

審査の結果の要旨

氏名 中武悠樹

本研究は多能性を持つ細胞特異的に発現する遺伝子の転写調節機構を明らかにするため、マウス胚性幹 (embryonic stem: ES) 細胞における *Rex-1* および *Nanog* 遺伝子の発現を直接的に制御する因子の解析を試みたものであり、以下の結果を得ている。

1. *Rex-1* 遺伝子上流に存在する Rox-1 結合配列に配列特異的に結合する因子を、等電点電気泳動と SDS-PAGE により分画精製し、そのアミノ酸配列を LC-MS/MS により同定した。各画分の *Rex-1* 遺伝子の転写調節領域に対する DNA 結合能の配列特異性は、Electrophoretic Mobility Shift Analysis (EMSA) により解析した。その結果、pI 9.0、分子量 55kDa 付近の画分に Rox-1 結合配列に特異的な DNA 結合活性が含まれていた。この画分に対して質量解析を行うと、この画分には polypyrimidine tract binding (PTB) protein と同一のアミノ酸配列が含まれることが明らかとなった。PTB 組み換えタンパク質は精製画分と同様の配列特異性を有しており、PTB が Rox-1 結合配列に配列特異的に結合することが示された。
2. EMSA により、PTB はピリミジンが連続した人為的な 2 種類の配列と配列特異的に結合することが示された。これらの配列および野生型の配列を持つ *Rex-1* 遺伝子のレポーター遺伝子の活性を比較し、*Rex-1* 遺伝子の転写制御領域を解析した。その結果、PTB が結合する Rox-1 結合配列を欠失させると転写活性は減少するが、その領域を PTB が結合することのできる変異型の配列に置換しても転写活性に変化が無いことが示された。
3. siRNA を用いて内在性 PTB の発現を抑制し、*Rex-1* 遺伝子の発現量に変化がおきるかを検討した。PTB に対して特異的な siRNA を導入した ES 細胞では、*PTB* mRNA の発現量は抑制され、PTB の標的遺伝子と想定される *Rex-1* mRNA の発現量も減少することが明らかとなった。

この ES 細胞は未分化状態を維持した形態を有し、*Oct-3/4* mRNA の発現量は維持されていたことから、ES 細胞が分化することで間接的に *Rex-1* 遺伝子が抑制されたのではないと考えられた。これらのことから、PTB は *Rex-1* 遺伝子の発現を直接的に制御する因子であり、報告されていた *Rox-1* の有力な候補因子であることが示された。

4. PTB の発現抑制を行った ES 細胞では *Nanog* も *Rex-1* と同様に mRNA の発現量が減少した。このことから PTB は *Rex-1* のみならず *Nanog* の発現制御に関与することが考えられた。*Nanog* 遺伝子上流に存在する約 1.8 k b の配列を段階的に欠失させたレポータージーンを用いて、*Nanog* 遺伝子が未分化な細胞特異的に発現するために必要な領域を新規に同定した。その領域はピリミジンに富む配列を含んでおり、PTB はこの配列に結合した。これらのことから、PTB は *Rex-1* 遺伝子のみならず *Nanog* 遺伝子の転写調節領域にも結合し、遺伝子発現を直接的に制御することが示された。
5. ES 細胞の細胞抽出液内に含まれる PTB の DNA 結合能を解析した結果、そのシグナルは未分化状態で強く、レチノイン酸による分化により減弱した。一方、PTB の mRNA やタンパク質の発現量は、ES 細胞をレチノイン酸により分化させても大きく変化しなかった。
6. ES 細胞の抽出液を等電点電気泳動および SDS-PAGE にて二次元的に展開した後、PTB タンパク質の分布を解析した結果、未分化状態の ES 細胞には、レチノイン酸によって分化した ES 細胞には見られないスポットが酸性側に検出された。他の等電点と比べ、この未分化状態に特徴的なスポットを含む等電点から得られた画分は、PTB を含む DNA 結合能を高く有していた。これらのことから、PTB タンパクは未分化状態特異的な修飾を受けることで DNA への結合能を獲得すると考えられた。未分化状態の ES 細胞の細胞抽出物をアルカリフォスファターゼにて処理すると、PTB の持つ DNA 結合能が減弱することが示された。

以上、本論文は ES 細胞において未分化状態特異的に機能する転写調節領域の解析から、ピリミジンに富んだ配列の重要性と PTB を介した転写調節機構の存在を明らかにした。本研究は ES 細胞が未分化状態特異的な遺伝子発現をするために必要な転写因子のネットワーク網の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と考えられる。