

[別 紙 1]

論文の内容の要旨

論文題目 ES 細胞における LIF の下流分子の探索

指導教官

平成 12 年度～平成 14 年度 横田 崇 教授
平成 15 年度 服部成介 教授

東京大学大学院 医学系研究科
平成 12 年 3 月入学

医学博士課程
分子細胞生物学専攻

氏名 赤木紀之

マウス胚性幹細胞 (ES 細胞) は胚盤胞の内部細胞塊より樹立された多分化能を持つ細胞株である。この細胞はサイトカイン leukemia inhibitory factor (LIF) 存在下で未分化状態を維持したまま増殖を、即ち“自己複製”を繰り返す。ES 細胞が様々な体細胞へ分化する事は示されているが、自己複製の分子機構は未だ不明な点が多い。現在までの知見を総括すると、ES 細胞の自己複製には、LIF 刺激による転写因子 STAT3 の活性化、及び未分化な ES 細胞に特異的な転写因子 Oct-3/4 の発現誘導が必要不可欠であるという 2 点に集約される。私はこの 2 つの転写因子に着目し、STAT3 の下流遺伝子の探索、及び Oct-3/4 と結合する因子の探索という独立した二つのアプローチを用いて、ES 細胞における LIF シ

ゲナルの下流分子の解析を行った。

まず私は、STAT3 の下流遺伝子を探索する目的で、DNA chip 解析を行った。この解析には 4-hydroxytamoxifen (4HT)により STAT3 の活性が調節可能な ES 細胞株 (STAT3ER ES 細胞株) を用いた。この細胞株は STAT3 とエストロジェン受容体(ER)のホルモン結合領域を融合した遺伝子(STAT3ER)を発現しているため、4HT の添加により STAT3ER が活性化され、自己複製が可能となる。そこで 4HT 存在下と非存在下 (即ち STAT3 の活性化と不活性化) で STAT3ER ES 細胞を培養し、STAT3 の下流遺伝子を DNA chip 法により探索した。その結果、発現量に有意な差がある遺伝子として、zinc finger protein 57 (Zfp57)を得た。この分子の未分化状態特異的な発現はノーザンおよびウエスタンブロット法からも確認できた。次に Zfp57 が 2 つの転写因子 STAT3 と Oct-3/4 のどちらの下流に存在するか検討したところ、(1) ドミナントネガティブ変異体 STAT3 を ES 細胞に過剰発現させると、Zfp57 mRNA の発現量が減少すること、(2) テトラサイクリン(Tet)の添加により Oct-3/4 の発現調節が可能な ES 細胞株(ZHBTc4 ES 細胞株)において、Oct-3/4 の発現を停止させても、Zfp57 mRNA の発現量は変化しないことを見出した。このことは Zfp57 が STAT3 の下流遺伝子であり、Oct-3/4 のそれではないことを示唆している。また RNAi 法により内在性 Zfp57 の発現の抑制を試みた。Zfp57 の塩基配列 919-937 を標的配列とし、この配列の二本鎖 RNA を発現する発現ベクターを作成した。この二本鎖 RNA 発現ベクターを ES 細胞へ導入したところ、(1) 内在性 Zfp57 の発現の抑制が観察されること、(2) 内在性 Zfp57 の発現が抑制されても ES 細胞は自己複製を繰り返すことを見出した。これらの結果から、Zfp57 は ES 細胞における自己複製への直接の関与は認められないものの、STAT3 の新しい下流遺伝子であることが示された。

一方私は、Oct-3/4 と結合する因子を探索するために yeast two-hybrid 法

を用いた。マウス ES 細胞 cDNA ライブラリーのスクリーニングの結果、Oct-3/4 と結合する因子として、核内ホルモン受容体に属する転写因子 DAX-1 を得た。まず、ES 細胞における DAX-1 mRNA の発現を検討したところ、DAX-1 は未分化な ES 細胞では発現しているが、培地から LIF を除去し分化誘導するとすると速やかに発現が停止するという結果を得た。また DAX-1 が 2 つの転写因子 STAT3 と Oct-3/4 のどちらの下流であるかを検討したところ、(1) STAT3ER ES 細胞で、培地から 4HT を除去し STAT3 を不活性化させると DAX-1 mRNA の発現が減少すること、(2) ドミナントネガティブ変異体 STAT3 を ES 細胞に過剰発現させると、DAX-1 mRNA の発現量が減少すること、(3) ZHBTc4 ES 細胞株で Tet 添加により Oct-3/4 の発現を停止させると、DAX-1 mRNA の発現も速やかに停止する一方、(4) その後 Tet を除去し再び Oct-3/4 の発現を回復させると DAX-1 の発現も回復することを見出した。これは DAX-1 の遺伝子発現が、STAT3 と Oct-3/4 の両者により調節されていることを示唆している。DAX-1 は、生殖腺や副腎などでの解析が盛んにされており、その遺伝子発現は転写因子 SF-1 によって調節されている事が知られている。しかしながら ES 細胞には SF-1 が発現していないことから、Oct-3/4 を介した新たな経路で DAX-1 の遺伝子発現が制御されていると考えている。次に私は、Tet による DAX-1 の発現調節可能な ES 細胞株を樹立した。この細胞株は Tet 除去により DAX-1 が過剰発現する細胞株で、その ES 細胞への影響を観察した結果、(1) DAX-1 を過剰発現させると ES 細胞は一斉に分化を始め、(2) いくつかの分化マーカーから、その細胞は原始内胚葉や原始外胚葉などに分化することを明らかにした。これは Oct-3/4 を ES 細胞で過剰発現させた場合と同じ表現型である。発生段階において、Oct-3/4 は原始内胚葉で一時的に Oct-3/4 の発現量が上昇し、胚体外組織の形成とともに消失する。Oct-3/4 の過剰発現による ES 細胞の分化は、この時期を反映している

考えられ、DAX-1 においても発生段階で一時的に発現量が上昇し、細胞を分化誘導する時期があると考えられる。DAX-1 はノックアウト解析がなされており、通常のジーンターゲット法では相同組換えが生じたES細胞株は得られなかったという報告がある。これは DAX-1 をノックアウトすると ES 細胞は自己複製ができなくなり、その結果として目的の細胞が得られなかったと考えられる。このことから、DAX-1 は ES 細胞で STAT3 と Oct-3/4 の 2 つの転写因子の下流で機能し、自己複製に関与する重要な因子の一つであると考えられる。

以上のように私は、独立した二つの手法を用いたことで、ES 細胞における LIF の下流分子として、Zfp57 と DAX-1 を得て、その興味深い生物学的・生化学的性質を明らかにした。今後は LIF シグナル以外の経路も含め、ES 細胞の自己複製における遺伝子ネットワークの解明が必須であると考えている。