

京都大学	博士 (医学)	氏 名	今村 公紀
論文題目	Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells (雄の生殖幹細胞における一部の ES 細胞マーカー遺伝子の転写抑制と DNA の高メチル化)		
(論文内容の要旨)			
胚性幹(ES)細胞は自己複製能と分化多能性を有する細胞株であり、その細胞特性は Oct4 や Sox2 等の ES 細胞特異的に発現する遺伝子によって支持されている。当研究室では ES 細胞特異的に発現する遺伝子群を同定し、ECAT と命名した。ECAT が ES 細胞特異的に発現するためには、二通りの制御が考えられる。一つは ES 細胞特異的な転写因子による制御であり、Oct4 と Sox2 は協調的に多くの遺伝子の発現に関わっている。もう一つはゲノムのエピジェネティック修飾であり、DNA メチル化酵素を欠損した ES 細胞が分化抵抗性を示すことなどからその重要性が示されている。 生殖細胞は分化多能性を有してはいないが、受精によって次世代に全能性を伝達する能力を秘めている。雄の生殖幹細胞である精子幹細胞は、精子にのみ分化可能な単能性の幹細胞である。ところが、多能性の ES 細胞と単能性の精子幹細胞は多くの ECAT の発現を共有している。精子幹細胞が ES 細胞類似の遺伝子発現を示すにも関わらず、単能性幹細胞として存在する機構は不明であった。 以上の背景のもと、本論文では ES 細胞と精子幹細胞株である GS 細胞における ECAT の発現と DNA メチル化状態のプロファイリングを行った。 ①GS 細胞における ECAT の発現と DNA の低メチル化 EST データベースから予想された通り、GS 細胞においても多くの ECAT の発現が確認された。これらの ECAT の転写制御領域において、DNA メチル化状態は体細胞系譜では高いものの、生殖細胞と ES 細胞では共に低メチル化状態にあった。 ②GS 細胞における Oct4 と Sox2 標的遺伝子の転写抑制と DNA の高メチル化 大部分の ECAT とは異なり、Nanog 等の一部の ECAT は GS 細胞において発現していなかった。これらの ECAT は共通して Oct4 と Sox2 の標的遺伝子であったが、Oct4 と Sox2 自体は GS 細胞においても発現していた。そこで、標的遺伝子の DNA メチル化状態を調べたところ、Oct4/Sox2 結合領域が高度にメチル化されていることが判明した。この高メチル化状態は雄の生殖細胞特異的に生じており、体細胞系譜以上であった。また、Oct4/Sox2 結合領域以外の転写制御領域や、ECAT 以外の Oct4/Sox2 標的遺伝子では高メチル化は認められず、極めて領域特異的であった。 ③GS 細胞における Oct4 と Sox2 の転写後制御 GS 細胞における Oct4 と Sox2 タンパク質の DNA 結合状態を調べたところ、高メチル化状態の ECAT において結合は認められなかった。ところが、発現が認められる低メチル化状態の ECAT においても同様に結合が確認されなかった。そこで Oct4 と Sox2 のタンパク質発現を調べたところ、Oct4 は mRNA 発現に比べてタンパク質量が 1/3 程度少なく、Sox2 に至ってはタンパク質が一切検出されなかった。			

Oct4 と Sox2 は ES 細胞における ECAT の発現制御、及び多能性維持のマスター遺伝子である。本論文の結果、雄の生殖細胞において Oct4 と Sox2 はタンパク質レベルで抑制されており、かつその標的遺伝子はエピジェネティックに不活性化状態にあることが明らかとなった。このことは、Oct4 と Sox2 の機能を多段階にわたって制限することが、生殖細胞の多能性獲得、すなわち奇形腫形成の抑止に重要であることを示唆している。一方、精子幹細胞の起源である始原生殖細胞は潜在的に分化多能性を有することから、本論文は生殖細胞の運命決定における潜在的分化多能性の喪失機構においても新たな知見をもたらすものとなった。 (論文審査の結果の要旨) 多能性幹細胞である ES 細胞の特性の維持には、ES 細胞特異的遺伝子群(ECAT)の発現が関与している。生殖細胞は受精を介することで全能性を獲得し得るが、生殖幹細胞自体は配偶子にのみ分化可能な単能性の幹細胞である。ES 細胞と生殖細胞の細胞形質は互いに著しく異なるにも関わらず、ECAT の多くが両者に共通して発現している。 本研究では、ECAT 発現の相似性と細胞形質の相違性という矛盾の原因を解明するため、ES 細胞と生殖細胞における ECAT の発現と DNA メチル化状態の比較解析を行った。 精子幹細胞株の GS 細胞では多くの ECAT が発現しており、それらの転写制御領域は ES 細胞同様に低メチル化状態であった。一方、Oct4 と Sox2 の標的遺伝子の一部は GS 細胞では発現しておらず、ゲノム上の Oct4/Sox2 結合領域は雄性生殖細胞特異的に高メチル化状態を呈した。また、Oct4 と Sox2 自体も GS 細胞においてタンパク質レベルで抑制されていた。 以上の結果から、ES 細胞と生殖細胞は確かに多くの ECAT の発現を共有するものの、Oct4 と Sox2 が両者を区分する鍵であることが明らかとなった。また、Oct4 と Sox2 の多段階にわたる機能抑制が生殖細胞の多能性の再獲得・腫瘍化を抑制し、適切な配偶子形成をもたらすことが示唆された。 本研究は、生殖細胞の配偶子形成細胞としての運命決定機構の解明に大きく寄与するものである。 したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値のあるものと認める。 なお、本学位授与申請者は、平成 21 年 2 月 24 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。			
要旨公開可能日： 年 月 日 以降			