

[別紙 1]

論 文 の 内 容 の 要 旨

論文題目 ポリコムグループ遺伝子 *eed* の ES 細胞における機能解析

指導教官 横田崇教授（平成 12 年度より平成 14 年度まで）、服部成介教授
（平成 15 年度）

東京大学大学院医学系研究科

平成 12 年 4 月入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 白田雅幸

マウス胚性幹細胞（ES 細胞）は発生過程における胚盤胞の内部細胞塊より樹立された未分化な細胞株であり、生殖細胞を含むあらゆる細胞系列に分化できる能力を持つ。ES 細胞を未分化状態のまま培養するにはサイトカイン leukemia inhibitory factor(LIF)が必要であることが明らかになっている。LIF の受容体は、interleukin-6(IL-6)レセプターファミリーに共通の gp130 と LIF 受容体(LIFR)のヘテロダイマーであり、LIF 下流のシグナル伝達経路としては主に、SHP2 を介した MAP キナーゼ経路と、signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)の経路が存在する。これまでの解析により、これらのシグナル伝達経路のうち STAT3 経路のみで ES 細胞の未分化状態を維持できることが判明している。

本研究では、STAT3 とエストロゲン受容体(ER)の融合タンパク質(STAT3ER)を発現させているために、ER のリガンドである 4-hydroxytamoxifen(4HT)の添加

により STAT3 経路を活性化できる STAT3ER 発現 ES 細胞を用いて、STAT3 下流に存在する ES 細胞の未分化状態維持に関わる因子の探索を試みた。この系を用いることで、LIF 下流に存在するシグナルのうち、MAP キナーゼ経路等の未分化状態維持に不要なシグナル伝達経路の影響を排除できる利点がある。STAT3ER 発現 ES 細胞を 4HT 添加により未分化状態を保たせた細胞と、4HT を除去して分化誘導させた細胞の間で cDNA microarray 法を行い、未分化状態特異的に発現する遺伝子として eed(embryonic ectoderm development)を見出した。

そこでまず、ES 細胞分化に伴う eed mRNA の発現量の経時的変化を Northern blot で確認した。LIF 除去による分化誘導 2 日目で eed の発現は basal のレベルに低下し、5 日目までその発現量を維持していた。また、LIF 除去後 2 日目の時点で LIF 刺激を行うと、刺激後 2～4 時間後には eed の発現量が未分化状態とほぼ同量にまで回復した。このことから、eed が ES 細胞において LIF シグナルの下流にあることが判明した。次に、eed が STAT3 の下流遺伝子であるかどうかを確認した。ES 細胞にドミナントネガティブ STAT3 を発現させた細胞と empty vector もしくは野生型 STAT3 を発現させたコントロールの細胞から RNA を回収し RT-PCR を行ったところ、ドミナントネガティブ STAT3 を発現させた ES 細胞でコントロール ES 細胞に比べて eed の発現量が著しく低下することが判明した。また、STAT3ER 発現 ES 細胞において 4HT により eed の発現が維持されることが確認された。これらの結果から eed は STAT3 下流遺伝子であることが明らかになった。

ES 細胞の未分化状態の維持に必要な因子として STAT3 の他に転写因子 Oct-3/4 が知られている。そこで、eed が Oct-3/4 によっても制御される可能性を調べた。テトラサイクリンの添加によって Oct-3/4 の発現量が調節可能な ES 細胞株 ZHBTc4 を用いて、Oct-3/4 mRNA の発現変動に伴う eed mRNA の発現量の変化を RT-PCR 法により調べたところ、テトラサイクリンの添加によって Oct-3/4 mRNA の発現を停止させると、速やかに eed mRNA の発現も低下した。その後テトラサイクリンの除去により Oct-3/4 mRNA の発現を回復させると eed mRNA

の発現も回復した。このことから、Oct-3/4 の下流に eed が存在することが判明した。以上の実験から eed は STAT3 と Oct-3/4 という二つの未分化状態維持に重要な役割を持つ因子の下流に存在することが明らかになった。

eed はポリコームグループ遺伝子であり、タンパク質同士の結合に使われる WD ドメインを有する。eed は様々なタンパク質と結合することが確認されているが、主に Enhancer of zeste homolog 2 (Ezh2)、histone deacetylase (HDAC)、Yin Yang 1 (YY1) と複合体 (Eed-Ezh2 複合体) を形成している。これらの因子のうち YY1 については、未分化状態 ES 細胞において特異的に発現しており、Oct-3/4 の下流遺伝子として知られている Rex-1 と zinc finger 領域において 75% 程度のホモロジーを有することが知られている。そこで、Eed、HDAC1、HDAC2 と Rex-1 の結合の可能性を共免疫沈降法を用いて調べた。その結果、Eed と Rex-1、HDAC1 と Rex-1、HDAC2 と Rex-1 の間に結合が確認された。YY1 と Rex-1 の両方の因子が未分化状態の ES 細胞に発現していることから、未分化状態 ES 細胞においては Eed-YY1-HDACs-Ezh2 複合体と Eed-Rex-1-HDACs-Ezh2 複合体の 2 種類が存在することが示唆された。

eed は histone deacetylase (HDAC) を介して Hox 遺伝子等の遺伝子発現を抑制していると考えられている。そこで、HDAC 阻害剤として知られている trichostatin A (TSA) を培地中に添加し ES 細胞の形態を経時的に観察した。TSA 添加 2 日後の時点で、未分化状態 ES 細胞に特有なコンパクトコロニー状の形態が崩れ、形態的な分化が観察された。そこで次に、TSA 添加による遺伝子レベルでの発現変化を RT-PCR 法により調べた。まず、未分化マーカーとして知られている Oct-3/4 と Rex-1 mRNA の発現をみたところ、TSA 添加によってこれらの未分化マーカーの発現量は減少しなかった。このことは、TSA が未分化状態を破綻させることにより形態的な分化が観察されたわけではないことを示す。一方、ES 細胞の分化開始因子として知られている転写因子 GATA-4 と GATA-6 mRNA の発現を調べたところ、いずれの遺伝子も TSA 添加によって発現が上昇することが判明した。つまり、未分化状態の ES 細胞において、Eed-Ezh2 複合体が HDAC

を介して直接もしくは間接的に分化開始因子としての GATA-4、GATA-6 遺伝子の発現を抑制している可能性が示唆された。次に、*eed* の下流に GATA-4 と GATA-6 が存在することを証明するために、*eed* を強制発現させた ES 細胞の培地中から LIF を除去し、5 日目の時点で RNA 回収を行い、RT-PCR により遺伝子発現の変化を調べた。コントロール ES 細胞における GATA-4 と GATA-6 の発現量に比べて、*eed* 強制発現 ES 細胞では明らかにこれらの遺伝子の発現が低下していることが判明した。この結果より、*eed* が GATA-4 と GATA-6 の発現を抑制できることが判明した。

ところで、GATA-4 と GATA-6 は発生過程の心筋に発現しており、心筋特異的遺伝子発現を制御していることが知られている。そこで、*eed* 強制発現 ES 細胞とコントロール ES 細胞から胚様体を形成させて分化誘導を行ったところ、*eed* 強制発現群の方が心筋様の拍動するコロニーの割合が少なかった。また、心筋特異的マーカー遺伝子である *Nkx2.5* の発現も *eed* 発現群で低下していた。

以上の結果より、未分化状態 ES 細胞においては STAT3 と Oct-3/4 により *eed* の発現が維持されており、一旦 *eed* の発現が低下すると、その下流に存在する GATA-4 や GATA-6 といった分化開始因子の発現が上昇し、心筋方向への分化が始まるというモデルが考えられる(下図参照)。

