

氏名	榎本 圭		
学位の種類	博 士 (生物科学)		
学位記番号	博 甲 第 7742 号		
学位授与年月日	平成 28年 3月 25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	Identification and Characterization of the Regulatory Proteins of Pluripotency in ES Cells (ES細胞の未分化状態の維持に関わるタンパク質の同定とその機能解析)		
主査	筑波大学教授	博士 (理学)	中田 和人
副査	筑波大学教授	理学博士	沼田 治
副査	筑波大学准教授	博士 (理学)	桑山 秀一
副査	筑波大学准教授 (連携大学院)	博士 (理学)	栗崎 晃

## 論 文 の 要 旨

再生医療分野において、ES細胞や人工多能性幹細胞 (iPS細胞) から目的の細胞や組織を作製し、移植療法に利用する新たな治療方法が期待を集めている。一般的に、終分化した細胞は増殖能が低下することが知られているため、移植に十分な量・大きさの組織を得るには未分化な幹細胞の時点で大量の細胞数を確保する必要がある。未分化細胞を良好な状態で維持しつつ大量の細胞を得る技術を確立するためには、未分化状態の維持機構をよく理解し適切に制御することが重要である。そこで本研究では、ES細胞の未分化状態の維持に関わるタンパク質の同定とその作用メカニズムの解明により、多能性幹細胞の安定大量供給に資する科学的基盤を構築することを目的として研究を行った。

多能性幹細胞の未分化状態の制御に関わる新規因子を同定するため、未分化状態のマウスES細胞と分化細胞からタンパク質を精製し、ディファレンシャルプロテオミクス解析により未分化状態特異的に高発現するタンパク質を解析した。未分化細胞の調製は、マウスES細胞の維持に必要な白血病抑制因子 (LIF) 存在下で培養したマウスES細胞を用いた。一方、LIF不含培地にて7日間培養を行い、未分化状態の指標の一つであるアルカリフォスファターゼ活性が消失した細胞を分化細胞として調製した。プロテオミクス解析にはGE社の2D-DIGE (two-dimensional difference gel electrophoresis) 法を用いて比較解析し、発現量に差のある44個のタンパク質を同定した。次に、未分化細胞特異的に高発現が確認されたタンパク質をマウスES細胞で安定発現させたところ、Fibrillarin(FBL)とProhibitin 2 (PHB2)においてLIFの非存在下での自発的な分化を抑制する活性が観察されたことから、これらがES細胞の未分化状態の維持に重要な役割を持つ因子であることが示唆された。

次にFBLの機能についてさらに詳細な解析を行った。FBLは、rRNA生合成にかかわるRNAメチル化酵素であることが知られているが、ES細胞でFBLをノックダウンするとrRNA生合成が遅延することから、実際にES細胞においてもFBLがrRNAの生合成に必須であることが確認された。また、未分化なES細胞で高発現しているFBLをtet-off制御により部分的にノックダウンすることでFBLの発現レベルを分化細胞程度にまで発現低下させたES細胞では、LIFを添加し未分化状態を維持できる培養条件下においても未分化ES細胞特有のコロニーを形成することができず、初期分化マーカーを発現誘導して自発的に分化する傾向があることを見出した。興味深いことに、rRNA合成阻害剤アクチノマイシンD処理でrRNA生合成を特異的に抑制しても同様の分化誘導が起こることから、FBL発現抑制により観察された分化促進は、rRNAの合成低下によるものであることが示唆された。さらにFBLノックダウンES細胞を用いたDNAマイクロアレイ解析の結果から、FBL発現抑制によるrRNAの生合成低下により発現上昇する遺伝子のジーンオントロジーとして、p53シグナルパスウェイを見出した。さらに、FBL発現抑制による分化促進効果がp53阻害剤によりキャンセルされることから、FBLはrRNA生合成を促進することによりp53シグナルパスウェイを抑制し、細胞死を抑制することで自己複製能の維持に寄与すること、さらに神経系細胞などへの自発的な分化を抑制することで未分化状態の維持に寄与していることを明らかにした。また、iPS細胞の樹立時にFBLを強制発現させることで作製効率が向上することを見出した。この結果は、FBLを用いたiPS細胞の効率的な樹立法の開発の可能性を示すとともに、FBLがES細胞のみならずiPS細胞を含む他の幹細胞の未分化状態制御にも普遍的に関わっている可能性を示すものと考えられる。

## 審 査 の 要 旨

本研究は、多能性幹細胞の制御機構の解明のため、未分化状態の維持に寄与する新たなタンパク質の同定とその機能の解明を行ったものである。未分化ES細胞と分化細胞のディファレンシャルプロテオミクス解析により、多数の特異的発現タンパク質を同定し、特にFBLとPHB2が未分化状態の維持に重要な役割を持つことを明らかにした。FBLについてはさらに詳細な解析を行い、rRNA生合成を介した新しい未分化状態制御メカニズムの存在を明らかにした。本研究の成果は、ES細胞を始めとする幹細胞の未分化状態がrRNA生合成というエネルギー代謝経路によっても制御されるという新たなメカニズムを明らかにしたものであり、生物科学的研究として独創性に秀でている。また、本研究の成果は、再生医療の発展・展開に欠かせない幹細胞の大量培養や品質維持の技術開発に寄与することが期待でき、学問的価値が高い。

平成28年2月1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(生物科学)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。