

肝細胞の発生と分化を司る遺伝子システムにおけるHexの役割の解明

●野口 民夫

名古屋大学大学院生命農学研究科

〈研究の目的と進め方〉

肝細胞の発生・分化はマウス胚においては胎生期8～8.5日目には心臓中胚葉からのFGFの作用を受けて、前腸内胚葉の一部が肝芽細胞への分化を開始することで始まり、一連の過程を経て成熟細胞に分化する。しかし、これらの過程の分子機構は明らかでない。私どもはホメオドメインタンパク質Hexが肝発生の開始に必須の転写因子であることを明らかにしたが、肝細胞の分化維持にも必須であると考えている。本研究は肝細胞の発生と分化を司る遺伝子システムにおけるHexの役割を解明するとともに、そのシステム全体を明らかにすることを目的とする。

〈研究開始時の研究計画〉

- 1) Hex遺伝子のコンディショナルノックアウトマウスの作製をCre/loxPシステムを用いて行い、成熟動物の肝細胞でHex遺伝子を欠損させた場合、肝臓の機能にどのような影響がでるかを経験的マーカーを用いて検討する。
- 2) Hexの標的遺伝子を同定するとともに、Hexと相互作用して転写を調節するタンパク質の同定を行う。
- 3) Hex遺伝子の組織特異的、発生段階特異的な発現を規定しているDNA領域を培養細胞やトランスジェニックマウスの系を用いたレポーターアッセイで同定する。

〈研究期間の成果〉

- 1) マウスHex遺伝子の第1エキソンをloxPサイトで挟んだターゲティングベクターを作製し、ES細胞に導入して、組み換えを起こしたES細胞の単離を試みたが、成功しなかった。期間終了後、そのES細胞の単離に成功し、コンディショナルノックアウトマウスの作製にも成功している。Creリコンビナーゼを肝臓で発現させるとHex遺伝子の第1エキソンが除かれるため、Hex遺伝子の発現が著しく損なわれることを確認している。現在は、そのことによる影響を解析中である。
- 2) HexはHNF1alphaと機能的に相互作用し、HNF1alphaの活性を上げることを見いだした。この刺激はHexのホメオドメインとそのC末側の領域全体を必要とした。期間終了後、さらに解析を進め、肝細胞でHexを過剰発現すると、HNF1alphaの標的遺伝子であるL型ピルビン酸キナーゼ遺伝子の発現が亢進することを見いだした。Hexはホメオドメインを介してHNF1alphaのPOU-ホメオドメインと直接に結合するが、この結合は細胞内でも認められることを示した。(成果2)
- 3) レポーターアッセイの結果、-199までの領域に存在する4箇所のGCボックスがHex遺伝子の肝細胞でのプロモーター活性に重要であった。これらのボックスにはSp1やSp3が結合し、ともに転写活性を上昇させたが、Sp1の作用の方が強かった。(成果1)

〈国内外での成果の位置づけ〉

成果1が数編の論文で引用されている。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

コンディショナルノックアウトマウスの作製は、ターゲティングベクターの作製に予想以上の時間をとられたためと組み換えES細胞の単離に時間がかかったために期間内に行うことはできなかった。

〈今後の課題〉

コンディショナルノックアウトマウスを使って、Hex遺伝子を欠損させたとき、肝細胞にどのような影響があるかを種々の角度から検討する必要がある。また、マイクロアレイ法によりHexの標的遺伝子の候補を網羅的に解析することにより、標的遺伝子の同定を進める必要がある。Hex遺伝子の肝細胞での転写には4箇所のGCボックスに作用するSp1/Sp3が重要であるが、これだけでHex遺伝子の組織特異的発現を説明できないので、さらなる解析が望まれる。

〈研究期間の全成果公表リスト〉

- 1) 論文
1. Kikkawa, E., Hinata, M., Keng, V. W., Zaw Myint, Sato, A., Yamada, K., Tanaka, T., and Noguchi, T.: Spfamily members stimulate transcription of the Hex gene via interactions with GC boxes, *J. Biochem.*, 130, 885-891 (2001).
2. Tanaka, H., Yamamoto, T., Ban, T., Satoh, S., Tanaka, T., Shimoda, M., Miyazaki, J., and Noguchi, T.: Hex stimulates the hepatocyte nuclear factor 1 alpha-mediated activation of transcription, *Arch. Biochem. Biophys.*, 442, 117-124 (2005).