

審査の結果の要旨

氏名 藤井 裕子

本研究は、マウス胚性幹細胞 (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ために、1) ES 細胞の未分化状態およ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並びに 2) CDC7 条件変異 ES 細胞を用いた *in vitro* DNA 複製系の開発を試みたものである。これらの解析の結果を以下に記す。

1) ES 細胞の未分化状態およ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

- ① 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。この結果、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。
- ② 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ところ、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。
- ③ ES 細胞におけるこれらの因子の発現制御機構についての解析を行った。Northern blot の結果、タンパク質レベルでの高発現が認められた因子のみならず、今回の解析の対称となった因子のほぼ全てにおいて、ES 細胞における転写量の増大が認められた。一方、これとは対照的に、p21、p27 などの CDK 抑制因子に関してのみ、転写の減少が確認された。さらなる解析の結果、mRNA の安定化や、Cdc6に関してはタンパク質レベルでの安定化も、これらの因子の増産に寄与することが示された。
- ④ 細胞の分化に伴う転写調節においてクロマチンの修飾制御が重要な役割を果たすことが報告されている。ES 細胞での複製制御因子の発現調節においてもこれらの機構が関与しているのかという点について検討した。クロマチン免疫沈降法を用いたプロモーター領域の解析の結果、ヒストン H3N 末端の K9 及び K14 のアセチル化が、ES 細胞における複製制御因子の転写調節に関与することが示された。一方、ヒストン H3K9 のメチル化に関しては相関関係が認められなかった。また、DNA シトシン残基においては、細胞増殖を停止した終末分化組織でのみメチル化が検出された。

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

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、本研究では、CDC7(-/-)細胞を用いて *in vitro* DNA 複製系を構築し、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。

- ① 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。この結果から、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が示唆された。
- ② 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。したがって、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と考えられた。

以上、本研究1)により、未分化 ES 細胞において Cdc6、ASK、CyclinA2、CyclinB1 が細胞周期を通じてほぼ恒常的に大量発現していることが明らかとなった。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、ES 細胞におけるこれらの因子の発現制御は多段階のレベルで行われていることが判明したが、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。

さらに、本研究2)により、ES 細胞を用いた *in vitro* DNA 複製系が初めて確立された。CDC7 依存的な複製系の確立には未だ至っていないが、この手法の応用による、ES 細胞における複製制御機構の生化学的解析のさらなる進展が期待される。

これらの結果は、未分化 ES 細胞の細胞周期制御機構に関して新たな知見をもたらすものであり、学位の授与に値すると考えられる。