

論文内容の要旨

申請者氏名 幸得 友美

ES細胞を用いた分化誘導研究は、胚発生過程を体外培養で再現できるため、哺乳類の発生や分化に関わる遺伝子発現制御機構をより詳細に解明できることが知られている。BTBジンクフィンガー型転写因子であるCIBZは、転写抑制ドメインを持つDNA結合タンパク質である。先行の研究より、CIBZはES細胞の未分化マーカーであるNanogを介して細胞増殖を促進することが明らかとなった。しかし、CIBZがES細胞の分化にどのような影響を与えるかは分かっていない。

CIBZがES細胞の分化に与える影響を調べるため、マウスES細胞を胚葉体と呼ばれる三胚葉への分化誘導を行った。その結果、ES細胞の分化に伴ってCIBZタンパク質の発現が顕著に低下した。CIBZが欠損したES細胞株による胚様体形成においては、T（ES細胞から中胚葉への分化決定因子）とMesp1（中胚葉から心血管系譜細胞への分化決定因子）のmRNAレベルが野生型のES細胞より上昇することを確認した。以上のことから、CIBZの発現低下がES細胞の中胚葉と心筋細胞への分化に必要であることが示唆された。

CIBZの発現がES細胞の心筋細胞への分化に与える影響を調べるため、CIBZが欠損したES細胞株及びCIBZをES細胞に安定的に過剰発現させた細胞株を用いて、心筋細胞への分化誘導実験を行った。その結果、CIBZの欠損は拍動する心筋細胞の割合が増加することに対して、CIBZの過剰発現は逆の表現型を示した。また、心筋細胞に特異的に発現するcTnIの陽性細胞数がCIBZの欠損ES細胞では上昇したことに対して、CIBZの過剰発現ES細胞では減少した。さらに、ES細胞の心筋細胞への分化において、CIBZの欠損は心筋分化促進遺伝子の発現を上昇させ、過剰発現ではそれらを減少させた。これらの結果より、CIBZがES細胞から心筋細胞への分化を抑制することが明らかとなった。

ES細胞において、CIBZの発現変化はTとMesp1のmRNAレベルと逆の相関を示したことから、CIBZがこの2つ遺伝子の転写を制御することが示唆された。レポーターアッセイとクロマチン免疫沈降法を用いて解析した結果、CIBZがTとMesp1のプロモーター領域への結合を介して抑制すること、CIBZのジンクフィンガードメインが転写抑制に必須であることを判明した。以上の結果より、CIBZはTとMesp1の転写を抑制することでES細胞の心筋細胞への分化を「負」に制御することが明らかになった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 幸得 友美

ES細胞を用いた分化誘導の研究は、哺乳類の胚発生や分化に関わる遺伝子発現制御機構の解明や再生医療の実現に向けた医学への応用が重要である。ES細胞から中胚葉と心血管系譜の細胞への分化の全容解明に向けて、分化運命を決定する遺伝子の転写制御機構の解明に特に重要である。転写因子TとMesp1はES細胞から中胚葉、中胚葉から心血管系譜細胞へのそれぞれの分化決定をつかさどるマスター遺伝子である。TとMesp1は転写因子として下流の遺伝子群を制御するカスケードが解明される一方で、自分自身の発現を制御する転写因子の報告が少ないため、新規転写因子の同定及び解析が必要である。

これまでに申請者の所属研究室では、新規のBTBドメインを有するジンクフィンガー型転写因子CIBZを同定し、CIBZはマウスES細胞を含む様々な細胞の細胞増殖と細胞死を制御することを報告してきた。申請者は、ES細胞で高く発現する転写抑制機能を持つCIBZに着目して、CIBZがES細胞から心筋細胞への分化に関わる以下を示す新たな結果や重要な知見を得た。

1. マウスES細胞の三胚葉への分化実験の結果より、ES細胞の分化に伴ってCIBZタンパク質の発現が低下し、CIBZの発現変化はTとMesp1の転写と逆の相関を見出した。

2. ES細胞の心筋細胞への分化誘導の解析より、CIBZはES細胞の中胚葉と心筋細胞への分化を「負」に制御することを明らかにした。CIBZによるこの制御は、TとMesp1に依存することを示した。

3. 生化学的な実験結果より、CIBZはTとMesp1のプロモーターへの結合を介してこの2つ遺伝子の転写を抑制することを明らかにした。

以上のように、申請者は、CIBZはTとMesp1の転写を制御する新たな転写因子として、ES細胞の中胚葉と心筋細胞への分化の運命決定に重要な役割を果たすことを示した。

本論文はこれまでに詳細に解明が進んでいないES細胞の心筋細胞への分化制御機構の一端を明らかにしたものであり、学術上、応用上に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。