

## 学位論文審査結果の要旨

氏名	竹越 大輔
審査委員	主査 飯村 忠浩 副査 佐山 浩二 副査 劉 爽 副査 青戸 守 副査 下川 哲哉

論文名 マウス胚性幹細胞初期分化にはたす Naa10 の役割

### 審査結果の要旨

#### 【背景】

未分化幹細胞のもつ多能性の維持とその分化メカニズムの解明は基礎科学的にも、再生医療への応用という面からも重要である。Nanog、Oct4、Sox2 といった多能性因子と呼ばれる転写因子のネットワークにより多能性が維持されていることが知られている。従来、この多能性因子ネットワークが分化を抑制することで未分化性が維持されると考えられていた。多能性因子は自らの発現を亢進させることで自己保存的に働くことが多いため、多能性因子のネットワークは一見外部からの刺激に対して安定な回路を形成しているように思われる。しかし、実際の発生段階では、胚性幹細胞の由来細胞であるエピブラストは短時間に速やかに多能性を持った未分化状態を脱し、適切な分化を遂げている。このことは多能性因子が分化を抑制している、とする従来の考え方はうまく説明できない。これに対して、近年主張されたのが Precarious balance model である。このモデルでは多能性因子には単純に分化全体を抑制する機能ではなく、特定の系譜への分化を促進し、相容れない他の系譜への分化を抑制するという Lineage specifier としての機能があり、様々な系譜への親和性をもった多能性因子がバランスをとることで未分化状態が維持され、逆にこのバランスが崩れることで特定の方向へ分化が進行する、と考えられている。申請者はこの多能性因子のバランスをとる一つのメカニズムとして Ac/N-end rule タンパク分解経路が関与するのではないかと考え、この経路の主要な N 末端アセチル化酵素である Naa10 に着目し、マウス胚

性幹細胞 (mESCs) を初期発生モデルとして、この命題について解析をした。

#### 【方法】

(1) mESCs は Mek 阻害剤と GSK3 阻害剤、それに LIF を加えた培地 (通称 2iLIF 培地) にて未分化性の高い均質な集団として維持培養できる。2iLIF 培地から阻害剤と LIF を除去することで、mESCs は自発的に分化を始める。Naa10 KO mESCs を樹立し、2iLIF 除去による分化誘導を行い、種々の分化系譜マーカーの発現解析を行った。

(2) そのメカニズムとして、当初の仮説に基づき「Ac/N-end rule タンパク分解経路の機能不全により、多能性因子間のバランスが崩れている」かどうか検討した。過去の報告で Lineage specifier としての活性があると想定される多能性因子 (NANOG, TBX3, OCT4, SALL4, ESRRb, KLF4, SOX2) のタンパクの安定性を cycloheximide chase にて評価した。

(3) 他のメカニズムを検討するため、公開されている Naa10 KO mESCs の RNA-seq データを用いてパスウェイ解析を行った。

(4) Naa10 KO mESCs において、MAPK シグナル経路が活性化していないか Western blot にてリン酸化 ERK を定量した。

(5) KO 株に Mek 阻害薬あるいは FGF レセプター阻害薬を投与し分化への影響を検討した。

#### 【結果と考察】

Naa10 KO mESCs では原始内胚葉への分化が亢進していることが種々のマーカーの解析により示された。Naa10 KO によって安定性が向上する因子を見出すことはできなかった。パスウェイ解析の結果、Naa10 KO によって MAPK signaling pathway が有意に亢進していることが示された。KO 株で、実際に MAPK シグナル経路が亢進していることを確認した。KO 株に Mek 阻害薬を投与したところ、KO 株で認められていた原始内胚葉マーカーである Gata6 の亢進が認められなくなった。一方で、FGF レセプター阻害薬では Gata6 の低下を認めるものの、野生株との有意な差が解消されなかった。このことから、Naa10 KO mESCs では、FGF レセプターより下流、Mek 以上のレベルで MAPK シグナルが亢進しており、そのため原始内胚葉系譜への分化が亢進していることが示された。

これらの観察結果から、Naa10 は mESCs の初期分化において、MAPK 経路を抑制することによって分化傾向が原始内胚葉方向へ傾くことを抑制し、エピブラスト系譜への分化をサポートしていること、Ac/N-end rule タンパク分解経路による多能性因子のバランスの調節は、少なくとも解析した限りにおいて関与していないことが示された。

本論文は、マウス胚性幹細胞の系譜分化系において N 末端アセチル化酵素である Naa10 の新規機能を発見した。公開審査会は、平成 31 年 1 月 23 日に開催され、申請者は、研究内容を英語で明確に発表し、1) 胚性幹細胞の多分化能維持における分子メカニズムは何か、2) Naa10 の標的分子を今後どのように探索するか、3) 使用した阻害薬の濃度設定の根拠は何か、4) マウス胚性幹細胞の系譜分化における FGF シグナルや Wnt シグナルの役割は何か、5) 今回の観察結果が、Naa10 ノックアウトマウスの表現型や関連遺伝子疾患の病態とどう関連するか、などに関する多くの質問に対し日本語で的確に応答した。

審査委員は、申請者が本論文関連領域に対して学位授与に値する十分な見識と能力を有することを全員一致で確認し、本論文が学位授与に値すると判定した。