

氏名	CHEN XUTONG		
学位の種類	博 士 (理 学)		
学位記番号	博 甲 第 10632 号		
学位授与年月日	令和5年3月24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	A Morphological Study on the Relationship between Newtic1 and Factor Secretion in Erythrocytes during Adult Newt Limb Regeneration (成体イモリ肢再生過程の赤血球におけるNewtic1と因子分泌の関係に関する形態学的研究)		
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 (農学)	三浦 謙治
副査	筑波大学准教授	理学博士	坂本 和一
副査	筑波大学教授	博士 (理学)	中野 賢太郎

論 文 の 要 旨

有尾両生類のイモリは、四肢動物の中でも例外的に、体の様々部位を、一生を通じて何度でも再生できる。この能力が四肢動物に共通の遺伝子だけで説明できるかは明らかではない。Newtic1は、有尾両生類にユニークな遺伝子であり、2018年に成体アカハライモリ (*Cynops pyrrhogaster*) の肢再生過程で発現が増加する遺伝子として発見された。この遺伝子は膜タンパク質をコードしており、イモリの体内を循環する赤血球 (全て有核) のほぼ全てを占める未成熟赤血球 (PcNob) の一部に発現する。PcNob は平たい楕円体をしており、Newtic1タンパク質はその辺縁部 (赤道) に沿って存在する。肢再生の研究から、肢切断部でNewtic1タンパク質を発現したPcNobは、再生芽にTGF β 1やBMP2等の様々な分泌因子を運び込むことが示唆されている。しかし、膜タンパク質であるNewtic1が液性因子の分泌にどう関わるかは明らかではない。そこで著者は本論文において、PcNobにおけるNewtic1タンパク質と因子分泌との関係を形態学的手法で調べた。

著者はまず、アカハライモリの前肢の再生芽から血液を採取し、PcNobにおけるNewtic1タンパク質の局在を蛍光免疫染色法で可視化し、光学顕微鏡で解析した。その結果、多数の蛍光顆粒が赤道の細胞膜直下に集積していることを明らかにした。未成熟なPcNobでは、蛍光顆粒が赤道直下だけでなく、細胞質全体にも広く分布することを明らかにした。共焦点レーザー顕微鏡で解析した結果、顆粒の直径は、明るい蛍光を示すコアの部分で200-300 nmあることを見出した。

有核赤血球には一般に、赤道直下の細胞質に微小管の束からなる辺縁帯 (marginal band) が存在する。そこで著者は、Newtic1の蛍光顆粒と辺縁帯との関係を調べた。その結果、Newtic1の蛍光顆粒が、辺縁帯が発達したPcNobでしか観察されないことを明らかにした。また、Newtic1の蛍光顆粒が辺縁帯の微小管に近接して存在していることを明らかにした。著者は次に、Newtic1の蛍光顆粒の実体を明らかにするために、免疫電子顕微鏡解析を行った。その結果、Newtic1の増感銀粒子が微小管に近接して存在する球状構造体を構成していることを明らかにした。また、典型的な球状構造体の直径が約100 nmであることを明らかにした。著者はさらに、再生芽の血球から微小管を含む不溶性のタンパク質を抽出し、イミュノブロット解析を行った。その結果、この画分にNewtic1タンパク質が含まれることを明らかにした。これらの結果から著者は、Newtic1は、直径が約100 nmの球状構造体を構成し、微小管に直接的あるいは間接的に結合するタンパク質であると結論した。

著者は、Newtic1が膜タンパク質であることから、PcNobの辺縁帯に集積している球状構造体が分泌小胞ではないかとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、著者はまず、PcNobに小胞体やゴルジ体など、タンパク質のパッケージングや修飾、輸送に関わる細胞小器官が存在するのか調べた。PcNobの小胞体とゴルジ体を生きたまま蛍光染色し観察した結果、PcNobが発達した小胞体とゴルジ体をもつことを明らかにした。さらに透

過型電子顕微鏡観察を行った結果、辺縁帯付近の細胞質に小胞が多数認められるとともに、辺縁帯に近接する細胞膜に、物質の分泌あるいは取り込みを示唆するΩ状の構造が認められた。これらの結果は、PcNobには細胞内膜系が発達しており、タンパク質の活発な細胞内輸送が行われていることを示唆している。

Newtic1の球状構造体が分泌小胞であるとすれば、球状構造体は分泌されるべき因子を内部に含んでいるはずである。そこで著者は次に、PcNobが再生芽に運び込む因子であるTGFβ1とBMP2に着目し、Newtic1タンパク質との位置関係を共焦点レーザー顕微鏡で解析した。それぞれのタンパク質を蛍光免疫染色して観察した結果、TGFβ1の蛍光がNewtic1と同様に、辺縁帯に沿って顆粒状に分布することを明らかにした。一方、BMP2の蛍光は辺縁帯に観察されなかった。TGFβ1の蛍光とNewtic1の蛍光の領域面積を、Newtic1の蛍光顆粒ごと比較した結果、TGFβ1がNewtic1の内側に存在することが明らかになった。これらの結果は、Newtic1の球状構造体がTGFβ1を運ぶ分泌小胞である可能性を強く示唆している。

これらの結果を総合し著者は、Newtic1がTGFβ1を運ぶ分泌小胞の膜タンパク質であると結論付けた。また、Newtic1タンパク質が微小管に直接的あるいは間接的に結合することから、分泌小胞を微小管に繫留するはたらきがあるものと考察した。アカハライモリの肢再生過程では、Newtic1を発現し始めたPcNobが、血管の伸長に伴って再生芽の内部に集積するようになる。再生芽のPcNobでは微小管が束化し辺縁帯の発達が進むため、結果的にNewtic1タンパク質を膜にもつ分泌小胞が赤道の細胞膜の近くに集積するようになる。このようにして、Newtic1はTGFβ1の細胞内輸送に貢献すると考えられる。このことから著者は、Newtic1がPcNobの再生芽組織への因子分泌に積極的に関わっていると結論付けた。

審 査 の 要 旨

本論文により著者は、成体アカハライモリの肢再生芽に集積する赤血球について、膜タンパク質であるNewtic1と液性因子分泌との関係を形態学的手法で調べ、Newtic1タンパク質が赤血球の発達した辺縁帯の微小管に沿って並ぶ球状構造体を構成していること、そしてその球状構造体が成長因子の一つであるTGFβ1を内包していることを明らかにした。これらの結果は、Newtic1がTGFβ1を含む分泌小胞の膜タンパク質であるとともに、微小管に結合し、辺縁帯の発達に伴って分泌小胞を細胞膜に輸送することで、赤血球の因子分泌に貢献していることを示唆している。本論文の成果は、Newtic1や赤血球、赤血球が分泌するTGFβ1の再生における機能解明の重要な手掛かりを提供するものであり、イモリの再生メカニズムの理解、および赤血球に関する生物学的理解を深めるのに大きく貢献するものとして高く評価できる。

令和5年1月24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。