

論文内容の要旨

申請者氏名 丸山昌良

胚性幹 (ES) 細胞は自己複製能と個体を形成するすべての細胞種へと分化できる分化多能性を維持している。ES 細胞の分化多能性には翻訳開始因子である NAT1 が必須であることが知られている。このことから NAT1 は分化多能性に関与している Sry 関連転写因子 Sox2 の翻訳を制御している可能性が考えられた。また EST データベース解析により Sox2 以外に Sox15 も未分化 ES 細胞で特異的な発現が認められた。そこで、本研究では 1) 非哺乳動物における NAT1 の機能解明、2) Sox15 の機能解析、3) Sox2 の下流因子の同定を目的とした。

- 1) 非哺乳動物でも NAT1 が分化多能性に関与しているかを明らかにする最初のステップとして下等動物における NAT1 相同遺伝子の同定を行った。Drosophila melanogaster, Halocynthia roretzi, zebrafish, frog, chicken において NAT1 相同遺伝子を同定した。すべての NAT1 相同タンパク質は AUG 以外の翻訳開始コドンを利用しているが分かった。
- 2) RT-PCR により Sox2 以外に Sox15 も未分化 ES 細胞で高発現していることを明らかにした。そこで Sox15 と Sox2 の機能比較を行った。ゲルシフト分析およびレポーター実験により、Sox15 は Sox2 のターゲット遺伝子である FGF4 や Fbx15 のエンハンサーに結合し Oct3/4 と協調して転写を活性化することを示した。Sox15 の生理的な機能を解析するために Sox15 欠損マウス、ES 細胞を作製した。Sox15 欠損マウス、ES 細胞ともに正常であった。この結果は Sox2 が Sox15 の機能を大部分補ったためであると考えられた。Sox15 のターゲット遺伝子を同定するために DNA マイクロアレイ分析を行った結果、Sox15 の欠損により Otx2, Ctgf, Ebf1 の発現低下、Hrc の発現上昇が認められた。この発現変化は Sox15 欠損 ES 細胞に Sox15 の cDNA を導入することにより回復された。Sox15 が直接 Hrc の発現を制御しているかを明らかにするために、クロマチン免疫沈降を行った結果、Sox15 は Hrc 遺伝子に存在する Sox コンセンサス配列に結合することを示した。以上の結果より、Sox15 はマウスの発生や ES 細胞の特性には必須ではないが、Sox2 とは異なる特異的な転写制御に関与していることが示唆された。
- 3) ICM と ES 細胞の分化多能性に必須な転写因子である Nanog の欠損マウスの表現型が Sox2 欠損マウスと非常に似ていること、また未分化 ES 特異的に発現している遺伝子の多くは Sox2-Oct3/4 complex により制御されているより、Nanog は Sox2 の target 遺伝子である可能性が示唆された。そこでマウス Nanog 遺伝子のエンハンサーに存在する cis-element の同定を行った。レポーター実験により、ES 細胞特異的な発現には遠位エンハンサーと近位エンハンサーが関与していることが分かった。さらにゲルシフト分析およびクロマチン免疫沈降により遠位エンハンサーには Sox2、近位エンハンサーには Oct3/4 と Sox2 が特異的に結合することを明らかにした。また Nanog の発現は Sox2 欠損遅延胚盤胞で著しい減少が観察された。以上の結果より、Nanog の発現は Sox2 と Oct3/4 が制御していることを明らかにした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 丸山昌良

胚性幹 (ES) 細胞は自己複製能と個体を形成するすべての細胞種へと分化できる分化多能性を維持している。ES 細胞の分化多能性には転写因子の Oct3/4, Nanog, Sox2 が重要な役割を担っていることが知られている。さらに Sox2 の翻訳を制御する可能性が示唆されている翻訳開始因子の NAT1 も翻訳レベルで分化多能性に関与していることが明らかとなっている。また EST データベース解析により Sox2 以外に Sox15 も未分化 ES 細胞で特異的な発現が認められた。そこで、本研究では ES 細胞未分化維持ネットワークを明らかにするために 1) NAT1 の機能解明、2) Sox15 の機能解析 3) Sox2 と Nanog の関係の解析を目的とした。

1) 申請者は NAT1 が非哺乳動物においても分化多能性に関与しているかを明らかにする最初のステップとして下等動物における NAT1 相同遺伝子の同定を行った。NAT1 相同遺伝子は *Drosophila melanogaster*, *Halocynthia roretzi*, zebrafish, frog, chicken において同定された。またすべての NAT1 相同タンパク質が翻訳開始コドンに AUG を使用していないことを明らかにした。

2) 申請者は未分化 ES 細胞で Sox2 以外に Sox15 も高発現していることを示した。そこで Sox15 と Sox2 の機能比較を行った。Sox15 は Sox2 のターゲット遺伝子である FGF4 や Fbx15 のエンハンサーに結合し Oct3/4 と協調して転写を活性化することを明らかにした。生理的な Sox15 の機能を解析するため Sox15 欠損マウス、ES 細胞を作製したが顕著な表現型は得られなかった。この結果は Sox15 の機能の一部を Sox2 が相補したためであると考えられた。Sox2 により補償されない Sox15 のターゲット遺伝子の同定を行った結果、Sox15 の欠損により *Otx2*, *Ctgf*, *Ebf1* の発現低下、*Hrc* の発現上昇が認められた。Sox15 がこれらの遺伝子の発現を直接制御しているかを明らかにするために、クロマチン免疫沈降を行った。*Hrc* 遺伝子においては Sox15 の直接的な発現制御が示唆された。以上の結果より、Sox15 はマウス ES 細胞においては特異的な転写制御に関与しているが ES 細胞やマウスの発生には必須ではないことを示した。

3) ICM と ES 細胞の分化多能性に必須な転写因子である Nanog の発現には遠位エンハンサーが関与していることが知られていた。しかし、cis-element と trans-factor に関しては明らかになっていなかった。そこで申請者はマウス Nanog 遺伝子の遠位エンハンサーと新たに同定した近位エンハンサー cis-element の同定を行った。その結果、遠位エンハンサーには Sox2、近位エンハンサーには Sox2 と Oct3/4 が結合することを明らかにした。また Nanog の発現が Sox2 欠損遅延胚盤胞においても著しい減少がみられたことから、生理的な Nanog の発現にも Sox2 の関与が示唆された。以上の結果より、Nanog の発現は Sox2 と Oct3/4 が制御していることを明らかにした。

以上のように、本論文は ES 細胞未分化維持機構における Sox の機能を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。