

論文の内容の要旨

Studies on DNA replication in mouse embryonic stem cells

マウス胚性幹細胞における DNA 複製制御機構の解析

指導教官 岡山博人教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 13年4月入学
医学博士課程
分子細胞生物学専攻
藤井 裕子

マウス胚性幹細胞(ES 細胞)は、*in vitro* において分化全能性を維持しつつ無限に増殖することが可能である。未分化 ES 細胞は、正常2倍体細胞であり正常組織への分化能を有するにも関わらず、その増殖能に関しては、血清飢餓非感受性、足場非依存性など、がん細胞に類似した性質を示す。また、未分化 ES 細胞はその細胞周期において通常の体細胞に比べ非常に短い G1、G2 期を有し、大半を S 期に費やすという特徴的なパターンを示すことが知られている。同様の性質はマウス発生初期胚のエピブラストや、マウス胚性腫瘍細胞などの未分化細胞にも共通して認められることから、ES 細胞をモデルとした細胞周期制御機構の解析は、発生初期における細胞の分化と増殖との関係を理解する上でも重要であると考えられる。本研究では、ES 細胞の DNA 複製制御機構についての基礎的な知見を得ることを目的として以下の解析を行った。

1) ES 細胞の未分化状態及び分化誘導時における細胞周期制御因子の発現機構の解析
同調条件下における未分化 ES 細胞の細胞周期における DNA 複製制御因子の挙動を解析したところ、ASK、Cdc6、Cyclin など、体細胞では細胞周期に依存した発現量の変動が知られている因子に関して、ES 細胞においてはほぼ恒常的な発現が認められた。さらに、未分化 ES 細胞及びマウス胎児由来繊維芽細胞(MEF)を用いて細胞周期制御因子のタンパク質レベルでの発現の比較を行った結果、Cdc6、ASK、CyclinA2、CyclinB1の大量発現が認められた。ま

た、これらの因子の発現は、ES 細胞の分化誘導に伴い速やかに低下した。これらは、それぞれ、(1)G1 期における複製前複合体の形成、(2)G1/S 期におけるこの複合体の活性化、(3)S 期進行、(4)G2/M 期進行において中心的な役割を担う因子である。したがって、これらの因子の高発現により、未分化 ES 細胞特有の増殖サイクルが支持されている可能性が考えられる。また、さらなる解析の結果、ES 細胞におけるこれらの因子の発現制御は、転写量の調節、mRNA の安定性の制御、タンパク質の安定性制御等、多段階のレベルで行われていることが判明した。この内、転写調節においてはプロモーター領域におけるヒストン H3N 末端の K9 及び K14 のアセチル化が重要な役割を担う可能性が示唆された。

2) CDC7 条件変異 ES 細胞を用いた *in vitro* DNA 複製系開発の試み

近年、哺乳動物体細胞の単離核及び細胞質抽出液を用いた *in vitro* DNA 複製系が確立された。CDC7 は DNA 複製の開始機構において重要な役割を果たす因子の一つであるが、我々は誘導的に CDC7 遺伝子機能を破壊できる条件変異 ES 細胞株を樹立し(以下、CDC7(-/-)細胞)、CDC7 が哺乳動物細胞においても DNA 複製に必須であることを証明している。しかしながら、動物細胞の DNA 複製における CDC7 の機能の詳細は不明である。したがって、CDC7(-/-)細胞を用いた *in vitro* DNA 複製系の構築による、ES 細胞の DNA 複製における CDC7 の機能の生化学的な解析を試みた。

非同調的に増殖する野生型 ES 細胞から抽出した単離核は、複製の基質及び ATP を含む緩衝液中で DNA 複製を行うが、ミモシン処理により G1 期後期に同調した野生型 ES 細胞由来の単離核では、同じ緩衝液中では複製は観察されず、野生型 ES 細胞由来の細胞質抽出液の添加に依存して複製能を示す。誘導的に CDC7 遺伝子を欠損させた CDC7(-/-)細胞質抽出液中において上記の野生型 G1 期後期単離核の *in vitro* DNA 複製開始能の有無を検討したところ、この抽出液によっても DNA 複製開始が支持されることが判明した。一方、CDC7(-/-)細胞由来の単離核は、S 期停止しているにもかかわらず、緩衝液中での DNA 複製伸長反応の顕著な低下が認められた。野生型細胞質抽出液の添加により、複製能の若干の回復が認められたが、これは CDC7 活性に非依存的であり、また野生型細胞核の複製能の約 50% 程度に留まった。以上の結果は、G1 期後期の核内には DNA 複製開始の支持に十分な量の CDC7 活性が既に存在していること、CDC7 遺伝子欠損により核は DNA 複製能を喪失し、この核における複製能の回復は、CDC7 を含む可溶性細胞質因子の添加のみでは不十分であることを示唆するものと考えられる。