

審 査 の 結 果 の 要 旨

氏名 白田 雅幸

本研究は、未分化状態マウス胚性幹細胞（ES 細胞）に高発現しており、ES 細胞の分化制御に重要な役割を果たす因子のクローニングおよびその因子の機能解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 未分化状態 ES 細胞と分化誘導した ES 細胞の間で cDNA マイクロアレイ法を試み、およそ 80 種類の未分化状態 ES 細胞高発現遺伝子を同定した。これらの遺伝子の中に本研究において解析を行ったポリコムグループ遺伝子 embryonic ectoderm development(eed)が含まれていた。Northern blot 解析により eed の発現量変化を調べたところ、ES 細胞の分化に伴って eed の発現量が低下し、逆に ES 細胞の未分化状態維持に必須のサイトカインである LIF を添加することで発現量が回復した。さらに、LIF 下流のシグナルのうち STAT3 の活性化が未分化状態の維持に必須であるが、ドミナントネガティブ STAT3 を ES 細胞に発現させると eed の発現量が低下することが示された。また、STAT3 のみを活性化しても eed は高発現を維持していた。これらの結果より、eed 遺伝子は STAT3 の制御下にあることが示された。

2. ES 細胞の未分化状態維持に必要な因子として Oct-3/4 が知られている。そこでテトラサイクリンにより Oct-3/4 の発現調節が可能な ES 細胞株を用いて eed の発現量変化を調べたところ、Oct-3/4 の発現量低下に伴って eed の発現量が低下し、Oct-3/4 の発現量が回復すると eed の発現量も回復することが RT-PCR 法により示された。このことから、eed は Oct-3/4 によってもその発現量が制御されていることが判明した。

3. Eed は YY1、Ezh2、HDAC と複合体を形成していることが知られているが、YY1 は Rex-1 (Oct-3/4 の下流遺伝子の一つ) 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 と Rex-1、HDAC と Rex-1 の結合を共免疫沈降法により調べたところ、これらの結合が確認された。また、Eed を

含む複合体の個々の構成因子の ES 細胞分化に伴う発現量の変化を Northern blot 法により調べたところ分化に伴い発現が低下したのは Eed の他には Rex-1 のみであり、他の遺伝子は分化に伴う発現量の変化は認められなかった。これらのことから、未分化状態 ES 細胞においては Eed-Ezh2-YY1-HDACs と Eed-Ezh2-Rex-1-HDACs の二つの複合体が存在し、分化に伴う Eed、Rex-1 の発現量の減少がこれらの複合体の機能を制限する要因である可能性が示された。

4. DNA チップアッセイにより eed 下流遺伝子を探索したところ、ES 細胞分化誘導因子である GATA-4 および GATA-6 が eed によって抑制されることが判明した。また、HDAC 阻害剤であるトリコスタチン A を培地中に添加すると ES 細胞が分化形態を示した。このとき、未分化マーカーの発現量に変化はなかったが、GATA-4 と GATA-6 の発現量が上昇することが RT-PCR 法により示された。

5. eed 強制発現 ES 細胞を分化誘導すると、野生型 ES 細胞に比べて、拍動する心筋様のコロニー数が減少し、心筋マーカーである nkx2.5 の発現も低下することが判明した。

6. eed 遺伝子の gene targeting を行ったところ、eed^{-/-} ES 細胞の樹立は不可能であった。

以上、本論文はマウス未分化 ES 細胞において eed が高発現することを示し、そのシグナル伝達経路および ES 細胞における機能を明らかにした。本研究はこれまで明らかにされていなかった、ポリコムグループ遺伝子の ES 細胞における機能の解析に重要な貢献をなすものであり、学位の授与に値するものと考えられる。