

氏名	Roman Martin Casco Robles		
学位の種類	博 士（理学）		
学位記番号	博 甲 第 8 8 1 7 号		
学位授与年月日	平成 3 0 年 9 月 2 5 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Studies on Orphan Genes in the Newt Limb Blastema (イモリの肢再生芽におけるオーファン遺伝子の研究)		
主査	筑波大学教授	博士（理学）	千葉 親文
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学准教授	博士（理学）	澤村 京一

## 論 文 の 要 旨

イモリとは、有尾両生類イモリ科（Salamandridae）に属す少数の動物群のことである。この動物群は、四肢動物（Tetrapoda）の中で唯一、陸生期（四肢動物のライフステージの中で陸地環境に適応して生活するステージ）の成体として、体の様々な部分を終分化体細胞の脱分化／リプログラミングにより再生できることが知られている。こうしたイモリの例外的で高度な再生能力が、四肢動物が共通にもつ遺伝子の働きだけで説明できるのか、それともイモリ固有の遺伝子を考慮しなければならないかは、イモリの再生能力を理解しヒトの医療に応用しようとする生物医学研究にとって本質的な問題であるが、未だ明らかにされていない。本論文の前半で著者は、再生に関わるイモリ固有遺伝子が存在するかどうか調査した。後半では、本調査により得られたオーファン遺伝子*Newtic1*に着目し、この遺伝子を発現する細胞種を明らかにするとともに、この細胞の再生における役割について考察した。

著者はまず、アカハライモリ（*Cynops pyrrhogaster*）の遺伝子(mRNA)情報を網羅するデータベースを開発し、成体イモリの肢再生芽において発現が増加するイモリ固有遺伝子をスクリーニングした。その結果、遺伝子が1つだけ残り、これを*Newtic1*と名付けた。*Newtic1* (1, 512bp) は、40.7 kDの膜タンパク質をコードすると予測された。しかしその後、様々な生物の最新の遺伝子データベースと照合した結果、*Newtic1*はイモリ固有ではなかったが、有尾両生類にしか見られない遺伝子であることが判明した。

次に著者は、どのような細胞が*Newtic1*を発現するのか免疫染色法により調査した。その結果、*Newtic1*を発現する細胞が一部の赤血球であることを明らかにした。成体イモリの赤血球は、脾臓で生産され、循環しながら成熟する。著者は、*Newtic1*が成熟途上にある赤血球 (polychromatic

normoblast: PcNob) に特異的に発現することを明らかにした。しかも、PcNob におけるNewtic1の発現は、自身の酸素運搬能の発達とは独立に、すべての発達段階で、一部のPcNob (約25%) においてのみプラスに制御されていることを明らかにした。また、こうしたNewtic1陽性のPcNobが、小さな集合体 (erythrocyte clump: EryC) を形成し、さらに単球と複合体を形成して全身を循環していることを明らかにした。

続いて著者は、成体イモリの前肢を切断し、その再生過程におけるNewtic1の発現様式を詳細に解析した。その結果、Newtic1が、切断部の傷口が閉じたころから、切断部の組織に存在する毛細血管中のPcNobに徐々に発現することを明らかにした。また、Newtic1を発現したPcNobが、EryCを形成しつつ、再生芽が成長するに伴い、その先端部に集積していくことを明らかにした。著者はさらに、幼生イモリのNewtic1発現を調査し、全身を循環するEryC-単球複合体や、肢再生芽に集積するEryCが、変態後のイモリ (陸生期) に特有であることを明らかにした。

脊椎動物の体内を循環している赤血球は、哺乳類を除き、一般に核をもつ。イモリの赤血球も有核であり、タンパク質の合成・分泌に関わる細胞内小器官をもつことも知られている。そこで著者は、赤血球が酸素運搬以外の何らかの役割を担っていないか調査した。特に、再生芽に集積することから、何らかの因子を分泌している可能性を考えた。トランスクリプトーム解析の結果、PcNobが様々な分泌タンパク質の遺伝子を発現していることが判明した。その中には、肢の再生芽形成に必須とされるプロテアーゼ (Col-a、Col-b、MMP3/10、MMP9、MMP21)、筋細胞の脱分化に関わるとされるBMPファミリーの因子、イモリ固有の構造をもつ成長因子で心臓再生に関わる可能性が指摘されているnsCCNも含まれていた。すなわち、イモリの赤血球は、酸素だけでなく、こうした因子を全身に運搬していると考えられる。著者はさらに、2つの成長因子 (FGF  $\beta$  1とBMP2) についてより詳細な解析を行い、PcNobに含まれる因子の量が、因子の種類によって異なる調節を受けていることを示唆した。また、肢再生過程における因子の動態を追跡し、両因子ともEryCが再生芽の先端部に移動する過程で、EryCの細胞内から失われていくことを示唆した。これらの結果から著者は、Newtic1を発現する赤血球集合体EryCには、修復・再生に必要な様々な因子を、外傷部や再生中の組織に届ける役割があるのではないかと考察している。今後、Newtic1の発現調節、EryCの形成機序、赤血球が運ぶ因子の生理機能を明らかにする必要があると論じている。

## 審 査 の 要 旨

本論文で著者は、イモリの陸生期における卓越した再生能力を説明するため、イモリにしかない再生遺伝子を探索した。本研究において独自に構築した遺伝子データベースはすでに公開されており、今後、様々な研究に活用されることが期待される。本研究では、イモリ固有の遺伝子は見つからなかったが、有尾両生類の進化過程で出現したとみられる遺伝子Newtic1を初めて同定した。Newtic1は赤血球の新奇機能と関連しているものとみられ、少なくともアカハライモリでは、陸生期特異的に再生に関わることを明らかにした。Newtic1が、外傷部の赤血球に発現し、その赤血球がEryCを形成して様々な因子を再生芽に運んでいるという発見は、Newtic1やEryC、そして運ばれる因子が、陸生期の再生に欠かせない何らかの機能を担っている可能性を強く示唆している。これら本研究成果の新規性や分野に対する貢献度は極めて大きいものと評価できる。また、本研究は、哺乳類以外の脊椎動物がもつ赤血球のはたらきが、酸素運搬だけでなく、多岐にわたる可能性を浮き彫りにした。このことは、血液の概念を大きく変えるものであり、再生研究のみならず生物科学の今後の発展に大きく寄与するものと評価できる。

平成30年6月26日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士 (理学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。