

## 論文の要約

氏名：榎本 圭

学籍番号：201530245

所属：筑波大学大学院 生命環境科学研究科 生物科学専攻

### 【研究題目】

## 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)

### 【要旨】

胚性幹細胞 (ES 細胞) など多能性幹細胞の未分化状態維持機構の解明を目的として、未分化細胞と分化細胞のタンパク質のディファレンシャルプロテオミクス解析を行った。その結果、ES 細胞において高発現し、未分化状態を維持するタンパク質として **Fibrillarin (FBL)** を見出した。さらに詳細なメカニズム解析を行った結果、**FBL** がリボソーム RNA (rRNA) 生合成を促進し、**p53** シグナルパスウェイを抑制することで自己複製能と未分化状態の維持に寄与していることが明らかとなった。

### 【背景と目的】

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。未分化状態を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解明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を目的とした。

### 【材料と方法】

#### 1. 未分化細胞と分化細胞の調製

マウス ES 細胞の未分化状態の維持に必要な白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor (LIF)) 存在下で培養したマウス ES 細胞を「未分化細胞」として調製した。これに対し、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」とした。

#### 2. プロテオーム解析による、未分化細胞で高発現しているタンパク質の探索と同定

上記 1 で調製した未分化細胞と分化細胞それぞれより細胞内タンパク質を精製し、

two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE)による比較解析を行った。2D-DIGE より見出された、未分化細胞と分化細胞とで発現量に差のあるタンパク質スポットについて、質量分析によるタンパク質の同定を行った。

### 3. 安定発現細胞を用いたバリデーション

上記2で同定したタンパク質のうち、未分化細胞における高い発現量が確認されたものについて、安定発現 ES 細胞を樹立した。この細胞を LIF 非存在下で培養し、未分化状態を維持できるか否か検討した。この実験から、過剰発現することにより LIF 非存在下で見られる自発的な分化を抑制し、未分化状態を維持する活性のあるタンパク質を見出した。

### 4. マウス ES 細胞の未分化状態維持に対する FBL の機能解析

上記3において見出したタンパク質の一つ FBL について、ノックダウンによる未分化状態への影響を検討した。また、FBL ノックダウン細胞の DNA マイクロアレイ解析を行い、多能性幹細胞の未分化状態制御のメカニズムについて詳細な解析を行った。

## 【結果と考察】

### 1. プロテオーム解析による、マウス ES 細胞で高発現しているタンパク質の探索と同定

未分化細胞と分化細胞を 2D-DIGE により比較解析し、両者で発現量に差のあるタンパク質を質量分析により解析した結果、44 個のタンパク質を同定した。次に、同定したタンパク質について Western Blotting による発現解析を行った。未分化細胞で高い発現量が確認されたタンパク質について安定発現する ES 細胞株を作製したところ、FBL と Prohibitin 2 (PHB2)のそれぞれを安定発現する細胞株は LIF の非存在下での自発的な分化を抑制する活性があることが分かり、FBL と PHB2 が ES 細胞の未分化状態の維持に重要な役割を持つことが示唆された。

### 2. FBL のマウス ES 細胞における未分化状態維持活性のメカニズム解析

次に FBL の機能についてさらに詳細な解析を行った。FBL のノックダウン実験の結果より、FBL は rRNA の生合成に必須であることが分かった。また、FBL を分化細胞レベルまで発現抑制した ES 細胞は、培地に LIF を添加し未分化状態を維持できる培養条件下であっても自発的に分化することを見出した。興味深いことに、rRNA 合成阻害剤アクチノマイシン D 処理でも同様の分化誘導が起こることから、FBL 発現抑制による分化促進は rRNA の合成低下によるものであることが明らかになった。

さらに 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として、p53 シグナルパスウェイに関連する遺伝子群を見出した。そこで FBL ノックダウン細胞を解析したところ、実際に p53 の発現上昇と活性化が観察された。また、p53 特異的阻害剤の添加により分化誘導が阻害されることから、FBL ノック

ダウンによる分化誘導はp53シグナルの活性化を介するものであることが明らかになった。

一連の解析により、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、さらに神経系細胞への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が明らかとなった。

#### 【結論】

ES細胞の未分化状態の維持に寄与するタンパク質の同定を目的として、未分化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を行った。その結果、同定されたタンパク質のうちFBLとPHB2が未分化状態の維持に重要な役割を持つことが分かった。FBLについてはさらに詳細な解析を行い、rRNA生合成を介した未分化状態維持のメカニズムを明らかにした。

本研究結果は、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、再生医療などにおいて重要となる幹細胞の大量培養や品質維持の技術開発に貢献するものと考えられる。