

氏 名	くろ だ たか お 黒 田 貴 雄
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3081 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研 究 科 ・ 専 攻	医 学 研 究 科 分 子 医 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Octamer and Sox elements are required for transcriptional <i>cis</i> regulation of <i>Nanog</i> gene expression (Octamer/Sox 配列が <i>Nanog</i> の転写を制御する)
論文調査委員	(主 査) 教 授 山 中 伸 弥 教 授 篠 原 隆 司 教 授 瀬 原 淳 子

論 文 内 容 の 要 旨

胚性幹 (ES) 細胞は、着床前の胚である胚盤胞の内部細胞塊細胞から培養条件下で樹立された幹細胞であり、初期胚幹細胞の多くの特性を受け継いでいる。未分化状態を維持したままの半永久的自己複製能や、体を構成する全ての細胞に分化できる多分化能 (多能性) が特徴である。このため、ES 細胞は幹細胞研究の格好の材料であり、広く研究に用いられている。ES 細胞を用いた幹細胞の未分化性維持機構の解明は、発生や幹細胞に関する基礎研究のみならず、再生医学への応用研究の観点からも熱い注目が注がれている。

マウス ES 細胞のこれまでの研究から、複数の転写因子やシグナル伝達経路が相互に関わり合いながら構築される、多能性幹細胞に特有の分子ネットワークの存在が垣間見られている。その中でも転写因子である Oct4 と Sox2 は、ホモ変異胚が着床直後に致死であること、ホモ変異 ES 細胞が樹立できないこと、発現量の減少により未分化性維持機構が崩壊し分化が誘導されることから、未分化性維持に必須の因子として同定されている。しかし、両因子だけで未分化性維持機構の全容を説明するのは困難であり、他の鍵因子の存在が想定されていた。

第三の新規鍵因子として同定されたのが *Nanog* 遺伝子である。*Nanog* は幹細胞の未分化性維持に必須であるのに加え、量依存的に未分化状態を安定化することが報告された。しかし、未分化性維持分子ネットワーク内での *Nanog* と他の因子との相互関係は明らかにされておらず、重要な課題として残されたままであった。本研究では、*Nanog* の転写制御機構を解明することを目的に実験を行い、以下の結果を得た。

1. *Nanog*-ORF から 5' 上流 2.5kb と 3' 下流 3.9kb を持ち、ORF 部分を GFP-IRES-puro に置換したコンストラクトを ES 細胞に導入し、1 コピーのみ Random integration した細胞株を得た。その細胞において GFP の発現を調べた結果、内在性 *Nanog* の発現パターンを反映していたことから、この transgene 内に未分化細胞特異的発現を制御する領域が含まれていることを明らかにした。
2. 転写制御に必要な領域を同定する目的で、異なる長さの *Nanog* 5' 上流領域を用いて Luciferase assay を行った。その結果、転写開始点上流約 200bp の位置にある Octamer 結合配列と Sox 結合配列が連結している配列 (Octamer/Sox 配列) が、未分化細胞特異的発現を制御するために必須であることを明らかにした。
3. Octamer/Sox 配列はマウス、サル、ヒトの間で完全に保存されており、ヒト ES 細胞においても Octamer/Sox 配列が発現誘導に必須であることを明らかにした。
4. Octamer/Sox 配列に結合するタンパク質を同定するためゲルシフト解析を行った結果、F9EC 細胞では Octamer 結合配列に Oct4 が、Sox 結合配列に Sox2 が結合していたが、R1ES 細胞では Oct4 と Sox2 に加え未知の Sox 配列結合因子 (PSBP) が結合していた。このことから、ES 細胞における *Nanog* の転写は、Oct4 と Sox2 または未知の因子との間のクロストークによって制御されていることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本論文は、多能性幹細胞の未分化性維持に働く遺伝子である *Nanog* の転写制御機構を解析したものである。

Nanog は、多能性幹細胞特異的に発現している転写因子であり、マウス胚性幹（ES）細胞の未分化性維持に必須の役割を果たすことが報告されている。しかし、その発現を制御する分子機構は明らかにされていなかった。申請者は、*Nanog* 遺伝子の 5' 上流領域を用いたレポーター解析から、多能性幹細胞特異的発現を誘導するのに必要な最小領域を同定し、その中に含まれている Octamer 結合配列と Sox 結合配列が連結した配列（Octamer/Sox 配列）が、*Nanog* の転写制御に必要であることを明らかにした。この Octamer/Sox 配列はマウスとヒトの間で完全に保存されており、マウス ES 細胞だけでなく、ヒト ES 細胞においても未分化状態特異的発現を誘導するのに必須であることを示した。さらに申請者は、この配列に結合する因子を同定しており、マウス・テラトカルシノーマ（EC）細胞 F9 株では、Octamer 結合配列には Oct4 が、Sox 結合配列には Sox2 が結合していることを明らかにした。しかし、マウス ES 細胞 R1 株では、Octamer 結合配列に Oct4 は結合しているが、Sox 結合配列には、Sox2 ではない未知の因子が結合していることを示しており、*Nanog* 転写制御への未知の因子の関与を明らかにした。

以上の研究は、多能性幹細胞の未分化性を維持する分子ネットワークの解明に貢献し、多能性幹細胞に関する基礎研究のみならず再生医学への応用研究にも寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成19年1月26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。