の化学物質、紫外線・放射線による DNA へのダメージや熱・浸透圧・酸化によるストレス、並びに細胞膜表面受容体にリガンドが結合することによるシグナル伝達などによって引き起こされる。

我々の研究室では Fas/CD95 を介するアポトーシスのシグナル経路を中心に細胞死について研究している。Fas は米原らが発見した TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor)ファミリーに属する細胞表面受容体分子であり、そのリガンドである FasL の結合やアゴニスティックな活性を持つ抗 Fas モノクローナル抗体で刺激することによりアポトーシスを誘導する[1]。Fas は細胞外にシステインに富む繰り返し構造と細胞内に DD (Death domain)を有する。Fas の細胞外領域が刺激を受けると細胞内の DD にアダプター分子の FADD がその DD を介した DD 同士の結合で会合し、次に FADD の持つ DED (Death effector domain)を介して同様の DED を持つシステインプロテアーゼの caspase-8 (前駆体) が会合し、caspase-8 前駆体同士が近接化することによる自己切断によって活性化される (図 1)。活性化された caspase-8 は細胞内でアポトーシス実行因子である caspase-3 を切断・活性化させることによって、アポトーシスが誘導される。

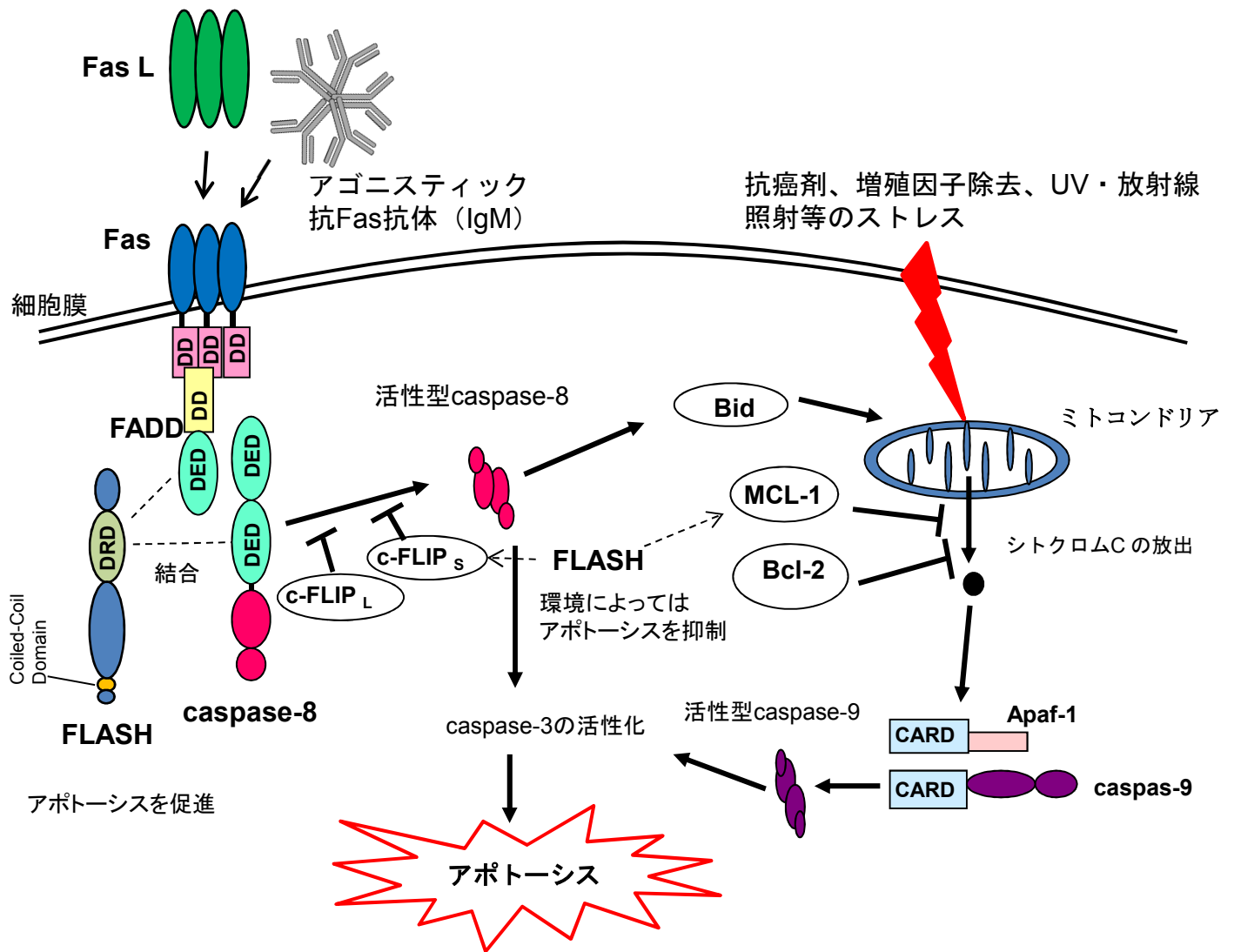


図1 細胞表面受容体Fasやストレスを介するアポトーシス誘導のシグナル伝達機構

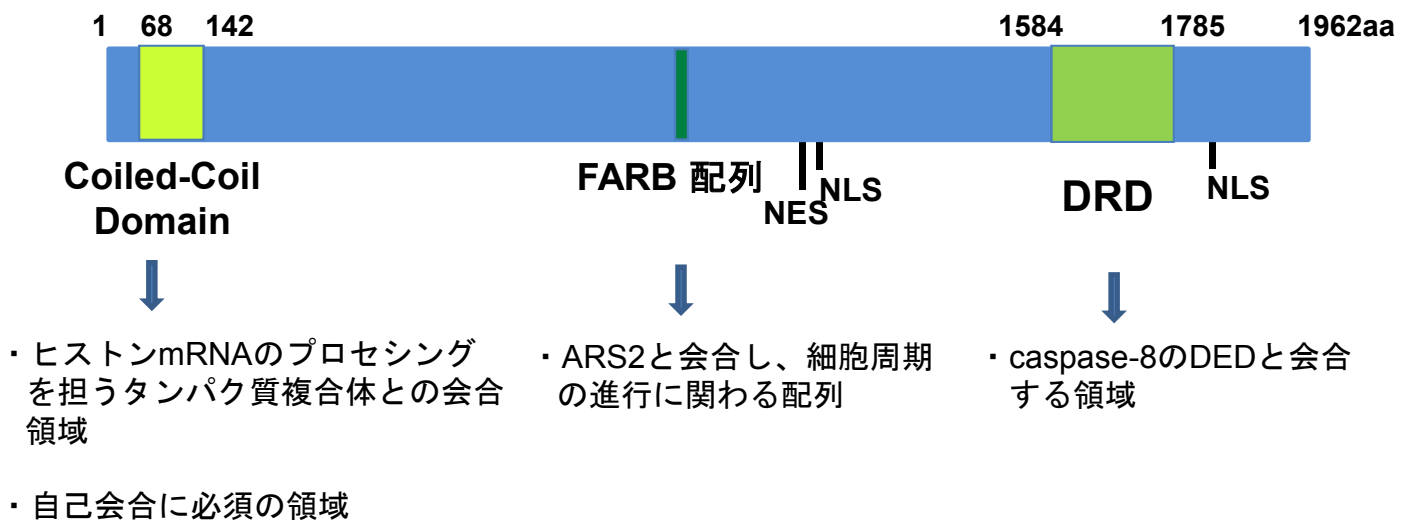
## 1-2. FLASH について

FLICE/caspase-8-associated huge protein (FLASH)/casp8ap2 は、我々の研究室において、アポトーシスのシグナル伝達に関与する分子の探索研究の中で caspase-8 に結合する分子として同定された巨大分子である[2]。具体的には、caspase-8 の DED をベイトにした yeast two-hybrid 法によりマウス T 細胞由来の cDNA 酵母発現ライブラリーから 1999 年にクローニングされた。FLASH は 1962 アミノ酸からなる分子量 220 kDa の巨大分子であり、Fas を介するアポトーシス経路を亢進する機能を持つ[2]。FLASH の構造としては、N 末端側にはコイルド・コイルドメイン、C 末端側には DED にホモロジーがあり FADD や caspase-8 の DED と結合可能な領域である DRD (DED-recruiting domain)を持つ (図 1、2A)。また、中央部分には NLS (Nuclear localization signal) と NES (Nuclear export signal) を有し、核と細胞質両方に存在することが示唆されていた。このことと相関するように、FLASH は主に核に存在しており、細胞表面の Fas が刺激を受けると FLASH が核から細胞質に移動してアポトーシスのシグナル伝達に働くことが報告された[3]。また、FLASH は N 末端にあるコイルド・コイルドメインを介して多量体化することによって細胞周期の進行に機能していることが当研究室の桐山により示された[4]。ヒト FLASH も我々の研究室でクローニングされており、1982 アミノ酸からなる 223 kDa のタンパク質であることが明らかになっている。ヒト FLASH もマウス同様にコイルド・コイルドメインや NLS, NES, DRD を持つ。FLASH はその他にも、ニワトリやショウジョウバエ[5]、アフリカツメガエル[6]にもホモログが存在することが報告されている。なお、ショウジョウバエのホモログは、N 末端領域のみが保存された分子であり、脊椎動物のホモログは分子全体が類似している。

FLASH の生理機能に関しては多くの報告がなされているが、その内容は様々であることから、FLASH は生体内の多様な現象に関与する多機能分子であると考えられる。次に、FLASH の多様な機能に関して、個々を機能別に紹介する。



## A FLASHタンパク質の一次構造



## B 細胞周期依存的ヒストンpre-mRNAのプロセッシング機構

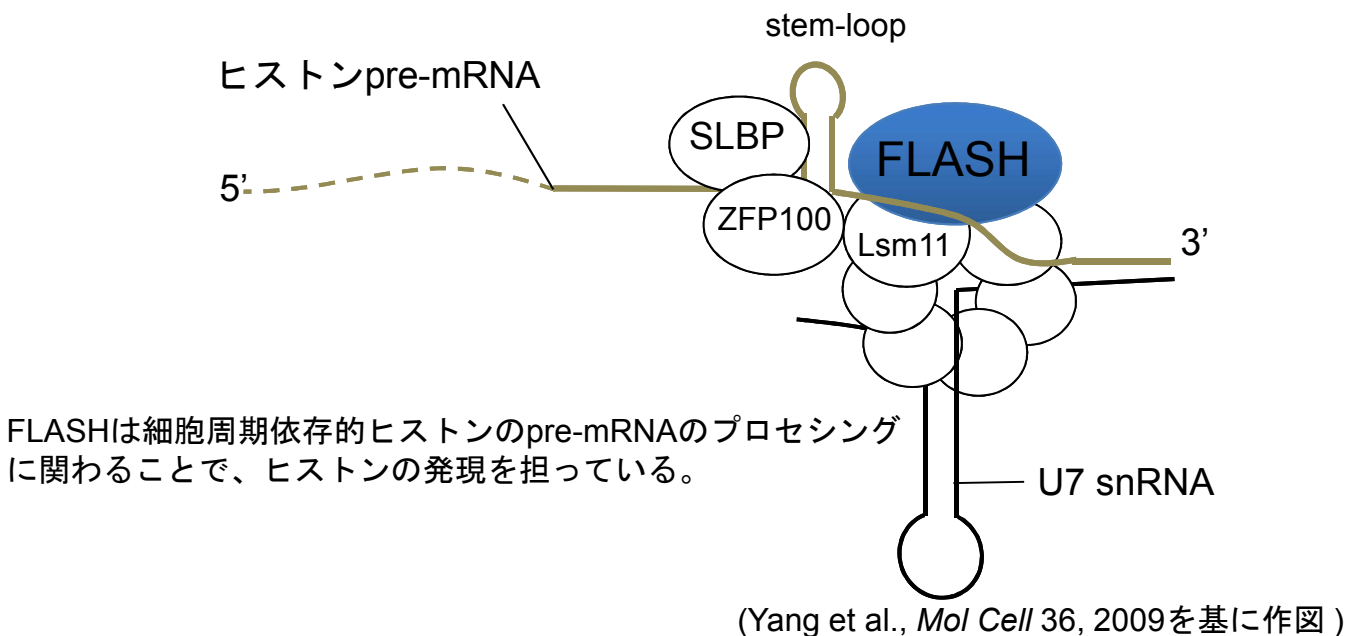


図2 FLASHタンパク質の一次構造とヒストンのpre-mRNAのプロセッシング機構

### (1) アポトーシスに関する機能

前述したように、FLASHはFasを介するアポトーシスのシグナル伝達経路で caspase-8 と結合することによりアポトーシスを促進させる分子として同定された[2]。また、この機能と関連して、FLASHは通常核内のPML-bodyやその他の核内構造体内に存在し、Fasが刺激を受けると細胞質中に移動してアポトーシス伝達シグナルを増強することが報告された[3]。一方、最近の報告によると、ある種の環境下ではFLASHはアポトーシス抑制因子のc-FLIPsやMCL-1の発現を促進してアポトーシス抑制にも機能するという[7]。図1に示すように、アポトーシスはストレス、または細胞表層レセプターを介して誘導され、FLASHは両方のアポトーシス誘導機構を制御できるということになる。纏めて考えると、FLASHは細胞のおかれた環境の違いにより、アポトーシス促進または抑制の両方に機能して、細胞生存のバランスを制御している可能性が示唆される。

### (2) 転写活性に関する機能

FLASHはTRAF2と結合することでTNF $\alpha$ により誘導される転写因子NF- $\kappa$ Bの活性化に機能し[8]、またFLASHはp160核内受容体コアクチベーターと相互作用しグルココルチコイド受容体転写活性能を阻害する[9]と報告されており、FLASHは核内で転写活性制御に関与していると考えられる。

### (3) FLASHと癌との関係

FLASHの発現が高い小児急性リンパ性白血病(ALL)患者は発現の低い患者に比べて、methotrexateやmercaptopurineなどの薬剤治療による予後が統計的に良好な傾向にあり、FLASHが診断マーカーになり得ると報告された[10]。さらに、FLASHはT細胞リンパ性リンパ腫(T-LBL)の予後にも関係しており、FLASH遺伝子を片アレルで欠いたT-LBL患者は予後が悪い[11]。また、FLASHプロモーターのメチル化状態が正常細胞とがん細胞で異なっており、FLASHプロモーター特異的にメチル化を促進させると抗が

ん剤に対する抵抗性が向上する[12]。これらの報告から、がん細胞において FLASH の発現が高いと抗がん剤で死に易くなっていると予想される。上記の報告ではがん細胞で FLASH の発現が高いと抗がん剤治療によってアポトーシスを引き起こし易いため予後が良いと考察されているが[10]、その真偽や詳細はわかっていない。

#### (4) 細胞周期の進行とヒストン発現制御に関する機能

FLASH は核内で coilin や NPAT と共局在しており、Cajal body の重要な構成因子であること[13]、また FLASH を RNAi 法で抑制すると細胞周期が S 期でアレストし、ヒストンの発現が低下すること[14,15]が報告された。しかし現在では、FLASH は Cajal body の構成成分である coilin とは一部しか会合せず、Cajal body ではなく、Histone locus body (HLB) という核内構造体の構成成分であることが明らかになっている[17]。また、細胞が UV-C 照射を受けると FLASH や coilin が分解され Cajal body と HLB が消失し、G1 期ではなく S 期でのアレストが誘導される[16]。この UV-C 照射による FLASH の分解はプロテアソームを介して引き起こされている。また最近になり FLASH によるヒストン発現制御メカニズムに関して、FLASH が細胞周期依存的ヒストン pre-mRNA の 3'UTR 領域にある stem-loop のプロセッシングを介してヒストン mRNA の成熟と発現を制御していることがショウジョウバエとほ乳類細胞を用いた研究により明らかになり、FLASH の持つ機能のうち重要なものとして注目されている[5,17] (図 2B)。さらに、当研究室の桐山は FLASH が ARS2 タンパク質と結合することで細胞周期の進行や細胞周期依存的ヒストンの発現制御を担っていることを見出し[18]、ARS2 との結合には FLASH 中央に位置する FARB (FLASH-ARS2 binding)配列と命名した 13 アミノ酸残基が必須であることを明らかにした。ARS2 を欠損したマウスは胎生 3.5 日前後の早期で致死となることが知られているが[19]、その原因が細胞周期の進行やヒストン発現の異常によるものかはわかっていない。また、ARS2 も FLASH と同様ヒストン mRNA のプロセッシングに関与する事実が報告されているが[20, 21]、そのメカニズムの詳細はまだ

明らかとなっていない。

以上のように、FLASH は様々な機能を有すると報告されているが、動物個体における生理機能は不明であった。そこで、FLASH の新たな機能を探索するため、また器官発生や免疫機構、疾患との関連性といった細胞レベルの研究では解析が難しいシステムにおける FLASH の生理機能を明らかにするため、私は FLASH 遺伝子に trapping vector が挿入された FLASH 変異マウスの解析を開始した。FLASH 変異マウスは、Lexicon Pharmaceuticals により作製された trapping vector が挿入された ES 細胞ライブラリーの中から FLASH の遺伝子に挿入されたものを選び、作製されたマウスを購入した。ヘテロ型本マウスを用いて遺伝子構造を解析した結果、FLASH 遺伝子の 790 番目のチミンと 791 番目のチミンの間にトラッピングベクターが挿入されていることがわかっている。

## 第二章

### 実験材料と実験方法

## 2-1. マウス

FLASH 変異マウスは Lexicon Pharmaceutical 社から購入したものを使用した。戻し交配には日本クレア株式会社から購入した C57/BL6J マウスを使用し、7 世代以上交配を行った。FLASH コンディショナルノックアウトマウスの作製には ICR マウス 8 細胞胚を使用し、仮親にも ICR マウスを使用した。

全てのマウスは実験に使用するまで SPF (Specific Pathogen Free)環境下で飼育した。全ての実験動物は京都大学の規定に従い実施した。

## 2-2. 細胞培養

MEF (mouse embryonic fibroblast), KB 細胞の培養用培地: DMEM に 10% FBS (SIGMA)、10000 u/ml Penicillin & 10 mg/ml Streptomycin を 1%加えた培地中で、5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。

コンディショナル KO マウス作製用 ES 細胞の培養方法: 0.1%ゼラチン溶液をプラスチックディッシュに加え 2 時間以上インキュベートしてゼラチンコートディッシュを作製した。フィーダー細胞として Neo 耐性マウス胎児線維芽細胞 (オリエンタル酵母工業 Cat.KBL9284100) または、Fas KO マウスの胎児線維芽細胞を用いマイトマイシン C (Sigma)処理後ゼラチンコートディッシュで培養した。フィーダー細胞を一晩培養後、ES 細胞 TT2 をフィーダー細胞の上に播種し ES 培地中で 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。ES 培地は、DMEM (Gibco) 404 ml に FBS 75 ml (15%)、MEM non-essential amino acid ×100(Gibco) 5 ml、55 mM β-Mercaptoethanol (Gibco) 909 μl、200 mM L-Glutamine (Gibco) 5 ml、Sodium Pyruvate ×100 (Gibco) 5 ml を加え、これをフィルター滅菌 (0.22 μm)し、使用直前に LIF (CHEMICON) を 1×10<sup>3</sup> U/ml になるように加えた。この実験に用いた ES 細胞株 TT2 は影山龍一郎先生から頂いた。

*In vitro* 実験に用いる ES 細胞の培養：ゼラチンコートディッシュ内、フィーダー細胞上で培養した。培養液は、DMEM (Gibco) 404 ml に FBS 5 ml (1%)、KSR (Invitrogen) 50 ml (10%)、MEM non-essential amino acid ×100 (Gibco) 5 ml、55 mM β-Mercaptoethanol 909 μl、200 mM L-Glutamine (Gibco) 5 ml、Sodium Pyruvate ×100 (Gibco) 5 ml を加え、使用直前に LIF (CHEMICON) を  $1 \times 10^3$  U/ml になるように加えた。この解析に用いた ES 細胞株 TT2 は眞貝洋一先生から頂いた。

### 2-3. ゲノム DNA の回収

0.3 cm 程度に切断したマウス尻尾、採取したマウス胎児の一部や、ES 細胞を Lysis Buffer (5 M NaCl, 0.5 M EDTA, 1M Tris-HCl (PH 8.0), 10% SDS)700 μl に浸し 10 mg/ml Protease K を 30 μl 加え一晩 55 °C で振とうし、フェノール抽出、フェノールクロロホルム抽出した後エタノール沈殿を行い TE 150 μl に溶解させ、4°C で保存した。着床前のマウス初期胚には、Lysis Buffer に Protease K を終濃度 1 mg/ml になるように加え、さらに水で 3 倍希釈して使用した。チューブに 3 μl の Lysis Buffer と初期胚 1 つを入れ、55 °C で 3 時間振とうした。初期胚ではフェノール抽出は行わず、この溶液をテンプレートにして genotyping を実施するための PCR 解析を行った。

### 2-4. プライマーとして使用する合成オリゴヌクレオチド

本研究で使用した合成オリゴヌクレオチドは全て Invitrogen 株式会社に依頼して作製されたものを購入した。

### 2-5. FLASH 変異マウスの genotyping

FLASH 変異マウスの遺伝子型（野生型、ホモ接合型、ヘテロ接合型）の判定は、尻

尾または胎児から回収したゲノム DNA をテンプレートにした PCR 解析により行った。Trapping Vector が挿入されている変異型アレルを検出するプライマーの組み合わせは Sense Primer : Primer1, Antisense Primer : Primer2、Trapping Vector が挿入されていない野生型アレルを検出するプライマーの組み合わせは Sense Primer : Primer1, Antisense Primer : Primer4 であり、それぞれ 808 bp、1486 bp の DNA 断片を増幅するように設計した。

Primer1 : 5'-GGCGATCAGTGACAGGGGCAGTTTCC-3'

Primer2 : 5'-TGTTGTGCCCAGTCATAGCCGAAT-3'

Primer4 : 5'-AGCTTTGAAAAGGCCAGTCCCTAGCACCA-3'

着床前初期胚の遺伝子型判定においては、テンプレート DNA が微量であるため、3 つのプライマーを混ぜて一度に PCR 解析を行った。PCR の組成と条件を以下に示す。

Genotyping用PCR組成		受精胚のGenotyping用PCR組成	
10 × Buffer	3 μl	10 × Buffer	3 μl
dNTPs (2.5 mM each)	3 μl	dNTPs (2.5 mM each)	3 μl
MgCl <sub>2</sub>	1.8 μl	MgCl <sub>2</sub>	1.8 μl
Template DNA	1 μl	Template DNA	1 μl
DMSO	1 μl	DMSO	1 μl
Primer Fw	0.6 μl	Primer 1	1.2 μl
Primer Rv	0.6 μl	Primer 2	0.6 μl
rTaq	0.1 μl	Primer 4	0.6 μl
water	18.9 μl	rTaq	0.1 μl
Total	30 μl	water	18.9 μl
		Total	30 μl

PCR条件		
	94 °C	5 min
5 cycle	94 °C	30 sec
	65 °C	30 sec
	72 °C	1 min 30 sec
30 cycle	94 °C	30 sec
	60 °C	30 sec
	72 °C	1 min 30 sec
	72 °C	5 min



アニーリング温度は用いるプライマーセットの Tm 値に合わせて 58 °C から 65 °C の範囲で適当な温度を採用した。

## 2-6. RNA の回収方法

摘出したマウスの各臓器や、培養細胞からの RNA 回収は ISOGEN (Nippongene) を用いて行った。マウス臓器からの場合、まずホモジナイザーを用いてホモジナイゼーションした後、18 G ニードル (TERUMO) に数回通しさらに細かく粉碎してから ISOGEN を用いて RNA を回収した。回収の操作は ISOGEN に添付されているプロトコールに従った。回収した RNA は DEPC 処理水に溶解し -80 °C で保存した。

## 2-7. RT-PCR

逆転写反応は ThermoScript™ (Invitrogen) を用い、添付プロトコールに従って行った。テンプレート RNA は各反応に 1 µg ずつ使用した。マウス初期胚に関しては、RNA 量は定量せず Lysis した液をそのまま RT-PCR 解析に用いた。逆転写産物から標的 mRNA を検出するための PCR に用いたプライマー配列を以下に示す。

Wt FLASH Fw: 5'-CCGTGTCTCCCAAGTCCCTACTG-3',

Wt FLASH Rv: 5'-TCTCCAACCCTGGTAAGGAGAACGTG-3

Mut FLASH Fw: 5'-CCTTCCAAGTCCTGGCATCTCACGA-3'

Mut FLASH Rv: 5'-TCTCCAACCCTGGTAAGGAGAACGTG-3

Gata6 Fw: 5'-GCAATGCATGCGGTCTCTACAG-3'

Gata6 Rv : 5'-ATAGCAAGTGGTTCGAGGCACC-3'

Oct3/4 Fw: 5'-AAGCGAACTAGCATTGAGAACC-3'

Oct3/4	Rv:	5'-AAGGTGTCCCTGTAGCCTCATA-3'
Brachyury	Fv:	5'-GAACCTCGGATTCACATCGT-3'
Brachyury	Rv:	5'-TTCTTTGGCATCAAGGAAGG-3'
Eomeso	Fw:	5'-CCTGGTGGTGTGTTTGTGTTG-3'
Eomeso	Rv:	5'-TTTAATAGCACCGGGCACTC-3'
Hand1	Fw:	5'-CCCCTCTTCCGTCCTCTTAC-3'
Hand1	Rv:	5'-CTGCGAGTGGTCACACTGAT-3'
PI-1	Fw:	5'-CCCTGTGTCATACTGCTTCCATC-3'
PI-1	Rv:	5'-AACTCGGCACCTCAAGACTTTG-3'
GAPDH	Fw:	5'-GATGACATCAAGAAGGTGGTGA-3'
GAPDH	Rv:	5'-TGCTGTAGCCGTATTCATTGTC-3'

## 2-8. qRT-PCR

qRT-PCR 解析に先立ち、mRNA から DNA への逆転写反応を行ったが、逆転写プライマーが oligo dT 又はランダムヘキサマーを用いる時は ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO)、下記の標的遺伝子(mouse histone H3, H4)特異的プライマーを用いる時は Thermo Script RT-PCR system (Invitrogen)を用いて逆転写反応を行い、THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO)を用いて qRT-PCR 反応を実施し、ABI PRISM7500 (Applied Biosystems)を用いて測定を行った。

Mouse histone H3 特異的逆転写プライマー : 5'-AGCTCGGTCGACTTCTGGTAG-3'

Mouse histone H4 特異的逆転写プライマー : 5'-GTTCTCCAGGAACACCTTCAG-3'

各遺伝子の発現量を解析するためのプライマー配列を以下に示す。

Mouse Histone H3 (common)	Fw:	5'-ATGGCTCGTACTAAGCAGACC-3'
Mouse Histone H3 (common)	Rv:	5'-AGGTTGGTGTCCCTCAAACAG-3'
Mouse Histone H4 (common)	Fw:	5'-GGAGTGAAGCGCATCTCCGG-3'
Mouse Histone H4 (common)	Rv:	5'-CTGGCGCTTGAGCGCGTAGA-3'
Mouse FLASH	Fw:	5'-TGATGAAGGCTCATTGGACA-3'
Mouse FLASH	Rv:	5'-ATTGTACGTTGCCTCCTTCG-3'
Mouse GAPDH	Fw:	5'-GATGACATCAAGAAGGTGGTGA-3'
Mouse GAPDH	Rv:	5'-TGCTGTAGCCGTATTCATTGTC-3'
Flk-1	Fw:	5'-CTGTGGCGTTTCCTACTCCT-3'
Flk-1	Rv:	5'-AGGAGCAAGCTGCATCATTT-3'
PECAM	Fw:	5'-AGAGACGGTCTTGTGCGCAGT-3'
PECAM	Rv:	5'-TACTGGGCTTCGAGAGCATT-3'
VE-cadherin	Fw:	5'-CAATTCTTCCGAATAACCAAGC-3'
VE-cadherin	Rv:	5'-GCACAATGGACTCTTCCCTAC-3'

## 2-9. マウス受精卵の回収、培養

FLASH<sup>mut/+</sup>雌マウスに PMS (Pregnant Mare Serum) (Asuka Pharmaceuticals)10 IU (international unit)を腹腔内投与し、48 時間後に HCG (Human Chorionic Gonadotrophin) (Asuka Pharmaceuticals)10 IU を腹腔内投与した後、FLASH<sup>mut/+</sup>雄マウスと同ケージに入れ交配を行った。翌日にプラグを確認したマウスを受精後 0.5 日とした。受精後 3.5 日目に卵管と子宮を摘出し、顕微鏡下に KSOM (Chemicon)培地をガラス管を用いて流し込み受精卵を洗い流して回収した。回収した受精卵はゼラチンでコートされた 24 穴

プレートに1個/wellで移し、LIFを含まない2-2に記載したES培地中で培養した。

## 2-10. プラスミド

pCAG-MCM-IPは眞貝洋一先生から頂いた。pCAG-Cdx2ER-IPは丹羽仁史先生から頂いた。

## 2-11. 強制発現ベクター作製

各強制発現ベクターの作製には、各種制限酵素 (TOYOBO, TAKARA または NEB.)、KOD-Plus- (TOYOBO)、Ligation high Kit (TOYOBO)、Blunting high Kit (TOYOBO)等を使用した。また、全てのコンストラクトは大腸菌株 XL-1Blue に導入して増やした後に、Plasmid DNA Purification Kit (MACHEREY-NAGEL)を用いて精製し、TEに溶解して-30°Cで保存した。

## 2-12. 抗生物質

目的の遺伝子を発現している大腸菌または培養細胞を選択するために、下記の抗生物質を使用した。

大腸菌に用いた抗生物質：アンピシリン (MEIJI)、カナマイシン、クロラムフェニコール (Wako)、ゼオシン (Invitrogen)

培養細胞に用いた抗生物質：G418 硫酸塩 (ナカライ)、ピューロマイシン (ナカライ)

## 2-13. Conditional targeting vector、Second targeting vector 作製

Conditional targeting vector や Second targeting vector は BAC を利用した Red

system により作製した[22]。プロトコールは大阪大学大学院医学系研究科 遊佐宏介先生が作製したものを使用した。また、Red system を用いてベクターを作製するために必要な材料、大腸菌株 EL350 や各種プラスミド (p23loxZeo、 p24loxZeo、 pPE7neoW-F2LR、 PL452、 pMCS-DTA)は京都大学ウイルス研究所 眞貝洋一先生から頂いた。尚、ターゲティングベクター作製方法の詳細は南田佳孝修士論文に記載した。

#### 2-14. 細胞への遺伝子導入

培養細胞への遺伝子導入は、LipofectaminePlus<sup>TM</sup> Reagent (Invitrogen)または Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 Reagent (Invitrogen)を用い、それぞれのプロトコールに従って実行した。また、ES 細胞への遺伝子導入は、Gene pulser<sup>TM</sup> (Bio RAD)を用いたエレクトロポレーション法で行った。Gene targeting 実験では 0.3 KV、75 mF の条件で 2 回、遺伝子の一時的発現実験では 0.25 KV、500 mF の条件で 1 回の電気刺激を行った。

#### 2-15. Gene targeting

ES 細胞を PBS で 5 倍希釈したトリプシン溶液 (Nakarai) で 5 分間処理し、PBS 10 ml に懸濁した。1200 rpm、5 min の条件で遠心して回収した  $2 \times 10^7$  個の細胞を PBS 550  $\mu$ l に懸濁し、500  $\mu$ l を 0.4 cm キュベット (Bio-Rad)に移し、直鎖化した Conditional targeting vector 又は Second targeting vector 10  $\mu$ g 加え氷上で 10 分間放置した。残りの細胞 50  $\mu$ l はそのまま 15 ml チューブに移し氷上で放置した。Vector を加えた細胞をピペティング後、0.3 KV、75 mF のエレクトロポレーションを 2 回行い、すぐに氷上に置き 5 min 放置した後、ES 培地 10 ml 入り 15 ml チューブに移した。室温で 10 分間放置した後、よくピペティングし、フィーダー細胞を敷いた 10 枚の 10 cm dish に 1 ml ずつ播種した。1 枚の 10 cm dish には vector を加えずに残しておいた ES 細胞 50

μl をネガティブコントロールとして播種した。一晩培養し、翌日全て dish の培地を 300 μg/ml の G418 を含む ES 培地に交換した。コロニーが形成されるまで毎日、培養液を G418 入り ES 培地で交換し、約 7 日後にコロニーを肉眼で視認しピックアップした。

## 2-16. サザンハイブリダイゼーション解析

ES 細胞より回収したゲノム DNA 10 μg を 100 U の各種制限酵素と一晩反応させた。エタノール沈殿を行い、沈殿した DNA を 20 μl の TE に溶解させ、0.5×TBE アガロースゲルを用い 35 V の電圧で一晩電気泳動した。泳動後、アガロースゲルを 0.25 N HCl に 20 min 浸し、振とうした。蒸留水ですすぎ、0.5 N NaOH, 1.5 M NaCl 溶液で 45 min 振とうした後、3 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl 溶液で 45 min 振とうし、アガロースゲルから Hybond-N+メンブレン (Amersham) に 20×SSC を用いて一晩トランスファーを行った。翌日、メンブレンを 2×SSC に浸し、5 min 自然乾燥させた後、UV クロスリンカー (フナコシ) を用いて、120,000 mJ の UV でクロスリンクした。プローブは、PCR により作製した DNA 断片を Random Primer DNA Labeling kit Ver.2 (TAKARA) を用い α-<sup>32</sup>P[XTP] によって標識し、使用した。標識プローブの精製には、ProbeQuantTMG-50 Micro Columns (GE Healthcare) を使用した。プローブの放射活性をシンチレーションカウンターで計測し、2×10<sup>6</sup> cpm/ml になるように Rapid-hyb Buffer (GE Healthcare) で希釈し、65 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。洗浄は、2×SSC-0.1 % SDS で室温、1 時間、さらに 0.1×SSC-0.1 % SDS で 68 °C、30 分×2 回行った。検出には BAS2500 (富士フイルム) を使用した。

図 7 で使用したプローブ 1 を作製するプライマーは

5'-GCAGCCTCTCCACTTAAAAATAATG-3' と

5'-GCATCTACTTCAAAGGGTTGTTAC-3' のセットである。

図 7 で使用したプローブ 2 を作製するプライマーは

5'-CCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGG-3'と

5'-CCAACGCTATGTCCTGATAGCGGT-3'のセットである。

## 2-17. ウェスタンブロッティング解析

細胞を PBS で洗浄後、Protease inhibitor cocktail (Roche Molecular Biochemicals)を加えた RIPA Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、150 mM NaCl、1 mM EDTA、1 % NP-40、0.5 % Sodium deoxycholate)で溶解した。可溶化分画を sample buffer (62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8)、2 % SDS、10 % Glycerol)に溶解し、94 °Cで 5 分間熱処理をしたものをサンプルとした。このサンプルを SDS-PAGE 法により展開した。セパレーションゲルのアクリルアミド濃度は、FLASH には 5 %、その他のタンパク質には 10 %を用いた。SDS-PAGE で展開したサンプルを、Trans-Blot SD (Bio-Rad)を用いて Immobilon™ Transfer Membrane (Millipore)に転写した。転写したメンブレンを 5 %スキムミルク溶液 (5 %スキムミルクを含む 0.1 % Tween20 TBS (TBST))中で室温、1 時間インキュベートしてブロッキングを実施した後、5 %スキムミルクに 1 次抗体を加え 4 °Cで一晩または室温で 1 時間反応させた。反応後、TBST で 5 分間 3 回洗浄した後、一次抗体に反応する HRP 標識二次抗体を TBST に加えて室温で 1 時間反応させた。これを TBST で 5 分間、3 回洗浄した後、Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore)で HRP を発光させ、ルミノイメージアナライザーLAS3000 (富士フイルム)で検出を行った。検出後のメンブレンは CBB 染色液 (0.25 % Coomassie Brilliant Blue、40 % methanol、7 % acetic acid)に浸して染色し、Destaining Solution で洗浄してバックグラウンドを洗い落とした後、乾燥させ保存した。

## 2-18. ターゲティッド ES 細胞クローンにおける FRT または loxP 配列の組み換え誘導

アデノウイルス感染： $3 \times 10^4$  個の ES 細胞クローンを 2 ml の ES 培地に懸濁して 15 ml チューブに移し、37 °C、5 %CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 4 時間放置した。この間、チューブのフタを若干緩めておいた。その後、遠心して培地を除き、100  $\mu$ l の ES 培地を加えて懸濁し、Flp または Cre を発現するアデノウイルス粒子 (Adeno-Flp は 700  $\mu$ l、Adeno-Cre は 400  $\mu$ l) を加えた。チューブをタッピング後、37°C、5 % CO<sub>2</sub> インキュベーター内に 1 時間置いた。この間、チューブのフタを緩めておき、20 分ごとに計 3 回タッピングした。ES 培地を計 6 ml になるように加え懸濁後、あらかじめゼラチンコートし、フィーダー細胞を播種しておいた 6well plate の各 well に 300  $\mu$ l、100  $\mu$ l、50  $\mu$ l ずつ播種した。数日培養後、形成されたコロニーをピックアップした。使用したアデノウイルスベクターは眞貝洋一先生から頂いた。

エレクトロポレーション： $1 \times 10^6$  個の ES 細胞を 500  $\mu$ l の PBS に懸濁し、滅菌水に溶かした pIC-Cre, or PGK-Flpo ベクターを 10~30  $\mu$ g 加え、エレクトロポレーションを行った後、10 cm dish に播種し、翌日に培地を交換した。さらに翌日、トリプシン処理し、500 cells/dish, 300 cells/dish, 100 cells/dish で 6 cm dish に播種した。5~7 日間培養後、シングルコロニーをピックアップし、遺伝子導入細胞のクローニングを行った。

## 2-19. Mer-Cre-Mer 恒常発現 ES 細胞の樹立

Mer-Cre-Mer とは、レコンビネース Cre の N 末端と C 末端の両側にマウスエストロゲン受容体  $\alpha$  (E $\alpha$ ) のリガンド結合領域 (Mer) を融合させたタンパク質で、エストロゲンのアナログである 4-OHT の処理によって、Cre の酵素活性が誘導できる。ES 細胞に Mer-Cre-Mer の発現ベクターである pCAG-Mer-Cre-Mer-IRES-Puro<sup>r</sup> を Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 を用いて導入し、48 時間後からピューロマイシン 1  $\mu$ g/ml 入り ES 培地で培養することにより Mer-Cre-Mer 遺伝子導入細胞をセレクションした。ピューロマイシンによる選択時はピューロマイシン耐性遺伝子が導入された線維芽細胞株



をフィーダー細胞として用いた。セレクション後、シングルコロニーをピックアップし、抗ER $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロット解析によってMer-Cre-Merが発現しているESクローンを選択した。

図7で使用した、4-OHT 添加による loxP 配列の組み換えを検出する PCR プライマーの配列は以下のとおりである。

Primer 7: 5'-GCTATACGAAGTTATTAGGTCCTC-3'

Primer8: 5'-ACTCCGCGGCCACCATTAGAATAGCTTCAACT-3'

Primer9: 5'-AGTGGTACCTGAACTCGAGTCATCAGGCTTGCA-3'

Primer10: 5'-GATCCGCGGGCTACATAGTAAGACCCTGTCTC-3'

## 2-20. ターゲティッド ES 細胞クローンのマウス初期胚へのマイクロインジェクション

マウス初期胚へのマイクロインジェクションは京都大学ウイルス研究所マウス作製支援チームに依頼した。ES 細胞クローンは、継代後 2 日目の対数増殖期にあるものを  $1 \times 10^6$  cells/ml の濃度になるように 2 ml の ES 培地に懸濁し、15 ml チューブに移し、氷上に置き提出した。

## 2-21. Embryoid body 形成

Embryoid body 形成は hanging drop 法を用いて行った。ES 細胞をトリプシン処理によってディッシュから剥離し、フィーダー細胞を除去した後、MEF 用培地に懸濁し、 $1 \times 10^4$  cells の ES 細胞を含んだ 25  $\mu$ l のドロップを dish の蓋の裏面に並べ、乾燥を防ぐために PBS を加えた 10 cm dish の上にかぶせた。この状態で 5 % CO $_2$ 、37°C の条

件下で 2 日間培養し、形成した Embryoid body をポリスチレン製大腸菌培養用 dish に移し、2-2 に記載の LIF を含まない ES 培地で 5% CO<sub>2</sub>、37°C の条件下で培養した。

## 2-22. ES 細胞数の計測

ゼラチンでコートした 12 穴 plate にフィーダー細胞を播種して一晩培養した後、マイトマイシン C 処理を行った。マイトマイシン C を洗浄除去後、フィーダー細胞の上から  $2 \times 10^5$  個の ES 細胞を播種し、2 日ごとにトリプシン処理によって剥離した後にヘモサイトメーターを用いて細胞数を計測した。計測後に ES 細胞は新しい well に  $2 \times 10^5$  cells/穴で播種し、二日後に細胞数を計測した。増殖曲線は、全ての細胞を継代したと仮定した場合の全細胞数に換算して作製した。

## 2-23. 栄養芽細胞 (trophoblast) 分化誘導

転写因子 Cdx-2 に ER (エストロゲンレセプター) を融合したタンパクを発現させるベクター (pCAG-Cdx-2 ER-IRES-Puro<sup>r</sup>) を Lipofectamine<sup>TM</sup> 2000 を用いて ES 細胞に導入し、1 μg/ml のピューロマイシンを用いて遺伝子導入細胞をセレクションした。5~7 日後ピューロマイシン耐性のコロニーをピックアップし、 $3 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup> の濃度でゼラチンコート dish に播種し、10% FSC を含む DMEM 培地に 4-OHT を 1 μM で添加して 8 日間培養することによって、ES 細胞から栄養芽細胞へ分化誘導させた。

## 2-24. 神経分化誘導

ES 細胞の神経分化誘導は SDIA (stromal cell-derived inducing activity) 法にて行った。PA6 ストローマ細胞をスライドチャンバーにコンフルエントになるよう播種して一日培養した後、その上に 1 cm<sup>2</sup> あたり  $1.0 \times 10^3$  個の ES 細胞を播種した。

培養は分化培地 (GMEM (Gibco), 10 % KSR (Gibco), 0.1 mM non-essential amino acids (Gibco), 1 mM Sodium Pyruvate (Sigma), 0.1 mM 2-mercaptoethanol (WAKO)) を用いて行い、2日ごとに培地交換を行いながら10日間培養した。神経分化の程度は抗 Tuj-1 抗体 (COVANCE)を用いた免疫染色により解析した。

## 2-25. 抗体

ウエスタンブロッティング解析には、抗ヒト FLASH 抗体: : 当研究室で作製したマウスモノクローナル抗体 P-1-2 (1000 倍希釈)、抗 FLASH ポリクローナル抗体 (1000 倍希釈、Santa Cruz)、抗ヒストン H3 抗体 : (1000 倍希釈、Biolegend)、抗 ER $\alpha$ 抗体 : (1000 倍希釈、Santa Cruz)、抗アクチン抗体 : (5000 倍希釈、Chemicon)を使用した。二次抗体として HRP 標識ヤギ抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen)、HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Invitrogen)を用いた。

免疫染色には、一次抗体として抗 Tuj-1 抗体(Santa Cruz), 二次抗体として Alexa488 標識抗マウス IgG 抗体 (Invitrogen)を用いた。

## 2-26. KB 細胞における FLASH の発現抑制誘導

当研究室桐山により作製された Tet-on shFLASH KB 細胞[18]を 1 $\mu$ g/ml Dox 含有 DMEM 10 % FCS 培地に添加して培養し、FLASH に対する shRNA (shFLASH)の発現を誘導することによって、FLASH タンパク質の発現抑制を誘導した。

## 第三章

## 結果

### 3-1. FLASH 変異マウスのゲノム構造解析

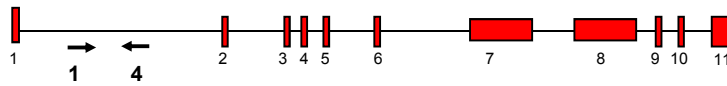
FLASH の動物個体における生理機能を解析するため、FLASH 変異マウスの解析を行った。本マウスはFLASH 遺伝子の 790 番目のチミンと 791 番目のチミンの間に trapping vector が挿入されている (図 3A)。ジェノタイピングに関しては、プライマー 1 とプライマー 2 の組み合わせを用いた PCR により trapping vector が挿入されたアレルを、プライマー 1 とプライマー 4 の組み合わせを用いた PCR により野生型アレルをそれぞれ検出でき、個々のマウス遺伝子型が野生型 (FLASH<sup>+/+</sup>)、ヘテロ型 (FLASH<sup>mut/+</sup>)、あるいはホモ型 (FLASH<sup>mut/mut</sup>)なのかを判別することができる (図 3B)。また、Trapping vector 内に設計したプローブを用いたサザンブロット解析を行った結果、ヘテロ型 FLASH 変異マウスのゲノムでのみ目的の大きさである約 3000 bp 付近にバンドが 1 本のみ検出された (図 3C)。このことから、本 FLASH 変異マウスはゲノム上のエクソン 1 と 2 の間の位置に 1 コピーの trapping vector が挿入されていることが確認できた。

### 3-2. 変異型 FLASH は精巣でのみ発現している

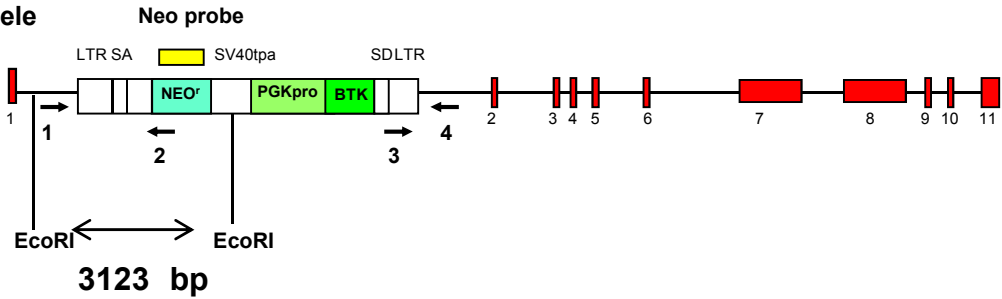
FLASH 変異型アレルからは FLASH プロモーター支配下で FLASH の exon1 (UTR) とネオマイシン耐性遺伝子が融合した mRNA が転写され、かつ PGK プロモーター支配下で BTK 遺伝子の一部と FLASH の exon2-exon11 が融合した mRNA が転写されると予想された (図 4A)。そこで、BTK 遺伝子と FLASH の exon2 にプライマーを設計し、ヘテロ型 FLASH 変異マウス (FLASH<sup>mut/+</sup>)の様々な臓器や MEF (Mouse embryonic fibroblast)から変異型 FLASH mRNA の検出を試みた。その結果、意外なことに野生型 FLASH mRNA はすべての臓器で発現しているのに対し、変異型 FLASH mRNA は精巣でしか検出されなかった (図 4B)。本実験は独立して 3 匹の FLASH<sup>mut/+</sup>マウスの各臓器から RNA を回収して行い、再現よく同様の結果が得られた。この結果から、FLASH 変異型アレルからは精巣以外では FLASH が発現していないと考えられた。

A

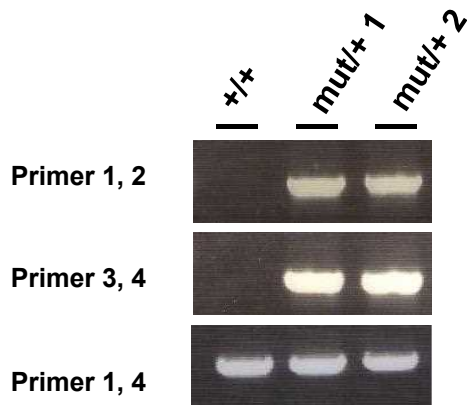
FLASH 野生型 allele



FLASH 変異型 allele



B



C

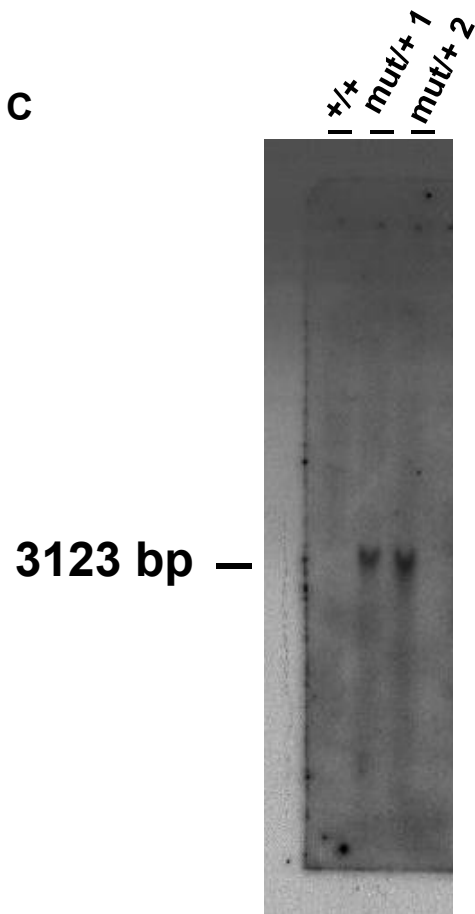
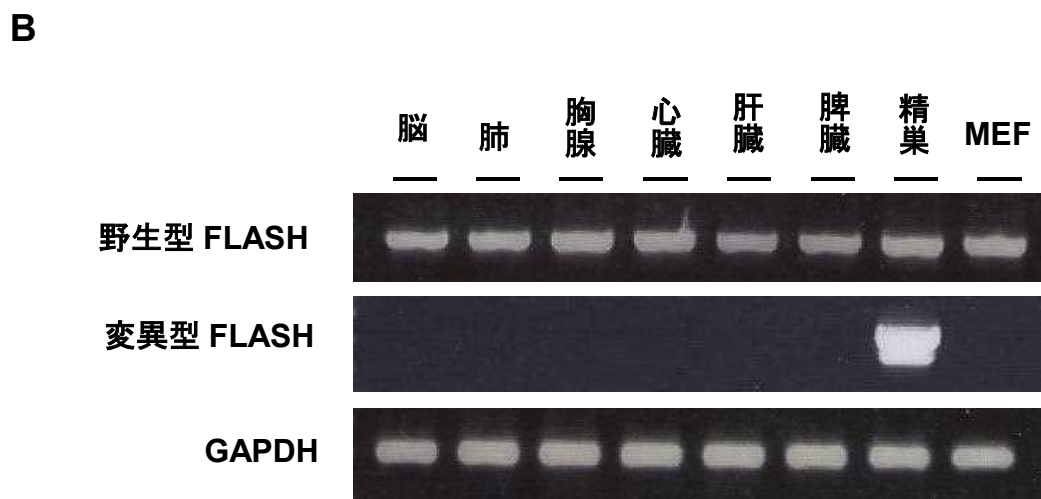
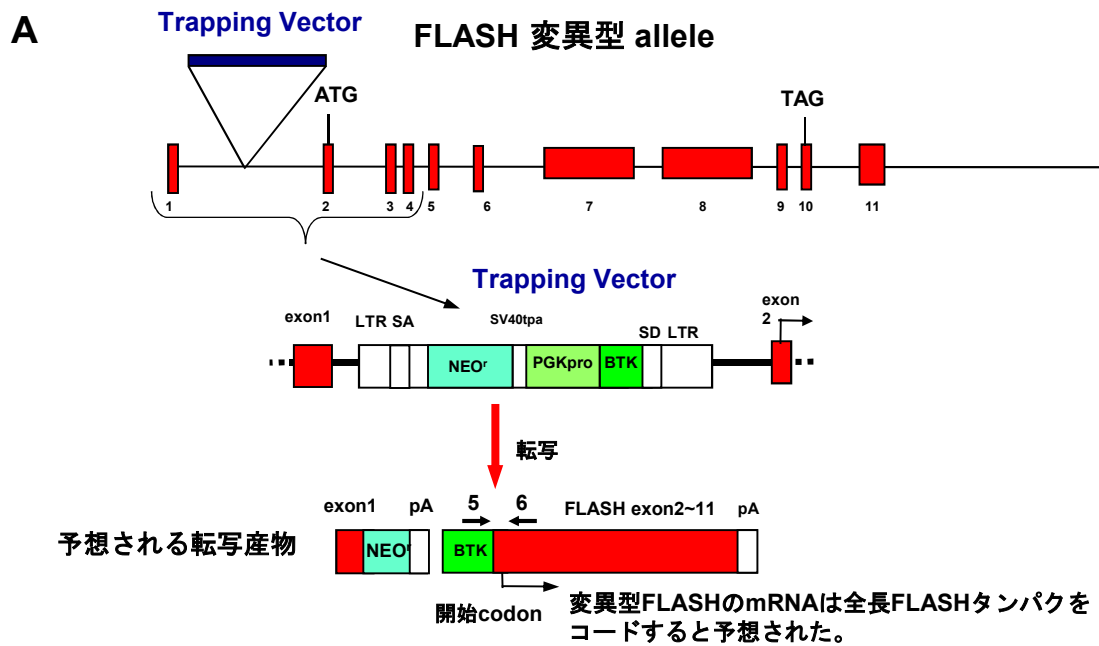


図3 FLASH 変異マウスのゲノム構造と検出

(A) 野生型FLASHとtrapping vectorが挿入された変異型FLASHのゲノム構造を模式的に示す。矢印1~4はgenotyping用プライマー、黄色boxはサザンブロット用プローブ、Neo<sup>r</sup>はネオマイシン耐性遺伝子、SAはsplicing acceptorサイト、SDはsplicing donorサイト、赤色boxと数字はexonとその番号を示す。

(B) PCR解析によるgenotyping

(c) サザンブロット解析



**図4 変異型FLASH mRNAは精巣でのみ発現している**

(A) FLASH変異型アレルから転写されると予想される変異型FLASHの構造を示す。FLASH変異型アレルからはPGKプロモーター支配下にBTK遺伝子の一部とFLASH exon2~11の融合mRNAが転写されると考えられる。矢印5, 6は変異型FLASH mRNAを検出するプライマーを示す。

(B) 各臓器とMEFmRNAのRT-PCR解析

そこで次に、FLASH の発現量を調べるため野生型 (wt) とヘテロ型 (mut/+) の MEF を用いて q-RT-PCR とウエスタンブロット解析を行った。その結果、予想どおり wt に対して mut/+ では mRNA, タンパクともに発現が約半分に低下しており FLASH 変異型アレルからは FLASH が発現していないことが確認された (図 5)。

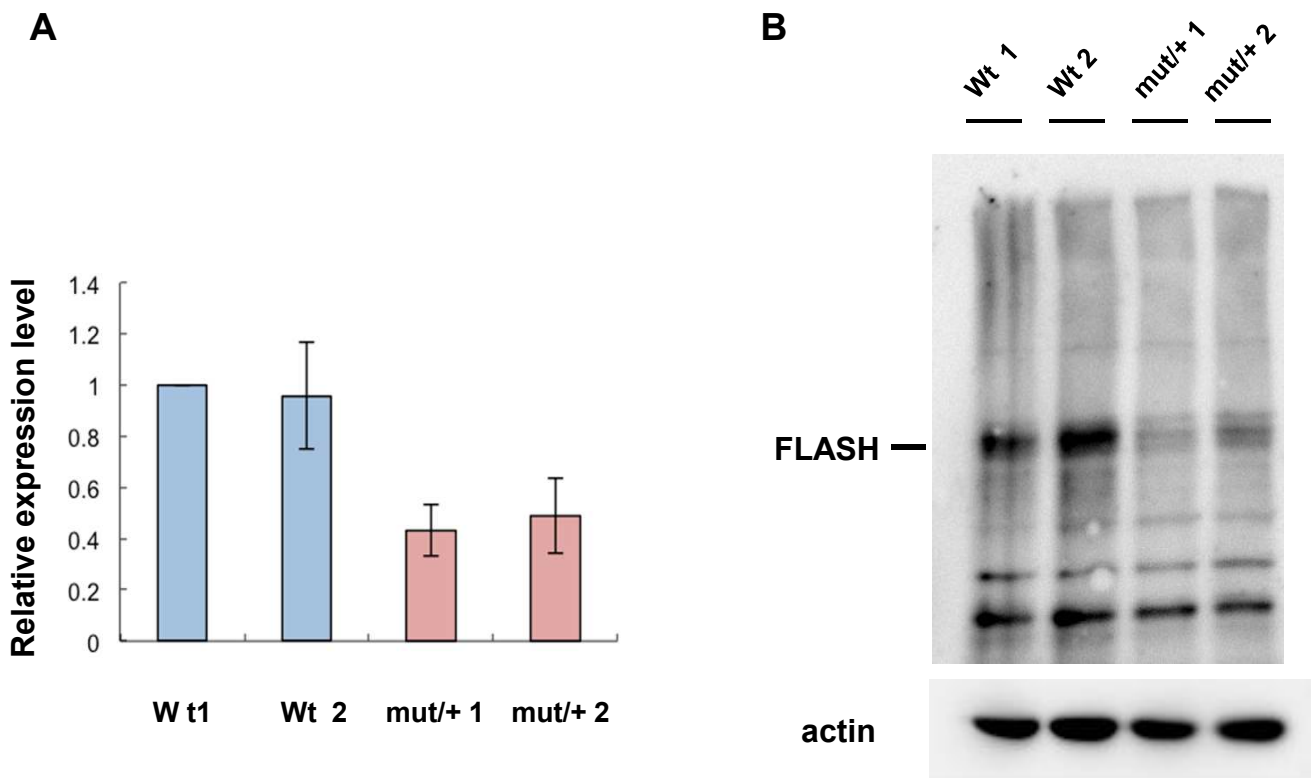
### 3-3. ホモ型 FLASH 変異マウスは発生初期で死滅する

FLASH<sup>mut/+</sup> マウスの雌雄を交配し、ホモ型 FLASH 変異マウスの作製を試みた。その結果、ホモ型 (FLASH<sup>mut/mut</sup>) マウスは生後のマウスからも、胎生 14.5~8.5 日の胎児からも検出されなかった。これらの仔マウスや胎児マウスでは、遺伝子型が wt と mut/+ のマウス数が約 1 : 2 になっており、FLASH<sup>mut/mut</sup> マウスがもっと早期に死亡したと仮定した場合のメンデル則に従っていた (表 1)。そこで、胎生 3.5 日目の受精胚を卵管から摘出して genotyping を行った。その結果、メンデル則に近い割合で FLASH<sup>mut/mut</sup> 胚が検出されたため、ホモ型 FLASH 変異マウスは FLASH が欠損したため胎生 3.5~8.5 日の間で死亡することが明らかになった。

### 3-4. ホモ型 FLASH 変異胚は透明帯からハッチングできず、ゼラチンコート dish に接着できない

FLASH<sup>mut/mu</sup> が早期に死亡する原因を調べるため、胎生 3.5 日目の受精胚を卵管から採取し、ゼラチンコート dish で培養した。尚、本実験では受精胚の数を多く確保する必要があるため、卵管から受精胚を回収する方法と平行して、FLASH<sup>mut/+</sup> の雌に排卵誘発剤を投与して多数の卵子を回収し、FLASH<sup>mut/+</sup> の雄から回収した精子を添加して受精胚を得る体外受精 (IVF; in vitro fertilization) も行った。FLASH<sup>mut/mut</sup> マウス受精胚は胎生 3.5 日目の胚盤胞 (blastocyst) までは異常が認められなかった。FLASH<sup>+/+</sup> (Wt) や





**図5 MEFにおいて、FLASH変異型アレルからはFLASHが発現していない**

(A) FLASH Wtとmut/+のMEFから調製したmRNAのqRT-PCR解析。 内部コントロールにはGAPDHを用いた。

(B) FLASH Wtとmut/+のMEFから調製したタンパク質の抗FLASHモノクローナル抗体を用いたウエスタンブロット解析。  
内部コントロールとしてactinを用いた。

発生段階	Wt	mut/+	mut/mut	合計	ND
出生後	29	63	0	92	0
E14.5	5	10	0	15	7
E13.5	5	10	0	15	2
E11.5	4	8	0	12	6
E9.5	5	11	0	16	4
E8.5	5	8	0	13	5
E3.5	11	17	7	35	0

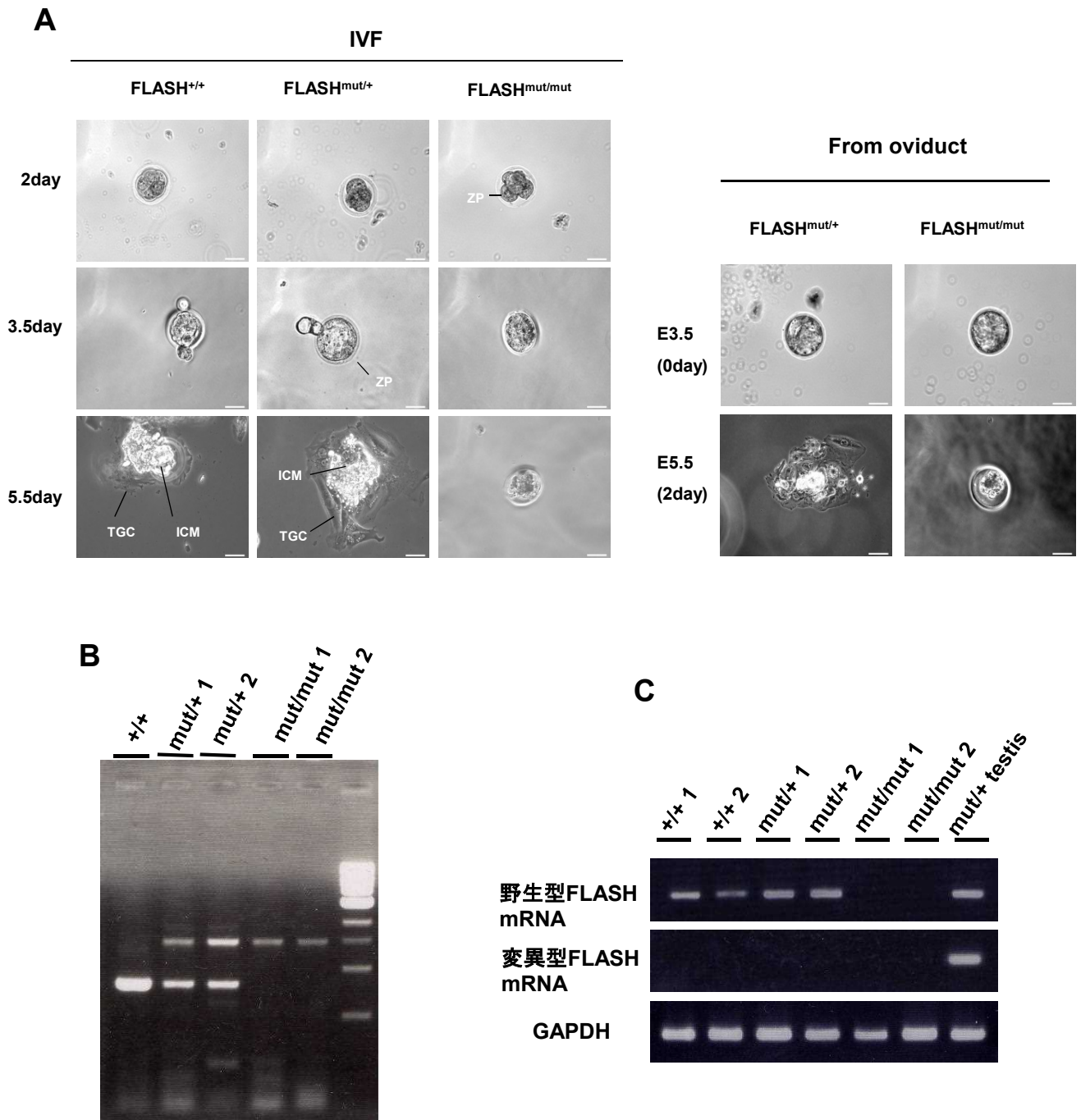
**表1 FLASH<sup>mut/+</sup>の雄雌を交配して得られる仔マウスまたはE3.5受精胚のgenotyping**

各発生ステージにおけるFLASHの各遺伝子型を有するマウスまたは受精胚の数を示す。NDは胎盤のみが残存し、genotypingができなかった胚の数を示す。

FLASH<sup>mut/+</sup>の blastocyst を培養すると、栄養外胚葉 (trophectoderm)が増殖して透明帯を破り出てくるハッチングが認められ、dish に付着した栄養外胚葉細胞の増殖が引き起こされるのに対し、FLASH<sup>mut/mut</sup>の blastocyst では全くハッチングが認められず胚の内皮細胞が縮小して死んだようになっていた (図 6A, B)。これらの結果は、IVF で作製した受精胚でも自然交配後卵管から回収した受精胚でも同様に認められた。

さらに、これらの胚における FLASH の発現を確認するために、受精後 5.5 日目の胚から RNA を回収し野生型と変異型 FLASH の RT-PCR 解析を行った。その結果、FLASH<sup>mut/mut</sup>胚は野生型、変異型どちらの FLASH も発現していないことが明らかになった (図 6C)。これらの受精胚を計 64 個用いて培養を行った結果、Wt や FLASH<sup>mut/+</sup>の胚では、正常に発生できず dish に付着しない胚も一部観察されたが、大部分の胚は付着した。一方、FLASH<sup>mut/mut</sup>胚は 14 個全てが付着しなかった (表 2)。

以上の結果から、ホモ型 FLASH 変異マウスの胚は FLASH の発現が完全に欠損したことによって、胎生約 3.5 日の blastocyst の段階でハッチングできず死亡することが示された。



**図6 ホモ型FLASH変異マウス受精胚ではハッチングが誘導されない**

(A) FLASH<sup>mut/+</sup>マウスの雄雌を交配後妊娠マウスの卵管から受精胚を回収し、ゼラチンコートdish上で培養した。また、FLASH<sup>mut/+</sup>の雄雌から体外受精(IVF)法により受精卵を作製して培養した。ZP : 透明帯、TGC : trophoctoderm giant cell、ICM : inner cell mass。

(B) PCR解析による受精胚のgenotyping

(C) 受精後5.5日目胚におけるFLASHの発現をRT-PCR法によって検討した。内部コントロールはGAPDHを用いた。

	受精胚数		
	+/+	mut/+	mut/mut
付着受精胚	17	24	0
非付着受精胚	4	3	14
合計	21	27	14

**表2 培養受精胚のdishへの付着能解析**

FLASH<sup>mut/+</sup>同士の交配またはIVFにより作製した受精胚を培養した後、dishに付着した各FLASH遺伝子型を有する胚の数を示した。

### 3-5. 誘導型 FLASH ノックアウト ES 細胞の作製

FLASH 変異マウスを用いた解析結果を受け、個体発生における FLASH の生理機能をより詳細に解析するため FLASH ノックアウト (KO) ES 細胞の作製を計画した。以前の報告から、FLASH を欠損させた場合に細胞周期が S 期でアレストして ES 細胞が増殖できなくなると考えられたので、コンベンショナルな方法では KO 細胞が樹立できない可能性が考えられた[13,14,16]。そこで、Cre-lox P システムを用いて誘導的に FLASH を欠損できる ES 細胞の樹立を行った (図 7A)。FLASH の翻訳開始点を含む exon2 を lox P 配列で挟んだ Targeting vector をマウス ES 細胞 TT2 にエレクトロポレーション法により導入し、G418 によりセクションを行い、コロニーをピックアップしてクローンを取得した。ゲノミック PCR によりスクリーニングを行い、Targeting vector が陽性のクローンに関しては probe1 を用いたサザンブロット解析により目的の位置に Targeting されていることを確認した (図 7B)。Targeted allele にはネオマイシン耐性遺伝子が挿入されており、FLASH の発現に影響を与える可能性があるため、フリッパーゼ (Flp) を取得した ES 細胞に導入して播種した後に、形成されたコロニーをピックアップしてネオマイシン耐性遺伝子が除去されたクローンを取得した。これらのクローンについては、ゲノミック PCR とサザンブロット解析によりゲノム構造を確認した。これらの ES 細胞のゲノム構造は、片側は FLASH 遺伝子の exon2 が lox P 配列で挟まれ (floxed)、もう一方は Wt であるので、取得した ES 細胞の FLASH の遺伝子型を FLASH<sup>flox/+</sup> と表記する。

次に、lox P サイトが挿入されたアレルと反対側のアレルの FLASH 遺伝子 (Wt) をノックアウトするため、Second targeting vector をエレクトロポレーション法によって導入後、G418 にてセクションし、形成されたコロニーをピックアップした。これらのクローンをゲノミック PCR 法によってスクリーニングし、最初にターゲティングされたアレルと反対の Wt アレルにターゲティングされたものだけを選出した。尚、この

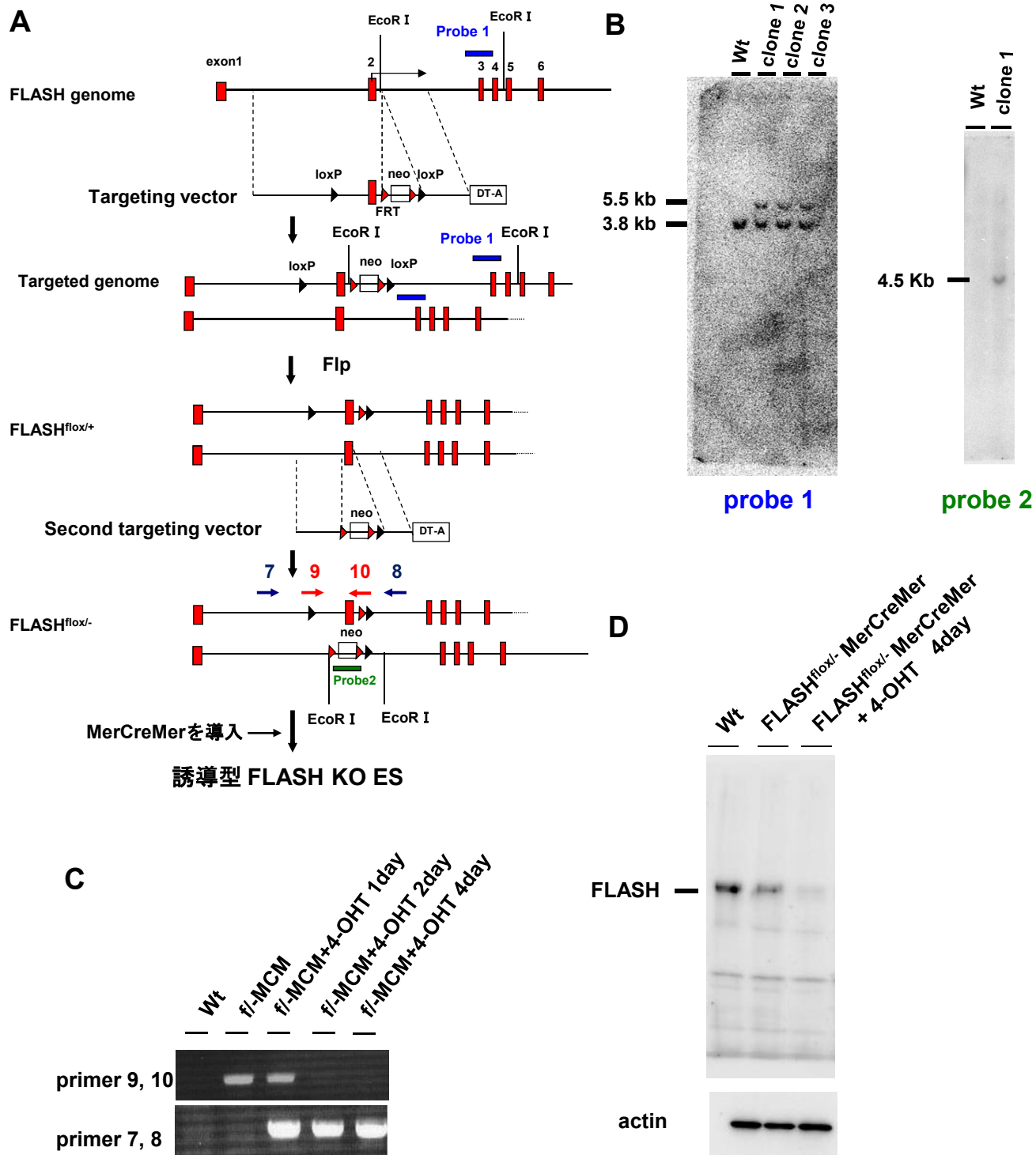


図7 誘導型FLASH KO ES細胞の樹立

- (A) 誘導的FLASH KO ES作製方法。赤、青矢尻は4-OHT処理によるCre-lox P配列での組み換えを検出するプライマー、Probe1, Noe Probeはサザンブロット解析に用いるプローブを示す。DT-Aは、ジブテリアトキシニンA、Flpはプリッパーゼを示す。
- (B) probe1とprobe2を用いたWTとFLASH<sup>lox/-</sup> ES細胞 cloneのサザンブロット解析
- (C) PCR解析によるlox Pサイト間での組み換え誘導の確認
- (D) 抗FLASH抗体を用いたウエスタンブロット解析によるFLASHノックアウト誘導の確認

工程では、初めにターゲティングされたアレルに Second targeting vector が挿入れたクローンも存在するため、目的のクローンの選出効率は初めのターゲティング時の約半分であった。このようにして取得した最終的な ES クローンの FLASH の遺伝子型を FLASH<sup>fllox/-</sup> と表記する。本クローンのゲノム構造が FLASH<sup>fllox/-</sup>であることを、probe2 を用いたサザンブロット解析により確認した（図 7B）。

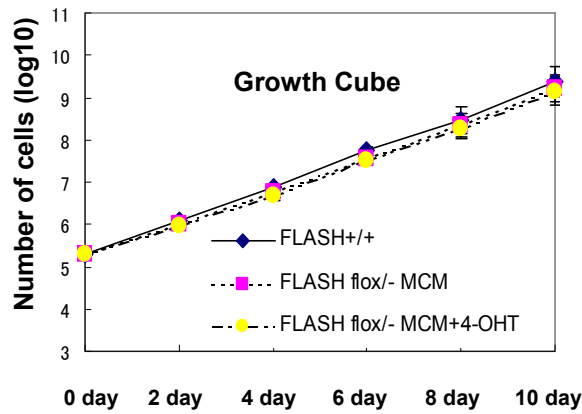
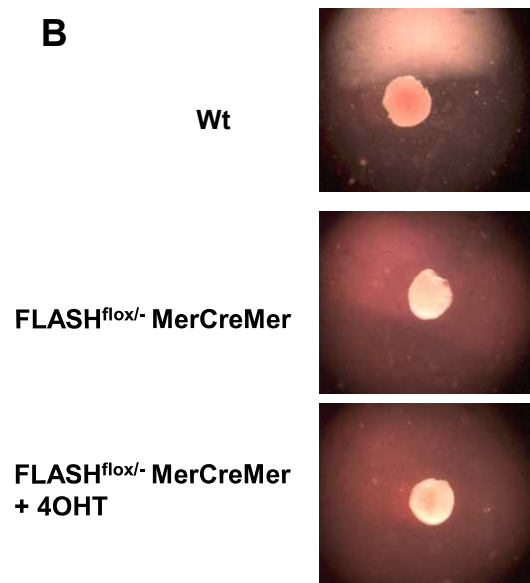
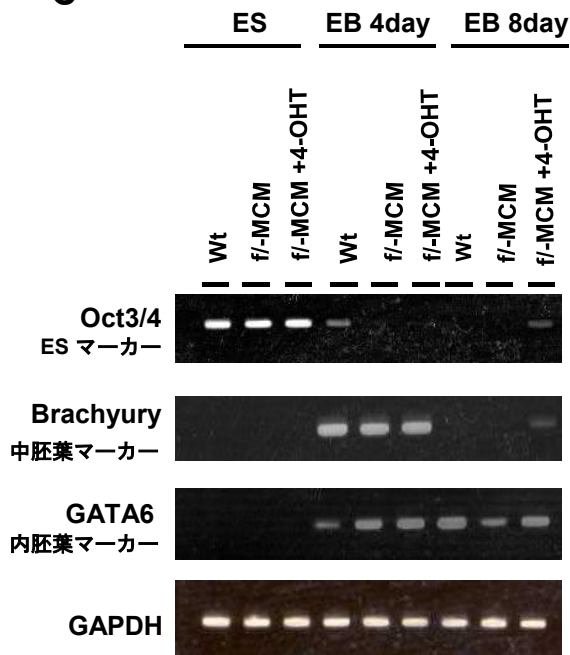
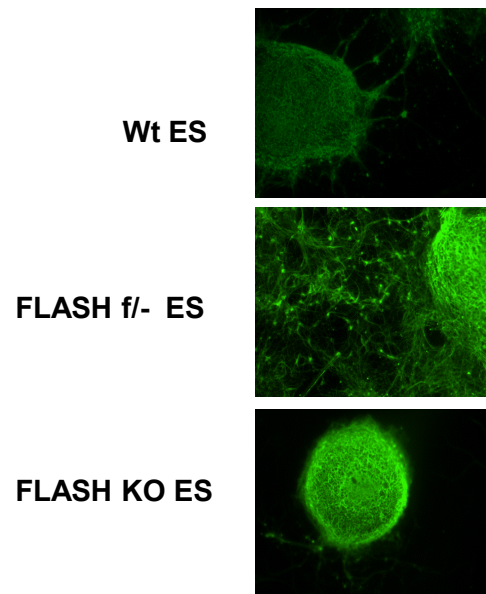
次に、薬剤添加により Cre を発現させて lox P 配列間の組み換えを引き起こし、FLASH KO を誘導するため、FLASH<sup>fllox/-</sup> クローンに Mer-Cre-Mer-IRES-Puro<sup>r</sup> 発現ベクターを導入してピューロマイシンでセレクションし、ウエスタンブロット解析でスクリーニングすることによって、恒常的に Mer-Cre-Mer が発現したクローンを複数調製した。

この誘導型 FLASH KO ES に 4-OHT を添加して培養すると 2 日後には高い効率で lox P 配列間の組み換えを誘導できることを PCR 解析によって確認した（図 7C）。プライマー 9, 10 を用いた PCR 解析では lox P 配列の組み換えが誘導されると増幅が不可能になり、逆にプライマー 7, 8 を用いた PCR 解析では lox P 配列間で組み換えが誘導されると増幅される DNA 断片が検出可能な長さまで短くなり、増幅されたバンドとして検出される。さらに、ウエスタンブロット解析を行い、本 ES 細胞が FLASH の KO を誘導できることをタンパクレベルでも確認した（図 7D）。尚、目的の ES 細胞クローンは独立した 2 種類を作製し、同じ様に FLASH の KO が誘導できることを確認している。

### 3-6. FLASH KO ES は野生型 ES と同様に増殖し、初期分化も誘導できる

4-OHT を添加して FLASH KO を誘導した後に培養を続け、細胞数を計測することによって ES 細胞において FLASH が細胞増殖に関与するかを評価した。その結果、意外なことに ES 細胞では FLASH をノックアウトしても増殖に影響がないことが明らかになった（図 8A）。また、フローサイトメトリー解析による DNA 含量の測定により細胞周期への影響も評価したが、Wt ES と FLASH KO ES の間で差は認められなかった。



**A****B****C****D**

**図8 FLASH KO ESは野生型ESと同様に増殖し、初期分化も誘導できる**

- (A) FLASH KO ES細胞の増殖能を4-OHT添加後に日を追って評価した。  
 (B) 各FLASH遺伝子型ES細胞が形成するEmbryoid body (EB)。  
 (C) EB形成開始後に日を追って各種分化マーカーの発現変化をRT-PCR法によって解析した。  
 (D) 各FLASH遺伝子型ES細胞から神経分化を誘導し、抗Tuj-1抗体によって染色した。

次に、Wt、ヘテロ型 (FLASH<sup>flox/-</sup> Mer-Cre-Mer)、FLASH KO 誘導型 (FLASH<sup>flox/-</sup> Mer-Cre-Mer+4-OHT)それぞれの ES 細胞を用いて、ハンギングドロップ法により 10 日間培養して Embryoid body (EB)の形成を行い、細胞の分化を誘導したが、どの細胞でも同様の形態を持つ EB が形成された (図 8B)。次に EB 形成中における ES 細胞の初期分化能を調べるため、EB 形成 4 日目と 8 日目で RNA を回収し、各種分化マーカー、Oct3/4 (ES 細胞マーカー、未分化マーカー)、Brachyury (中胚葉マーカー)、GATA6 (内胚葉マーカー)の発現を RT-PCR 解析によって評価した。その結果、Oct3/4 は EB 形成を開始すると急速に発現が低下した。Brachyury は EB 形成初期で発現が一過性に上昇してその後発現が低下した。GATA6 は EB 形成が進むにつれて発現が上昇した。これらの分化マーカー発現パターンはどの FLASH の遺伝子型を持つ細胞でもほとんど差が認められなかった (図 8C)。さらに、それぞれの FLASH 遺伝子型の ES 細胞から SDIA 法により神経分化を誘導したが、FLASH 欠損による神経分化への影響は認められなかった (図 8D)。また、EB を LIF を添加しない培地で培養することで心筋細胞への分化を誘導しても FLASH 欠損による影響は認められず、FLASH KO 細胞も Wt 細胞と同様に拍動する細胞集団が観察された。

以上の結果から、FLASH は ES 細胞においてその増殖能に影響しないこと、また ES 細胞からの中胚葉、内胚葉への初期分化にも影響しないことが明らかになった。

### 3-7. FLASH は血球系および血管内皮細胞分化に関与する

FLASH が Hoxb4 の転写を促進する[6]、ALL, T-LBL 等の血液がんの予後に関与する [10] [11]といった過去の報告から、FLASH が血液細胞の分化に関与している可能性が考えられた。そこで、FLASH 誘導型 KO ES 細胞を用いた分化誘導実験において、血球細胞関連遺伝子の発現変化を解析した。

ES 細胞から EB を形成させると中胚葉から血液系細胞への分化が誘導され、Flk-1 等

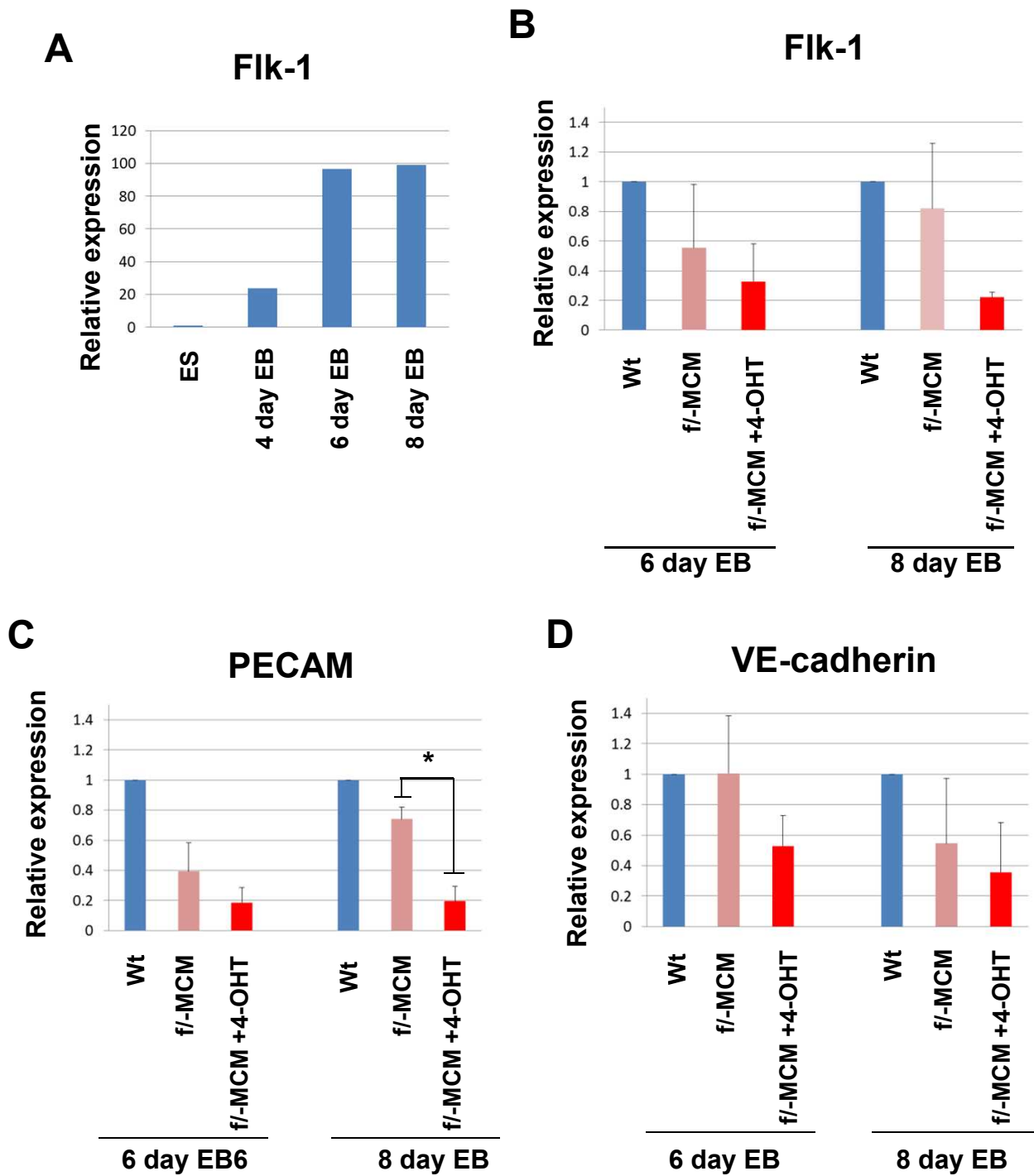
血液・血管内皮細胞の初期分化マーカーの発現が上がることで知られており[22]、qRT-PCR 解析で確認した（図 9A）。次に、Wt、ヘテロ型 (FLASH<sup>fllox/-</sup> Mer-Cre-Mer)、FLASH KO 誘導型 (FLASH<sup>fllox/-</sup> Mer-Cre-Mer+4-OHT)それぞれの ES 細胞から EB を形成後、Fik-1 の発現を qRT-PCR 解析によって評価したところ、その発現量は Wt>ヘテロ型>KO 誘導型となり、FLASH を欠損させると Fik-1 発現が低下することが示された（図 9B）。本実験は EB の形成時に、サンプル間のばらつきが生じやすいために、統計的に有意な差は認められてはいない。しかし、独立して 3 回の EB 形成実験を行ったところ、3 回とも FLASH KO ES で Fik-1 発現が低下する現象が認められた。さらに、血管内細胞マーカーである PECAM や VE-cadherin の発現変化も評価したところ、同様に FLASH KO ES でこれらのマーカー遺伝子の発現低下が認められた（図 9C, D）。特に、PECAM では有意な低下が認められた。

これらの結果から、FLASH は血球・血管内皮細胞分化促進に何らかの役割を担っていると考えられる。しかし、これらの発生ステージは胎生 7.5 日の着床以降であるため FLASH 欠損胚が致死になる原因とは考え難い。

### 3-8. FLASH KO ES は栄養芽細胞への分化とその増殖に関与しない

マウス個体で FLASH を欠損すると胎生約 3.5 日目で死滅するが、FLASH を欠損した ES 細胞は正常に増殖していた。そこで、FLASH 欠損胚が死亡するのは、栄養外胚葉 (trophectoderm)の異常による子宮への着床不全が原因である可能性が考えられた。

Trophectoderm は前述のとおり、受精後 3.5 日の blastocyst の透明帯の直下に存在する層で、その層に存在する栄養芽細胞 (trophoblast)が増殖することでハッチングして子宮へ着床し胎盤の一部を形成する。Trophectoderm に異常が生じると受精胚は正常発生できずに死亡する[24,25]。このような可能性が正しいかを検証するためには、ES 細胞から trophoblast へ分化誘導する実験系の構築が必要であった。



**図9** FLASHは血球系および血管内皮細胞分化に関与する

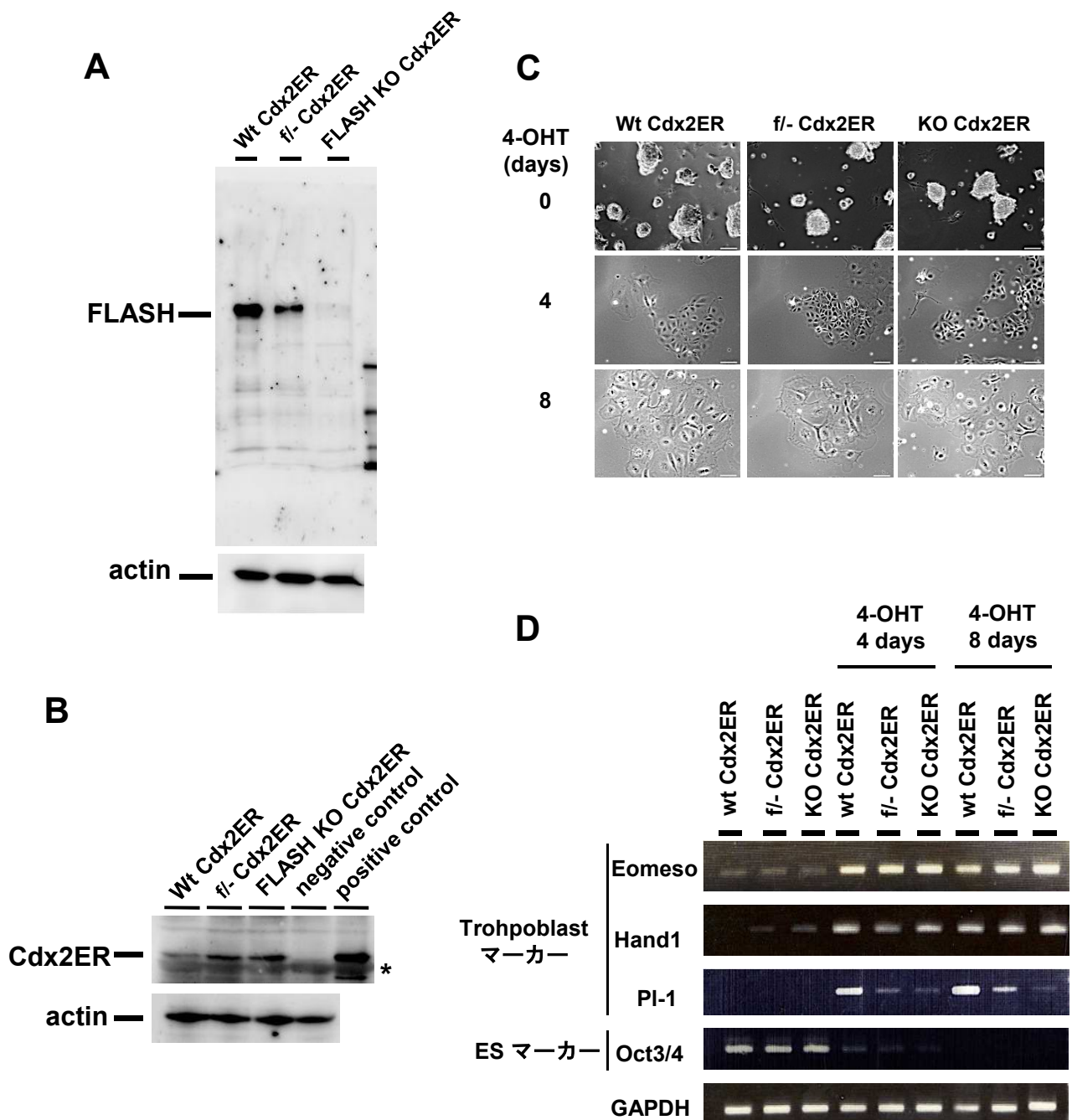
- (A) Wt ES細胞からEB形成を行い、日を追ってFli-1の発現をqRT-PCR解析により比較した。ES細胞でのFli-1の発現量を1とした時の相対発現量を示した。GAPDHを内部コントロールに用いた。
- (B) 各FLASH遺伝子型ES細胞からEB形成開始後6日目、8日目のFli-1の発現量をqRT-PCR解析により比較した。6日目、8日目それぞれのwt型EBでの発現量を1とした時の相対発現量を示した。GAPDHを内部コントロールに用いた。3回独立した解析を行い、その平均値を示した。
- (C) Bと同様に、PECAMの相対発現量を測定した。\*は、t検定で $p < 0.05$ を示す。
- (D) Bと同様に、VE-cadherinの相対発現量を測定した。

Cdx2 は trophoblast で発現する転写因子で trophoctoderm の機能獲得を担っている [26]。また、この Cdx2 を ES 細胞に導入することで trophoctoderm 系列への誘導ができると報告されている [27]。そこで私は、Cdx2 を FLASH KO ES 細胞に誘導的に発現させることで FLASH の trophoctoderm 誘導における機能の解析を行った。

まず、FLASH が ES 細胞の増殖に影響しないことが分かったため、FLASH<sup>fllox/-</sup> ES 細胞にエレクトロポレーション法によって Cre 発現ベクターを導入し、コロニーをピックアップして PCR スクリーニングを行い、lox P 配列間の組み換えが誘導されたことで FLASH<sup>-/-</sup>になった、FLASH KO ES 細胞をシングルクローン化した。次に、Wt、FLASH<sup>fllox/+</sup>、FLASH<sup>-/-</sup>それぞれの ES 細胞に Cdx2 にヒトエストロゲンレセプターを融合し IRES-puro<sup>r</sup> を連結した発現ベクターをトランスフェクション法により導入し、ピューロマイシンでセクションして Wt、FLASH<sup>fllox/+</sup>、FLASH<sup>-/-</sup>のそれぞれの ES 細胞で Cdx2ER が恒常発現した細胞を作製した。Cdx2ER の発現は抗 ER $\alpha$ 抗体を用いたウエスタンブロット解析により確認した(図 10B)。これらの Cdx2ER 発現 ES 細胞は 4-OHT を添加することにより Cdx-2 を核内移行させ、Cdx-2 に依存した転写を活性化することができる。

これら各種 ES 細胞において FLASH の発現をウエスタンブロット法によって解析し、FLASH<sup>-/-</sup> ES 細胞において FLASH が完全に欠損していることを確認した (図 10A)。

これらの Cdx2ER 恒常発現 ES 細胞をフィーダー細胞の存在しない条件下にゼラチンコートした dish 上に播種して LIF を加えず培養し、4-OHT を添加して trophoblast の分化誘導を行った。その結果、4-OHT 添加後 4 日、8 日と日を追う毎に ES 細胞の形態が、受精胚の培養 (図 6A) で認められた TGC (trophoctoderm giant cell) 様の形態に変化していった (図 10C)。このような形態変化の様子は、どの FLASH の遺伝子型を持つ ES 細胞においても違いは見られなかった。そこで、4-OHT 添加前後で trophoblast マーカーである Eomeso、Hand1、Pl-1 と ES マーカーの Oct3/4 の発現を RT-PCR 法に



**図10 FLASHはES細胞からtrophoblastへの分化に関与しない**

(A) Wt、FLASH<sup>flox/+</sup>、FLASH<sup>-/-</sup> ES細胞株にCdx2ERを恒常発現させ、ウエスタンブロット解析によりFLASHの発現を解析した。

(B) Aに示したES細胞株におけるCdx2ERの発現をウエスタンブロット法で解析した。  
\* : 非特異的バンド

(C) Aに示したES細胞株に4-OHTを添加してtrophoblastへ分化誘導し、位相差顕微鏡下に形態を観察した。

(D) Cに示した細胞におけるTrophoblast分化マーカー Eomeso, Hand1, PI-1とESマーカー Oct3/4の発現変化をRT-PCR法によって解析した。

よって解析した（図 10D）。その結果、Oct3/4 ほどの ES 細胞においても 4-OHT 添加後に発現が低下していた。trophoblast マーカーの Pl-1 は wt に比べて FLASH<sup>-/-</sup> 細胞では発現の上昇度が若干低かったものの、Eomeso や Hand1 については同等の発現上昇が認められた。

以上の結果から、FLASH は Cdx2 強制発現による ES 細胞から trophoblast への分化誘導や trophoblast の生存そのものにも必須ではないことが明らかになった。

### 3-9. FLASH KO ES ではコアヒストンの発現が低下している

これまでの報告では、FLASH の発現を siRNA や shRNA を用いた RNAi 法で抑制すると、細胞周期が S 期でアレストし、ヒストン H3 や H4 といったコアヒストンの発現が抑制されることが複数のグループから報告され、FLASH 発現抑制による S 期アレストはコアヒストンの発現抑制が主な原因と考えられている[16,28,29]。

また、本研究で用いた FLASH 変異マウスと同様に FLASH の発現を欠損し発生早期で死亡するマウスの受精胚ではヒストン H4/d の mRNA が抑制されていることが報告された[30]。そこで、FLASH KO ES 細胞においてもヒストンの発現が抑制されているかについての検討が必要であると考え、qRT-PCR 法とウエスタンブロット法によるヒストンの発現解析を行った。

ヒストンには細胞周期依存的ヒストンと細胞周期非依存的ヒストンが存在する。細胞周期依存的ヒストンの mRNA は poly A を持たず、代わりに 3'UTR に stem-loop を有し S 期で特異的に発現が上昇するが、細胞周期非依存的ヒストンの mRNA は poly A を有し恒常的に少量が発現するという特徴がある[31,32]。コアヒストンである H3 と H4 は非常に多くのバリエーションを持つため[33]、本解析では細胞周期依存的ヒストン H3 と H4 のそれぞれ多くのバリエーションに共通の配列に対応するプライマーを過去の文献を参考

に設計し（図 11）、qRT-PCR 法によりこれらの発現を解析した[31]。また本解析では、FLASH の発現抑制により細胞周期がアレストしない ES 細胞とアレストする細胞を比較するために、ヒト口腔癌由来 KB 細胞にテトラサイクリン誘導体 (Dox) を添加することで shFLASH を発現誘導できる細胞株を用いた[18]。その結果、shFLASH を発現誘導した KB 細胞は増殖が抑制されると共に、ヒストン H3、H4 両分子の mRNA の発現が強く抑制されていた。また、驚いたことに、細胞増殖が wt ES と比べて正常である FLASH KO ES においても、これらのヒストン mRNA の発現が同じように抑制されていることを見いだした（図 12A）。尚、本実験の逆転写反応にはランダムヘキサマーを用いており、polyA を持たないヒストン mRNA も逆転写されている。また、PCR 反応のプライマーは細胞周期依存的ヒストンに共通の領域に設計した。したがって、図 12A に示した結果は全ての細胞周期依存的ヒストン H3 と H4 の mRNA を定量したと考えられる。さらに、ウエスタンブロット解析によりヒストン H3 タンパクの発現量を調べたところ、shFLASH を誘導した KB 細胞ほど顕著ではないものの、FLASH KO ES でもヒストン H3 タンパクの有意な発現低下が認められた（図 12B）。

FLASH の発現抑制で細胞増殖がストップする細胞では、コアヒストンの発現量が低下するために、細胞周期 S 期でのアレストが誘導されると考えられてきたが、FLASH の発現抑制で細胞増殖がストップしない ES 細胞でも細胞周期依存的なコアヒストンの発現量が低下することが示された。FLASH の発現抑制で細胞周期が S 期でアレストし、細胞増殖がストップ原因については、より深い考察と解析が必要であると考えられる。



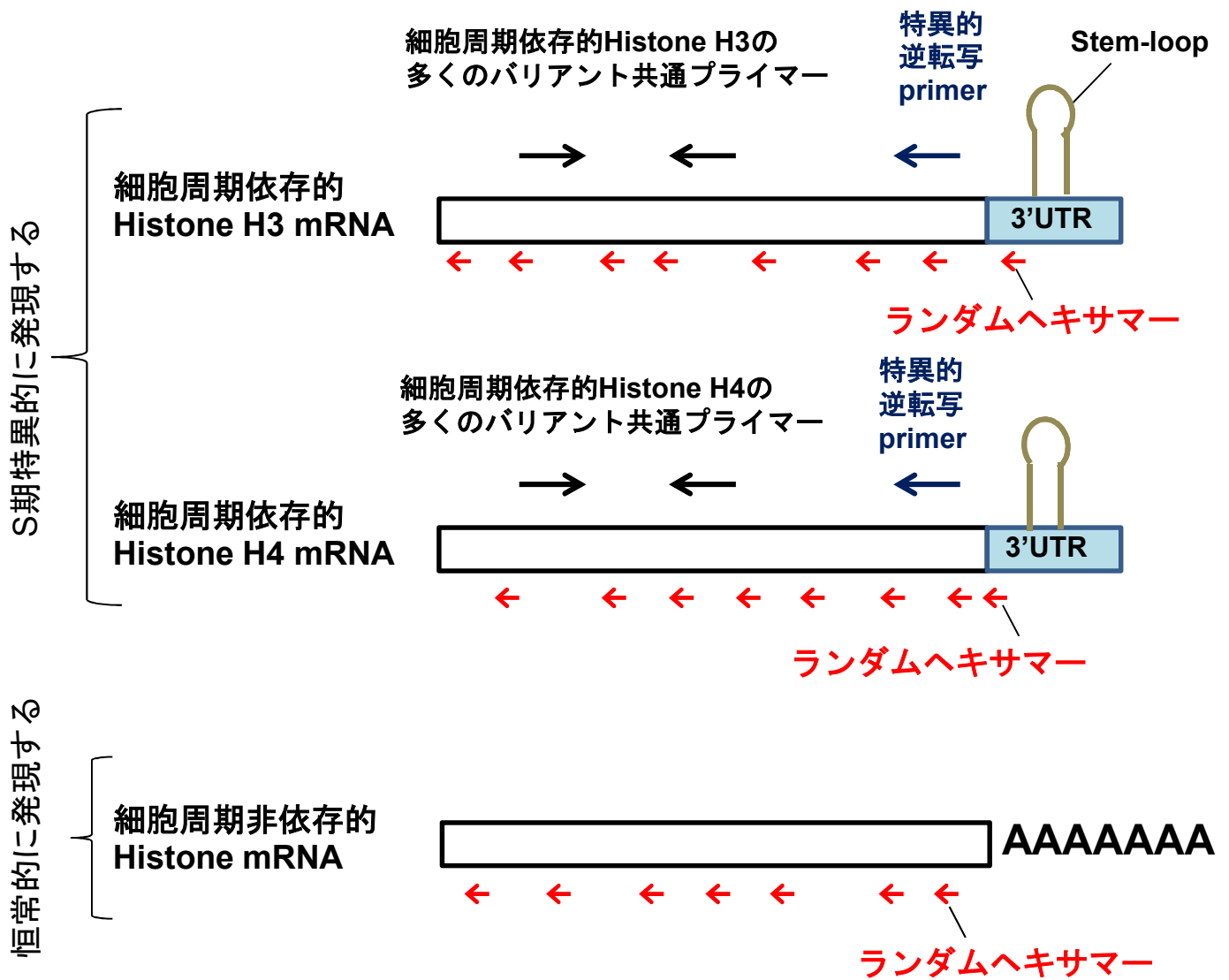


図11 細胞周期依存的Histone H3とH4のmRNAのqRT-PCR法による解析方法

mRNAからの逆転写に用いるプライマーとして、細胞周期依存的ヒストンに特異的なプライマー、またはランダムヘキサマーを用いた。

PCR解析に用いるプライマーは、多数存在する細胞周期特異的ヒストンバリエーションに共通な配列を用いた。

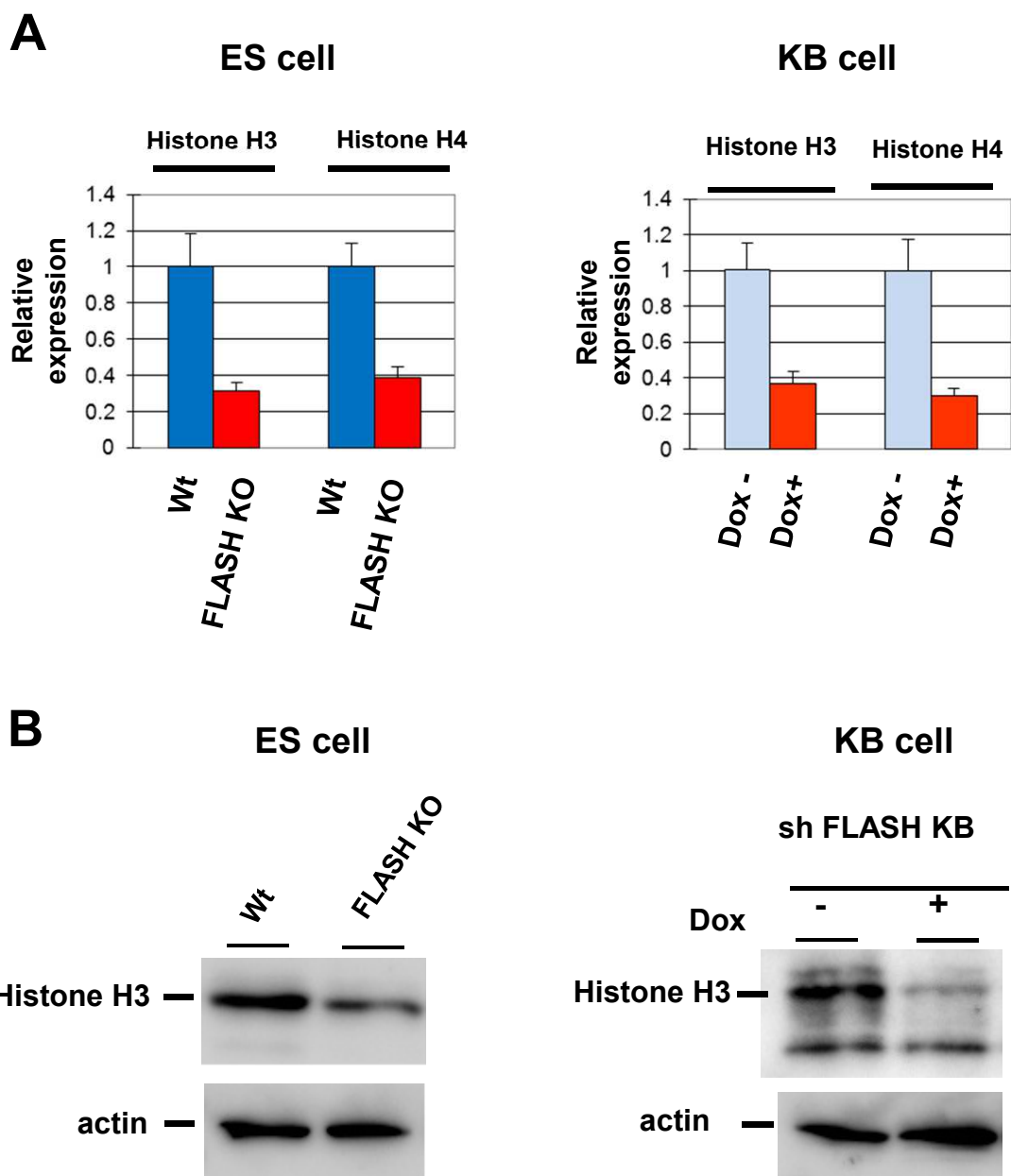


図12 FLASH KO ES細胞においてもヒストン遺伝子の発現が抑制されている

(A) qRT-PCR法による細胞周期依存的ヒストンH3, H4 mRNAの発現量解析。

(B) ウェスタンブロット法によるヒストンH3タンパク質の発現量解析。

\* : 非特異的バンド

## 第四章

### 考察

本研究では、FLASH 変異マウスが精巣以外の組織で FLASH を発現しない FLASH 欠損マウスであることを明らかにし、かつ FLASH が発現しないマウスが発生初期の胎生約 3.5 日の時期に子宮に着床せず死亡することを明らかにした。最近になり、他のグループからも本研究で用いたマウスと同様の exon1 (翻訳開始コドン ATG を持たない) と exon2 (翻訳開始コドン ATG を持つ) の間に trapping vector が挿入された FLASH 変異マウスを用いて、FLASH が発生初期に必須であると報告された[30]。しかし、この報告では FLASH 変異マウスを初めから FLASH KO マウスとして扱っており、FLASH 変異マウスのゲノム構造や FLASH の発現抑制を詳細に確認してはいないため、FLASH 欠損マウスの研究として不十分であった。このようなマウスを FLASH KO マウスとしてはならない理由は、下記のとおりである。FLASH 変異マウスの変異型アレルからの FLASH mRNA (exon2 以降を含む) は、FLASH の開始コドンである ATG を含むため、FLASH タンパク質を発現させる潜在能力を保っているため、FLASH mRNA が発現しているかを詳細に確認しなければ、FLASH の発現がない個体とは結論できないのである。

一方、本研究で用いたヘテロ型 FLASH 変異マウスでは精巣以外の各種臓器や MEF、受精後 3.5 日~5.5 日の受精胚において FLASH 変異型アレルから FLASH の mRNA が発現していないことを明らかにした。さらに、ホモ型 FLASH 変異受精胚では FLASH が全く発現していないことを明らかにし、FLASH を欠損した受精胚ではハッチングが誘導されないことを明らかにした。これらの解析によって、FLASH が発現しないマウスが発生初期の胎生約 3.5 日の時期に子宮に着床せず死亡することを初めて明らかにできたと考えている。尚、本研究においても FLASH 変異マウスの表現型が FLASH の発現を欠損したことのみに由来することは完全には証明できていない。しかし、trapping vector が FLASH 遺伝子にのみ挿入されていることを明らかにしており、受精胚が早期に死亡する現象は FLASH 欠損に由来する可能性が非常に高いと考えられる。また、精巣でのみ変異型 FLASH mRNA が発現するメカニズムは明らかではない。1つの仮説

としては、精巣以外の組織の細胞では NMD (Nonsense-mediated RNA decay) などの RNA 分解機構[34]により、転写された変異型 FLASH mRNA がすぐに分解されている可能性が考えられる。図 4A に示す trapping vector 内の BTK 遺伝子には不要な融合タンパクを翻訳させないため 3 種類の終始コドンが挿入されており、終止コドンを上流に有する変異型 FLASH mRNA が NMD により分解されている可能性が考えられる。そして、何らかのメカニズムで精巣ではこの RNA 分解機構がうまく機能していない可能性が考えられる。また、その他の仮説としては、trapping vector が挿入されたゲノムが精巣で特異的に転写活性化される可能性が考えられる。精巣ではヌクレオソームの構造が不安定になっており転写機構がその他の組織と異なっている。そのため、例えば癌精巣抗原などのように正常組織では精巣でしか発現しない遺伝子が多数存在する。また、精巣特異的ヒストン H3T はその構造から精巣におけるヌクレオソームの不安定性に寄与していることが示唆されている[35,36]。そのため、trapping vector が挿入された位置では精巣においてのみヒストン H3T 等によりヌクレオソームの構造が変化し、転写され易くなった結果、精巣でのみ変異型 FLASH が転写された可能性も考えられる。

FLASH 変異マウスの解析から、FLASH を欠損した受精胚は約 3 割程度が桑実胚 (morula) [37]で発生が止まり、残りの胚が胎生約 3.5 日の胚盤胞 (Blastocyst)まで発生するが、ハッチングせず死亡することがわかった。この事実から、FLASH を欠損していても Blastocyst 期までは細胞が分裂して発生する可能性が考えられた。しかし、FLASH 欠損受精胚で FLASH の発現がなくなっているとは断定できない。受精前の卵には初期発生時に必要な mRNA やタンパクが蓄えられており、2 細胞への分裂時にはほとんどの受精卵の遺伝子は転写されず卵由来のタンパクや mRNA が使われている。このような卵由来タンパクや mRNA は遺伝子によっては胎生 3.5 日近くまで残存していることがあるため、FLASH 欠損胚でも母親由来の FLASH タンパクまたは mRNA に Blastocyst まで残存し機能している可能性も考えられる。以上の理由から、マウス受精胚を用いたさらなる FLASH の生理機能解析は難しいと考えられた。そこで私は、個

体発生を *in vitro* で模倣できる ES 細胞を用いて FLASH の生理機能を分子生物学的に解析するために、誘導型 FLASH KO ES 細胞を作製した。

序論で述べたように、FLASH は RNAi 法により発現を抑制すると細胞周期が S 期でアレストし、コアヒストンの発現が低下することが報告されている[14,15,18]。そこで、ターゲティング法で FLASH KO ES の作製を試みてもクローンが取得できない可能性を考え、本研究では誘導的に FLASH を KO できる ES 細胞を作製した。誘導型 FLASH KO ES のゲノム構造は複数のプライマーセットを用いたゲノミック PCR 解析とサザンブロット解析により行い、確実に目的のゲノム構造が構築できていることを確認した。また、FLASH KO が誘導できていることはウエスタンブロット解析により確認したが、その際、mRNA の途中から翻訳された様な不完全な分子量を示す FLASH タンパク質も検出されなかった。ウエスタンブロット解析には当研究室で作製した抗 FLASH モノクローナル抗体の他にポリクローナル抗体も用いて行ったが、どちらの場合も同様の結果であった。これらの結果から、私が作製した FLASH KO ES 細胞は全長 FLASH 並びに partial な FLASH も完全に欠損していることが確認できた。しかし、FLASH KO を誘導しても全く細胞増殖に影響が見られず、中胚葉、内胚葉への分化誘導においても影響が認められなかった。一方、FLASH を欠損すると血球細胞や血管内皮細胞マーカー遺伝子の発現が抑制されたことから、FLASH は血球細胞、血管内皮細胞分化に何らかの役割を担っていることが示唆された。しかし、これらの細胞の分化が始まるのは着床期より遅い胎生 7.5 日であるため、FLASH 欠損胚が死亡する原因とは考え難い。

そこで、FLASH 欠損胚が死亡する原因が栄養外胚葉 (trophectoderm) の機能不全であるという可能性を考えた。FLASH 変異マウスの受精胚を *in vitro* で培養してハッチングを観察した実験 (図 6) は、受精胚が母体マウスの子宮の表面に着床するために起こる現象を模倣したものであり、受精胚の外側の trophoctoderm の栄養芽細胞 (trophoblast) が増殖することで胚全体が透明帯から出てきて子宮に着床し、trophoblast が胎盤の一

部を形成する。この trophoctoderm が正常に発生しないと、Blastocyst が着床できず死亡する[24]。FLASH の trophoctoderm 形成やその生存における機能を調べるために、FLASH KO ES に Cdx-2 を誘導的に導入したところ、Wt ES と同様に FLASH KO ES も正常に trophoblast に分化が誘導された。ES 細胞から trophoblast への分化と受精胚での trophoblast 発生は全く同じメカニズムとは断言できないものの、FLASH は trophoblast への分化や生存に関与していないと考えられた。

それでは FLASH は発生初期においてどのような役割を担っており、なぜ欠損すると胚が死亡するのか、そのメカニズムを探索する糸口を取得するため、私は FLASH KO ES 細胞でのヒストンの発現を qRT-PCR とウエスタンブロットで解析した。過去の報告から FLASH の発現を RNAi 法で抑制すると細胞周期依存的ヒストンの発現が低下することが知られている[16,30]。細胞周期依存的ヒストン mRNA は polyA を持たず代わりに 3'UTR に stem-loop 構造を持つ特徴がある。そのため、qRT-PCR 解析ではランダムヘキサマーを用いて逆転写を行い、polyA を持たない mRNA も含めた全ての RNA からそれぞれのヒストンの発現を解析した。さらに、細胞周期依存的ヒストン H3 (mus Hist1h3c) と H4 (mus Hist1h4f) 特異的リバープライマーを用いた逆転写反応も行い、それぞれのプライマーを用いて各バリエーションの発現を解析した (図 11)。その結果、ランダムヘキサマーを用いた解析と特異的リバープライマーを用いた解析の両方において、FLASH KO ES における細胞周期依存的ヒストン H3 と H4 の発現低下が認められた。さらに、ウエスタンブロット解析によりヒストン H3 のタンパク量の減少が認められた。これらの解析によって、FLASH の発現抑制によって細胞増殖がストップする細胞とストップしない細胞の両方で、FLASH の発現がなくなると細胞周期依存的コアヒストンの発現が同じように抑制されることが明らかとなった。

しかしながら、細胞増殖やその他の分化能が正常な FLASH KO ES でヒストンタンパクの絶対量が大きく減少しているとは考え難い。ヒストンは非常に多くのバリエーションが

存在し、H1, H2A, H2B, H3, H4 合わせて 100 個以上の遺伝子がゲノム上に存在する。それらの中には S 期特異的に発現する細胞周期依存的ヒストンと恒常的に発現する細胞周期非依存的ヒストンが存在する。本研究では細胞周期依存的ヒストンの発現のみを評価しており、細胞周期非依存的ヒストンの発現変化は明らかになっていない。そのため、FLASH KO ES では Histone H3.3 等の細胞周期非依存的ヒストンが機能を補っている可能性も考えられる。実際、ショウジョウバエ細胞において細胞周期依存的ヒストン H3.2 を抑制してもその機能を細胞周期非依存的ヒストン H3.3 が補うことが報告されている[38]。

一方、転写や RNA 修飾に係る NELF (Negative elongation factor) や CBC (cap binding complex) を RNAi 法で抑制すると polyA が付加された細胞周期依存的ヒストン mRNA が発現するという意外な報告がなされている[39]。またこの polyA 化された細胞周期依存的ヒストンはヒ素の添加でも発現が認められると最近報告された[40]。FLASH の発現を RNAi 法で抑制した時、この polyA 化された細胞周期依存的ヒストンの一種が発現上昇することが報告されている[15]。このように FLASH の発現が抑制されると細胞周期依存的ヒストンの発現が低下すると同時に、細胞周期非依存的ヒストンが機能を補ったり、ある種の polyA 化された細胞周期依存的ヒストンの発現が増加したりすることによって、ヌクレオソームを構成するヒストンバリエーションの種類が変化している可能性がある。その変化により S 期でアレストする細胞と ES 細胞のように問題なく増殖できる細胞が存在するのではないかと推察される。

最近、細胞周期非依存的ヒストン H3.3 やそのシャペロンの Hira はマウス初期受精卵の発生において重要な働きをしており、これらを欠損すると Blastocyst まで発生できないことが報告された [41,42]。これらの事実は、FLASH 欠損初期胚が発生できず死亡する現象と関係がある可能性が考えられる。

以上の事を考慮すると、まだ明らかになっていない FLASH の生理機能を解明して



いくためには、FLASH KO ES や FLASH 欠損初期胚における様々なヒストンバリエーションの発現パターンを詳細に解析していくことが重要であると考えられる。

また、私は動物個体の各組織における FLASH の生理機能を解析するため、FLASH conditional knockout マウスの作製を試みた。前述した ES 細胞へのジーンターゲティング法 (図 6A) により Cre-lox P システムをゲノムに組み込んだ ES 細胞を作製し、マウス受精卵にマイクロインジェクションした (図 13)。さらに、ターゲティングベクターを組み込んだ状態の ES 細胞に Flp をエレクトロポレーション法によって導入し、ネオマイシン耐性遺伝子を除去した ES 細胞をマウス受精卵にマイクロインジェクションすることも試みた。これらの ES 細胞をインジェクションして、キメラ率が 8 割以上のキメラマウスが複数匹得られた。これらのキメラマウスを野生型マウスと交配し、次の世代の仔マウスの genotyping を行ったが、残念ながら Germ-line transmission が成功したマウスは得られなかった。なお、エレクトロポレーション法によるターゲティングベクター又は Flp 発現ベクターの導入では、1 回の実験で 200~300 個の ES 細胞クローンをピックアップして解析し、3~5 個の目的 ES 細胞クローンを得ることに成功した。エレクトロポレーションは計 5 回行い、合計 1000 個以上の ES 細胞クローンをピックアップした。また、マイクロインジェクション並びにキメラマウス作製は 3 回行った。これらの ES 細胞クローンは、キメラ率 8 割以上のキメラマウスを作製できたことから高い未分化能を保持していると考えられるが、ES クローン作製操作の過程で Germ-line transmission に必要な機能が欠失した可能性が考えられる。

今後、本研究では完成しなかった FLASH conditional KO mouse を完成させ、マウス個体における各種細胞での FLASH の生理機能を明らかにしていくことが重要である。

## ES細胞でのtargeting

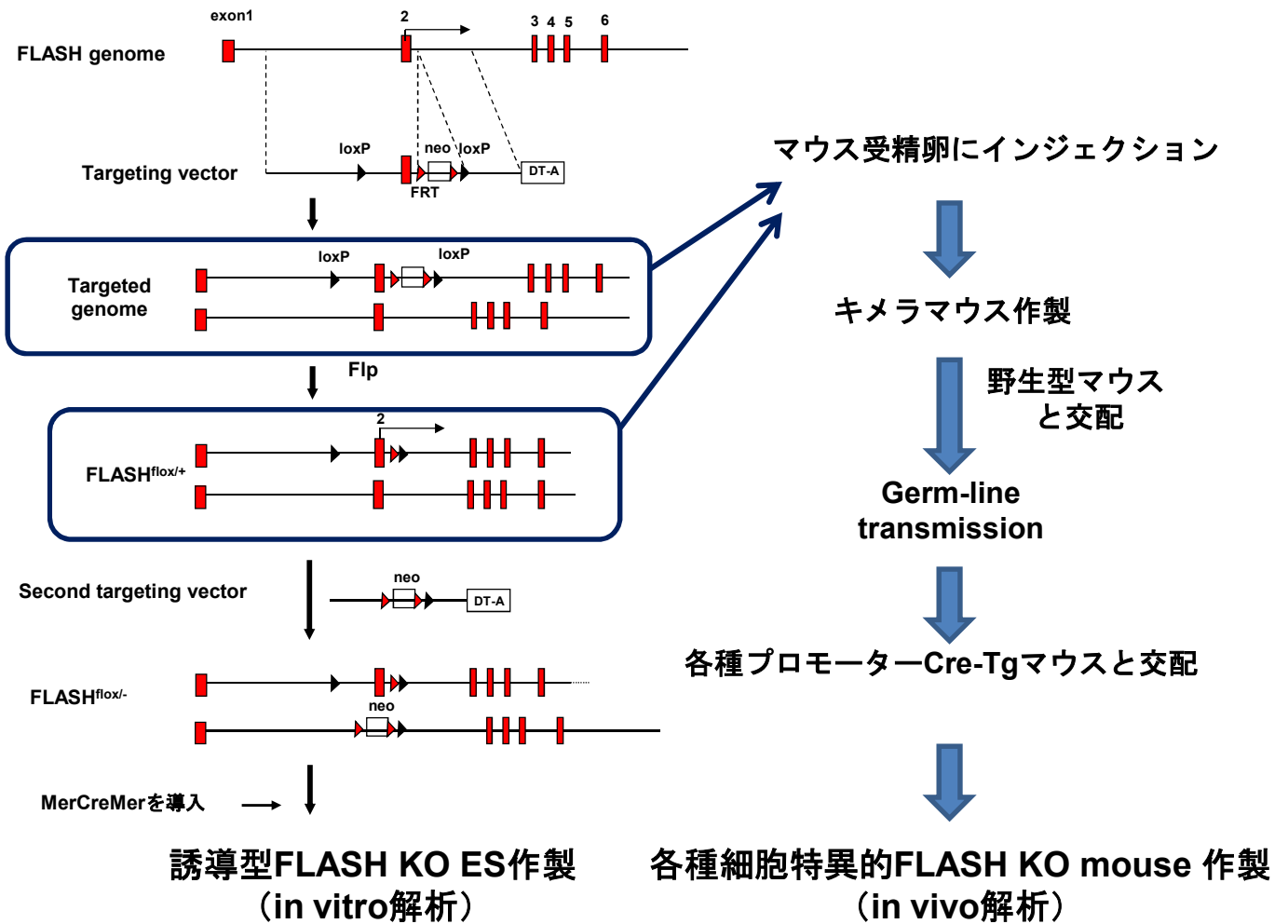


図13 FLASH conditional KO mouseの作製方法

ターゲティングベクターをノックアウトマウス作製可能なES細胞株TT2に導入した細胞、またはそのES細胞にFlpを発現させてネオマイシン耐性遺伝子を除去した細胞をマウス受精卵にマイクロインジェクションし、キメラマウスを作製した。

キメラマウスと野生型マウスを交配し、Germ-line transmissionを確認した仔マウスをさらに各種細胞特異的Cre発現トランスジェニック (各種プロモーター-Cre-Tg)マウスと交配することによって、各種細胞特異的なFLASH KO mouse (FLASH conditional KO mouse)を作製することができる。

## 引用文献

1. Yonehara S, Ishii A, Yonehara M (1989) A cell-killing monoclonal antibody (anti-Fas) to a cell surface antigen co-downregulated with the receptor of tumor necrosis factor. *J Exp Med* 169: 1747-1756.
2. Imai Y, Kimura T, Murakami A, Yajima N, Sakamaki K, et al. (1999) The CED-4-homologous protein FLASH is involved in Fas-mediated activation of caspase-8 during apoptosis. *Nature* 398: 777-785.
3. Milovic-Holm K, Krieghoff E, Jensen K, Will H, Hofmann TG (2007) FLASH links the CD95 signaling pathway to the cell nucleus and nuclear bodies. *EMBO J* 26: 391-401.
4. 桐山真利亜 (2010) 細胞周期 S 期の進行に必要な FLASH の機能解析 博士論文(甲第 15552 号)
5. Yang XC, Burch BD, Yan Y, Marzluff WF, Dominski Z (2009) FLASH, a proapoptotic protein involved in activation of caspase-8, is essential for 3' end processing of histone pre-mRNAs. *Mol Cell* 36: 267-278.
6. Morgan R, Nalliah A, Morsi El-Kadi AS (2004) FLASH, a component of the FAS-CAPSASE8 apoptotic pathway, is directly regulated by Hoxb4 in the notochord. *Dev Biol* 265: 105-112.
7. Chen S, Evans HG, Evans DR (2012) FLASH knockdown sensitizes cells to Fas-mediated apoptosis via down-regulation of the anti-apoptotic proteins, MCL-1 and Cflip short. *PLoS One* 7: e32971.
8. Choi YH, Kim KB, Kim HH, Hong GS, Kwon YK, et al. (2001) FLASH coordinates

NF-kappa B activity via TRAF2. *J Biol Chem* 276: 25073-25077.

9. Kino T, Chrousos GP (2003) Tumor necrosis factor alpha receptor- and Fas-associated FLASH inhibit transcriptional activity of the glucocorticoid receptor by binding to and interfering with its interaction with p160 type nuclear receptor coactivators. *J Biol Chem* 278: 3023-3029.
10. Flotho C, Coustan-Smith E, Pei D, Iwamoto S, Song G, et al. (2006) Genes contributing to minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia: prognostic significance of CASP8AP2. *Blood* 108: 1050-1057.
11. Callens C, Baleyrier F, Lengline E, Ben Abdelali R, Petit A, et al. (2012) Clinical impact of NOTCH1 and/or FBXW7 mutations, FLASH deletion, and TCR status in pediatric T-cell lymphoblastic lymphoma. *J Clin Oncol* 30: 1966-1973.
12. Lee KD, Pai MY, Hsu CC, Chen CC, Chen YL, et al. (2012) Targeted Casp8AP2 methylation increases drug resistance in mesenchymal stem cells and cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 422: 578-585.
13. Barcaroli D, Dinsdale D, Neale MH, Bongiorno-Borbone L, Ranalli M, et al. (2006) FLASH is an essential component of Cajal bodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14802-14807.
14. Barcaroli D, Bongiorno-Borbone L, Terrinoni A, Hofmann TG, Rossi M, et al. (2006) FLASH is required for histone transcription and S-phase progression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 14808-14812.
15. Hummon AB, Pitt JJ, Camps J, Emons G, Skube SB, et al. (2012) Systems-wide RNAi analysis of CASP8AP2/FLASH shows transcriptional deregulation of the replication-dependent histone genes and extensive effects on the transcriptome

- of colorectal cancer cells. *Mol Cancer* 11: 1.
16. Bongiorno-Borbone L, De Cola A, Barcaroli D, Knight RA, Di Ilio C, et al. (2010) FLASH degradation in response to UV-C results in histone locus bodies disruption and cell-cycle arrest. *Oncogene* 29: 802-810.
  17. Yang XC, Xu B, Sabath I, Kunduru L, Burch BD, et al. (2011) FLASH is required for the endonucleolytic cleavage of histone pre-mRNAs but is dispensable for the 5' exonucleolytic degradation of the downstream cleavage product. *Mol Cell Biol* 31: 1492-1502.
  18. Kiriya M, Kobayashi Y, Saito M, Ishikawa F, Yonehara S (2009) Interaction of FLASH with arsenite resistance protein 2 is involved in cell cycle progression at S phase. *Mol Cell Biol* 29: 4729-4741.
  19. Wilson MD, Wang D, Wagner R, Breysens H, Gertsenstein M, et al. (2008) ARS2 is a conserved eukaryotic gene essential for early mammalian development. *Mol Cell Biol* 28: 1503-1514.
  20. Gruber JJ, Zatechka DS, Sabin LR, Yong J, Lum JJ, et al. (2009) Ars2 links the nuclear cap-binding complex to RNA interference and cell proliferation. *Cell* 138: 328-339.
  21. Gruber JJ, Olejniczak SH, Yong J, La Rocca G, Dreyfuss G, et al. (2012) Ars2 promotes proper replication-dependent histone mRNA 3' end formation. *Mol Cell* 45: 87-98.
  22. Lee EC, Yu D, Martinez de Velasco J, Tessarollo L, Swing DA, et al. (2001) A highly efficient *Escherichia coli*-based chromosome engineering system adapted for recombinogenic targeting and subcloning of BAC DNA. *Genomics* 73: 56-65.

23. Vittet D, Prandini MH, Berthier R, Schweitzer A, Martin-Sisteron H, et al. (1996) Embryonic stem cells differentiate in vitro to endothelial cells through successive maturation steps. *Blood* 88: 3424-3431.
24. Yagi R, Kohn MJ, Karavanova I, Kaneko KJ, Vullhorst D, et al. (2007) Transcription factor TEAD4 specifies the trophoctoderm lineage at the beginning of mammalian development. *Development* 134: 3827-3836.
25. Lanner F (2014) Lineage specification in the early mouse embryo. *Exp Cell Res* 321: 32-39.
26. Wu G, Gentile L, Fuchikami T, Sutter J, Psathaki K, et al. (2010) Initiation of trophoctoderm lineage specification in mouse embryos is independent of Cdx2. *Development* 137: 4159-4169.
27. Niwa H, Toyooka Y, Shimosato D, Strumpf D, Takahashi K, et al. (2005) Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophoctoderm differentiation. *Cell* 123: 917-929.
28. Kriehoff E, Milovic-Holm K, Hofmann TG (2007) FLASH meets nuclear bodies: CD95 receptor signals via a nuclear pathway. *Cell Cycle* 6: 771-775.
29. Bongiorno-Borbone L, De Cola A, Vernole P, Finos L, Barcaroli D, et al. (2008) FLASH and NPAT positive but not Coilin positive Cajal Bodies correlate with cell ploidy. *Cell Cycle* 7: 2357-2367.
30. De Cola A, Bongiorno-Borbone L, Bianchi E, Barcaroli D, Carletti E, et al. (2012) FLASH is essential during early embryogenesis and cooperates with p73 to regulate histone gene transcription. *Oncogene* 31: 573-582.
31. Arnold DR, Francon P, Zhang J, Martin K, Clarke HJ (2008) Stem-loop binding

protein expressed in growing oocytes is required for accumulation of mRNAs encoding histones H3 and H4 and for early embryonic development in the mouse. *Dev Biol* 313: 347-358.

32. Jaeger S, Barends S, Giege R, Eriani G, Martin F (2005) Expression of metazoan replication-dependent histone genes. *Biochimie* 87: 827-834.
33. Marzluff WF, Gongidi P, Woods KR, Jin J, Maltais LJ (2002) The human and mouse replication-dependent histone genes. *Genomics* 80: 487-498.
34. Shigeoka T, Kawaichi M, Ishida Y (2005) Suppression of nonsense-mediated mRNA decay permits unbiased gene trapping in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res* 33: e20.
35. Tachiwana H, Osakabe A, Kimura H, Kurumizaka H (2008) Nucleosome formation with the testis-specific histone H3 variant, H3t, by human nucleosome assembly proteins in vitro. *Nucleic Acids Res* 36: 2208-2218.
36. Tachiwana H, Kagawa W, Osakabe A, Kawaguchi K, Shiga T, et al. (2010) Structural basis of instability of the nucleosome containing a testis-specific histone variant, human H3T. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 10454-10459.
37. Schrode N, Xenopoulos P, Piliszek A, Frankenberg S, Plusa B, et al. (2013) Anatomy of a blastocyst: cell behaviors driving cell fate choice and morphogenesis in the early mouse embryo. *Genesis* 51: 219-233.
38. Hodl M, Basler K (2009) Transcription in the absence of histone H3.3. *Curr Biol* 19: 1221-1226.
39. Narita T, Yung TM, Yamamoto J, Tsuboi Y, Tanabe H, et al. (2007) NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone

mRNAs. *Mol Cell* 26: 349-365.

40. Brocato J, Fang L, Chervona Y, Chen D, Kiok K, et al. (2014) Arsenic induces polyadenylation of canonical histone mRNA by downregulating stem-loop binding protein gene expression. *J Biol Chem*.
41. Lin CJ, Koh FM, Wong P, Conti M, Ramalho-Santos M (2014) Hira-mediated H3.3 incorporation is required for DNA replication and ribosomal RNA transcription in the mouse zygote. *Dev Cell* 30: 268-279.
42. Lin CJ, Conti M, Ramalho-Santos M (2013) Histone variant H3.3 maintains a decondensed chromatin state essential for mouse preimplantation development. *Development* 140: 3624-3634.



## 謝辞

本研究を行うにあたり終始ご指導いただきました米原伸教授に心から感謝致します。

理化学研究所眞貝洋一博士には Conditional targeting vector の作製や ES 細胞クローンの作製においてご指導と多くのアドバイスを頂き、ES 細胞株 TT2、MerCreMer 発現プラスミドを頂きました。京都大学ウイルス研究所影山龍一郎教授には ES 細胞の操作方法をご指導頂き、ES 細胞株 TT2 を頂きました。理化学研究所丹羽仁史博士には Cdx2ER 発現プラスミドを頂きました。厚く御礼申し上げます。

研究に関するアドバイスや実験手法をご指導いただきました米原研究室酒巻和弘准教授、村上昭助教、李慶權助教、先輩の皆様に深く感謝致します。また、研究に打ち込める環境をご提供いただきました米原研究室スタッフの方々、日々議論し刺激をいただいた同期、後輩の方々に深く感謝致します。

最後に私の研究生活を支えていただいた両親、家族に感謝を伝えたいと思います。

本学位論文は以下の学術論文の内容に基づいて書かれたものである。

Yoshitaka Minamida, Masataka Someda, and Shin Yonehara

FLASH/casp8ap2 Is Indispensable for Early Embryogenesis but Dispensable for Proliferation and Differentiation of ES Cells

*PLoS ONE*, volume 9, issue 9, e108032, 2014