

氏名（本籍）	安井 裕子（三重県）		
学位の種類	博士（薬科学）		
学位授与番号	甲第 10 号		
学位授与日付	平成 24 年 3 月 25 日		
専攻	創薬科学専攻		
学位論文題目	胎盤特異的転写因子 GCMa の新規発現調節機構に関する研究 (Novel regulatory mechanisms involved in the expression of placenta-specific transcription factor GCMa)		
学位論文審査委員	(主査) 教授 赤尾 幸博		
	(副査) 教授 武藤 吉徳		
	(副査) 准教授 上田 浩	(副査) 教授 北出 幸夫	

#### 論文内容の要旨

妊娠高血圧症候群を始めとした様々な妊娠病態の原因として、胎盤の形成や機能の異常が考えられる。正常な胎盤形成には様々な生体分子の時間的空間的な制御が関わっているが、それらの詳細はまだ完全に理解されていない。その生体分子の一つとして *Glial cells missing a* (GCMa) がある。GCMa は、GCM モチーフと呼ばれる DNA 結合領域を持つ GCM 転写因子ファミリーのひとつで、胎盤に強く発現することが知られている。GCMa はこれまでに、アロマターゼ遺伝子を始め *placental growth factor* や *syncytin* の遺伝子発現制御に関与していることが明らかになっており、GCMa が胎盤で機能する遺伝子の組織特異的な発現に関与していることが推測される。また、GCMa は栄養膜細胞から合体栄養膜細胞への分化過程に関与することが示唆されており、これらのことから GCMa の発現制御は胎盤の正常な機能や発達に重要であると考えられる。そこで本研究では GCMa の発現調節機構に注目し、GCMa の発現に影響を及ぼす新規シグナル経路についての検討を行った。

protein kinase C (PKC) 活性化剤である phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) が PKC および extracellular signal-regulated kinase (ERK) 依存的なシグナルを介して、栄養膜細胞の分化を促進することが報告されている。しかし、PKC シグナルや PMA が GCMa の発現制御機構にどのように影響するか未だ報告されていない。そこで、GCMa を内在的に発現しているヒト胎盤由来 JEG-3 細胞を用いて、PMA の GCMa の発現への影響について検討した。その結果、PMA 刺激により一過性に GCMa のタンパク質量が減少することを見出した。この減少が刺激後 1 時間で観察されたことから、細胞内タンパク質分解系の働きが促進されている可能性が考えられた。そこで、PMA の GCMa 分解系への影響を検討したところ、PMA により PKC および mitogen-activated protein kinase kinase (MEK) 依存的なシグナルを介して、GCMa の分解が促進されることが明らかになった。

これまでに、GCMa のリン酸化が GCMa の分解を促進するという報告があることから、PMA による GCMa 分解促進過程において、GCMa のリン酸化が関与しているか検討したところ、PMA が PKC および MEK/ERK 依存的なシグナルを介し GCMa のリン酸化を増加させることが明らかとなった。さらに、PMA による GCMa のリン酸化部位を調べたところ、328、378 および 383 番目のセリン残基が PMA によってリン酸化される可能性が示唆された。野生型の GCMa と比べ 3 つのセリン残基すべてに変異を入れた変異体でそのタンパク質分解が抑制されることが明らかとなった。またこのとき、GCMa のユビキ

チン化レベルは PMA によって増加するが、3 つのセリン残基全てに変異を入れた変異体では、PMA によるユビキチン化レベルの増加が見られなかった。これらのことから、この 3 つのセリン残基のリン酸化が PMA によるユビキチン化を介した GCMa の分解過程に関与していることが示唆された。

GCMa の 378 および 383 番目のセリン残基は GCMa の転写活性化ドメインにあることから、これらのセリン残基のリン酸化が GCMa の転写活性の制御に関与しているかどうか検討した。その結果、GCMa の転写活性は PMA によって PKC および MEK/ERK 依存的なシグナルを介した GCMa の 328、378、383 番目のセリン残基リン酸化によって促進されている可能性が示唆された。

以上の結果から、GCMa は PMA により PKC および MEK/ERK 依存的にリン酸化され、GCMa の分解および転写活性が促進されることが明らかとなった。このときの GCMa の活性について評価するため JEG-3 細胞でのヒト絨毛性ゴナドトロピン (hCG) の産生量を調べたところ、2 倍に増加した。これは、cAMP シグナルが GCMa の活性増加を介し hCG 産生量を 10 倍以上増加させることに比べわずかであることから、PKC および MEK/ERK シグナルは GCMa の活性の上限を設定する役割を担っている可能性が考えられた。

本研究を含めこれまでの報告から、GCMa は胎盤の発達や機能において重要な役割を担っていることが示唆されており、胎盤の形成不全が原因で生じる妊娠高血圧症候群や子宮内発育不全などの疾患と関連している可能性が考えられる。また妊娠高血圧症候群を発症した胎盤では GCMa の発現レベルが低下しているとの報告があることから、GCMa の発現調節における異常が疾患の発症につながるということが予想される。以上のことから、本研究の成果は種々の妊娠病態の解明および治療法開発に貢献するものと考えられる。

#### 論文審査結果の要旨

Glial cells missing (GCM)は、ほ乳類で GCMa と GCMb といった 2 種のホモログが存在し、特に GCMa は胎盤で強く発現し、GCM モチーフと呼ばれる DNA 結合領域をもつ。一方、種々の胎盤特異的に発現する遺伝子のプロモーター領域には、この GCMa と特異的に結合する配列が存在することから、胎盤で機能する様々な遺伝子の組織特異的発現への GCMa の関与が推測される。また、胎盤での栄養膜細胞から合胞体栄養膜細胞への分化にも、GCMa の関与が示唆されており、GCMa の発現制御が、胎盤の正常発達に重要であると考えられている。このことは、現在問題になっている高血圧症候群や子宮内発育不全などの疾患の発症の原因とも結びつくと考えられる。そこで申請者は、GCMa の発現調節機構解明を目的とし、GCMa の発現に影響を及ぼす細胞内シグナル経路についての検討を行った。その結果、GCMa の新規発現調節機構に関する興味深い知見を得たので、その詳細を報告している。

申請者は、GCMa に対する特異的なモノクローナル抗体を作製し、その抗体が、GCMa に特異的に作用することを確認、イムノブロットや免疫組織染色など幅広い GCMa の機能を探るツールとして利用可能であることを示した。現在まで GCMa は、細胞内 cAMP により調節を受けていることが知られていたが、申請者は、細胞の phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 処理により細胞内 protein kinase C の活性化によっても、GCMa の細胞内の量が増加することを明らかにした。さらに、その変化は、生理的な条件では上皮成長因子(EGF)が行なっている可能性も明らかにした。また、これらの刺激により、MEK/ERK 経路が働き、GCMa がリン酸化されることにより、GCMa 量が減少することがわかった。さらに、申請者は、GCMa の点変異体の作製により、GCMa のリン酸化されるアミノ酸が、328 番目、378

番目および 383 番目のセリンであることを示した。また、これらのセリンのリン酸化が GCMa のユビキチン化を介する分解に必要であることも明らかにした。さらに、これらのリン酸化が GCMa の転写活性化能にも関与していることを明らかにした。最終的に GCMa のリン酸化が、PMA や EGF により制御される遺伝子発現に重要な働きをしていることを示した。これらの知見は、胎盤形成にかかわる高血圧症候群や子宮内発育不全などの疾患の原因解明やそれに関わる創薬等に大いに貢献するものと考えられる。以上に詳しく述べたように、本論文では、GCMa に対する特異的抗体の作製ならびに GCMa の新規発現調節機構と胎盤特異的蛋白質の発現との関係を見出した。本知見は、胎盤形成に関わる疾患発症メカニズムと GCMa の関わりを示すものであり、この論文の有用性は極めて高い。従って、審査の結果、この論文を学位論文に値するものと判定した。

#### 最終試験結果の要旨

この論文の主要部分は、審査付き論文として公表済みの 1 編の論文である。この論文が学位論文として完成された内容を有することを確認した。

公聴会において、学位論文の内容を中心として、またこれに関する事項、即ち胎盤特異的転写因子 GCMa に対する特異的な抗体の作製とその意義、また、細胞内における GCMa の機能解析法、さらに妊娠高血圧症などの病態との関わりや本研究の今後の展開や将来性などに関して諮問を行った。論文申請者から、十分な内容を持った回答が得られたので、最終試験にも合格したと判定した。

#### 論文リスト

Yasui Y., Yamada K., Takahashi S., Sugiura-Ogasawara M., Sato K., Miyazawa D., Sugiyama T., Kitade Y., and Ueda H. PMA induces GCMa phosphorylation and alters its stability via the PKC- and ERK-dependent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **417**:1127-1132. (2012)

【Impact Factor: 2.595】