

[別 紙 2]

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏 名 赤木 紀之

本研究はES細胞におけるLIFシグナルの下流分子の解析を行う目的で、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を行い、下記の結果を得ている。

1. STAT3の下流遺伝子を探索する目的で、DNA chip 解析を試みた。STAT3ER発現ES細胞を4HT存在下と非存在下、即ちSTAT3の活性化と不活性化状態で培養し、DNA chip 解析を行った。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。
2. Zfp57の未分化状態特異的な発現は、ノーザンブロット法およびウエスタンブロット法からも確認できた。
3. 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、(a)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、(b)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。
4. 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、内在性 Zfp57 の発現の抑制が観察された。そして、この配列に 1 塩基の変異が入ることで、その効果が消失することから、その特異性が高いことが示された。また、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。

5. 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。
6. 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。
7. 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、(a) 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、(b) 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、(c) 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、(d) 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。
8. Tet による外来性 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、(a) DAX-1 を過剰発現させると ES 細胞は一斉に分化を始め、(b) 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。

以上、本論文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。本研究は ES 細胞の自己複製における LIF の下流遺伝子群のネットワーク解明に、重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。