

学位論文の要約 (研究成果のまとめ)

氏名 竹越 大輔

学位論文名 マウス胚性幹細胞初期分化にはたす Naa10 の役割

学位論文の要約

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科学的に興味深いのみならず、再生医療への応用という面からも重要である。多能性の維持に関する知見は近年急速に蓄積され、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明らかとなった。従来の考え方では、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、実際には多能性・未分化性は発生段階のごく短時間認められる性質であり、胚性幹細胞の由来細胞であるエピブラストは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。このことは単純に多能性因子が分化を抑制している、とする従来の考え方で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。

我々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た。Ac/N-end rule タンパク分解経路とは、Initiator methionine の次のアミノ酸が特定のアミノ酸である場合に N 末端がアセチル化を受け、それがタンパク分解シグナルとして機能する、というタンパク分解経路である。我々はこの経路の主要な 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利用してこの命題について解析をした。

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ことが知られている。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ことが知られており、特定の系譜への誘導を行わないことから当該細胞株の性質を反映すると考えられている。我々は Naa10 KO mESCs を樹立

し、2iLIF 除去による分化を行ったところ、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。

次に、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 にて評価したが、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。

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。結果、MAPK signaling pathway が優位に亢進していることが示された。そこで、我々の Naa10 KO mESCs においても 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 を定量したところ、KO 株で優位に MAPK シグナル経路が亢進していることが確認された。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、MAPK シグナル経路の主要な活性化因子である FGF のレセプターの阻害薬では 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。

まとめると、この研究により、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。

なお、この学位論文の内容は、以下の原著論文に既に公表済である。

主論文 : Takekoshi D, Tokuzawa Y, Sakanaka M, Kato H: The N-end rule pathway enzyme Naa 10 supports epiblast specification in mouse embryonic stem cells by modulating FGF/MAP K signaling. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, accepted.