

## PI ポリアミドによるカドヘリン遺伝子発現抑制と幹細胞の維持・分化

日大生産工(院) ○佐野 由樹  
日大生産工 野呂 知加子

## 1 まえがき

PI(Pyrrole-Imidazole)ポリアミドとは、N-メチルピロール単位(Py)、N-メチルイミダゾール単位(Im)及びγ-アミノ酪酸単位を含むピロールイミダゾールポリアミドである。このPIポリアミドは、低分子化合物(分子量2000程度)なので優れた細胞膜浸透性を有しており、DNA二重らせん領域の副溝内に結合することが知られている。γ-アミノ酪酸単位の部位で折りたたまれてU字型のコンフォメーションをとり、C-G塩基対に対してはPy/Im対が、G-C塩基対に対してはIm/Py対が、A-T塩基対及びT-A塩基対に対してはいずれもPy/Py対がそれぞれ対応し、塩基配列特異的にDNAに結合することができる。遺伝子発現制御部位に対して設計すれば、転写因子・酵素の結合を阻害し、その結果遺伝子発現を抑制することができる。またDNAへの結合親和性は転写因子に匹敵していることも報告されている。

本研究では、細胞間で細胞間接着構造を形成し、多細胞動物の体の形成と秩序維持に重要な役割を果たしているカドヘリンの発現制御部位に対して設計した6種のPIポリアミドを、全能性をもつマウスES細胞D3株培養時に添加し、カドヘリン発現抑制による幹細胞分化に及ぼす影響を検討した。

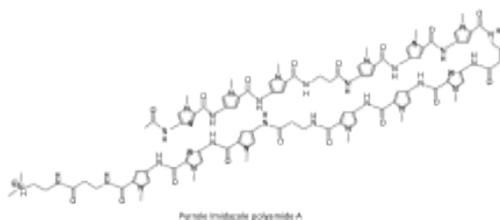


Fig. 1 PI ポリアミドの構造の例

## 2 実験方法および測定方法

E-カドヘリン遺伝子発現制御部位に対して設計した6種のPIポリアミドCAAT配列に対するA, CAAT配列の一部を改変したAmismatch, E-box配列に対するB, E-palに対するC, CAAT配列の一部を含んでいる部位に対するF,ネガティブコントロールとしてG mismatch)それぞれ10μMをDimethyl sulfoxide(DMSO)に溶かし、全能性をもつマウスES細胞D3株播種時に培養液(10%牛胎児血清FBS, 1%抗生物質PS添加, DMEM)中に添加した細胞、そしてコントロールとして、培養液にDMSOのみを添加した細胞、培養液のみの細胞、これら8種類の細胞を3日間培養及び細胞形態の観察を行った。

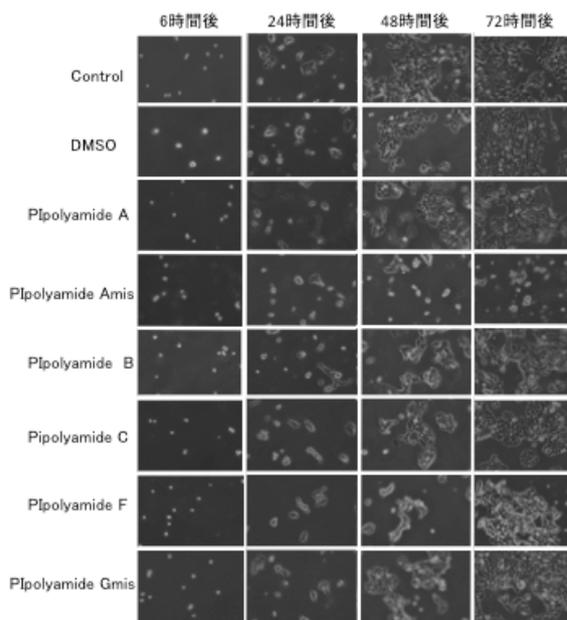


Fig. 2 PI ポリアミド添加による細胞形態の変化

Role of Cell Adhesion Molecule Cadherin in Stem Cell Pluripotency and Differentiation  
Yuki SANO and Chikako YOSHIDA-NORO

また培養1日目から 3 日目の細胞からそれぞれRNAを抽出し、RT-PCRによりカドヘリンおよび分化の指標となる遺伝子群についての解析を行った。

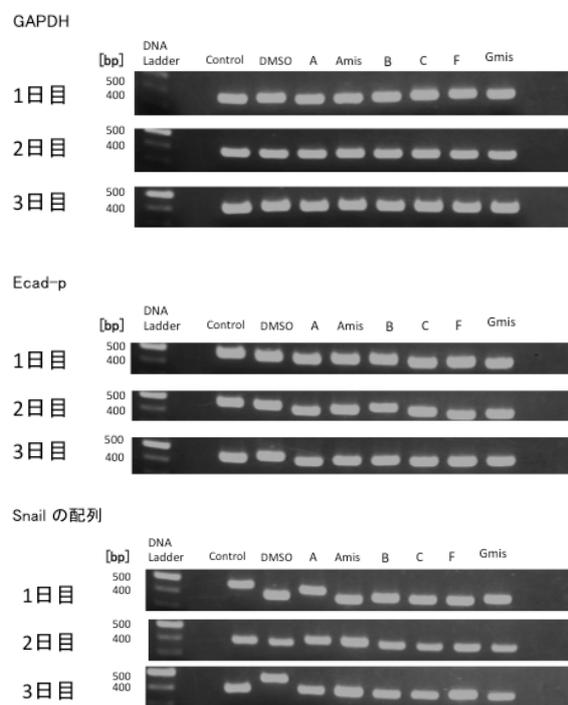


Fig. 3 遺伝子発現解析結果

### 3 実験結果および検討

72時間後の細胞形態変化の比較では、Controlの細胞とPIポリアミドを加えた細胞とで、細胞形態に変化がみられた。具体的には、PIポリアミド Aを添加した細胞では、細胞がやや平たく広がる傾向があり、PIポリアミド BまたC,Fを添加した細胞では細胞間の間隙が広がり細胞が丸くなる傾向が認められた。またPIポリアミド G mismatchそしてA mismatchは、ネガティブコントロールとして用いたが、G mismatchを添加した細胞ではControlの細胞と変化がほとんどみられなかったのに対して、A mismatchを添加した細胞では、Aと同様に細胞が平たく広がる傾向がみられ、さらに培養皿に対しての接着力の低下もみられた。

RT-PCR による遺伝子発現群の解析結果では、PIポリアミド添加によりE-カドヘリン遺伝子の発現抑制は各PIポリアミドを添加した細胞とControlの細胞に変化はみられなかった。

またEMT 関連遺伝子 Snailについては、PIポリアミド F, A mismatchを添加した細胞は、Controlの細胞よりも遺伝子発現が亢進していた。以上の結果より、PIポリアミド FそしてA mismatch以外を添加した細胞は、効果はみられなかった。またPIポリアミドの効果が見られるFそしてA mismatchではES細胞分化は促進されているが、E-カドヘリンの遺伝子発現を完全に抑制することはできなかった。今後は効果がみられなかったPIポリアミドの添加条件および方法を改良し、E-カドヘリン遺伝子発現抑制と細胞分化遺伝子発現のタイムコースについて検討したい。

### 4 まとめ

カドヘリン遺伝子発現抑制するように設計したPIポリアミドを培養時にES細胞D3株に添加し、カドヘリン遺伝子発現抑制を行った。

結果としては、細胞の形態変化は確認することができた。しかし遺伝子発現解析では、数種のPIポリアミド添加細胞で分化の傾向がみられたものの、いずれの細胞も完全にカドヘリンを抑制することはできていなかった。今後、PIポリアミドの添加条件の検討、そしてE-カドヘリン遺伝子発現抑制と細胞分化のタイムコースについて検討をおこなっていく。

#### 「参考文献」

- 1) Yoshida C, Takeichi M. (1982). Teratocarcinoma cell adhesion : Identification of a cell surface protein involved in calcium-dependent cell aggregation. *Cell* 28, 217-224.
- 2) Yoshida-Noro C, Suzuki N, Takeichi M. (1984) Molecular nature of the calcium-dependent cell-cell adhesion system in mouse teratocarcinoma and embryonic cells studied with a monoclonal antibody. *Developmental Biology* 1984 Jan; 101(1): 19-27.
- 3) Yoshida-Noro C, Takeichi M, Okada TS (1985) Detection of the initial step of mesenchymal differentiation of teratocarcinoma cells using the monoclonal antibody ECCD-1. *Development Growth and Differentiation* 27, 673-678.