

審査の結果の要旨

氏名 春日 秀文

幹細胞などの未分化な細胞は、栄養条件に応じて、自己複製や休眠維持、又は分化などの頻度やタイミングを適切に制御する必要があり、この破綻は、幹細胞プールの枯渇や癌幹細胞の発生といった病態と関連することが示唆されている。孵化直後（L1 幼虫期）の線虫 *Caenorhabditis elegans* の幹・芽細胞群は、飢餓条件下では増殖や分化を停止した休眠状態で維持されているが、摂食を開始すると栄養に応答し、一斉に休眠から離脱して発生を開始する。「インスリン経路によって発現調節され芽細胞群の栄養応答性休眠を制御する microRNA *mir-235*」と題した本論文では、これらの幹・芽細胞の栄養応答性制御に関わる新規因子の探索から、microRNA である *mir-235* がインスリン経路の下流で飢餓条件下での芽細胞群の休眠維持に関わることを見出している。

1. インスリン経路を介した栄養応答性の幹・芽細胞制御に関わる因子の探索と microRNA *mir-235* の同定

インスリン経路によって負に制御される *daf-16/FoxO* の欠失変異体では、飢餓条件下において、芽細胞群の休眠状態を維持出来ない。そこで、*daf-16/FoxO* 変異体と同様な表現型を示す変異体を探索し、microRNA である *mir-235* を同定した。*mir-235* の欠失変異体では、飢餓条件下にも関わらず、神経芽細胞の体側面から腹側への細胞移動、さらに中胚葉性芽細胞の分裂といった芽細胞群の休眠状態からの離脱と活性化が観察された。このことから、*mir-235* が飢餓時の芽細胞群の休眠維持に必須であることが明らかとなった。

2. *mir-235* は表皮とグリア細胞で機能する

mir-235 の発現部位を明らかにするために、*mir-235* のプロモーター領域の下流に GFP を融合したレポーター遺伝子を構築した。飢餓条件下において GFP は、神経芽細胞を含む表皮全般と頭部神経のグリア細胞において発現が観察された。しかし、中胚葉性芽細胞では発現が認められなかったことから、*mir-235* は中胚葉性芽細胞を細胞非自立的に制御していることが示唆された。この結果を踏まえ、*mir-235* を各種組織特異的プロモーターを用いて *mir-235* 欠失変異体に発現させた。*mir-235* 変異体の表現型は、*mir-235* の表皮特異的発現によって救助されるのみならず、グリア細胞を含む神経系細胞全般への発現によっても同様に救助されたことから、*mir-235* は表皮とグリア細胞において、それぞれ芽細胞群の休眠状態を維持することが明らかとなった。

3. *mir-235* の発現は栄養に応答してインスリン経路により抑制される

飢餓・栄養条件下それぞれにおける *mir-235* をノーザンブロットにより解析した。飢餓の間、*mir-235* の発現が持続し、さらに、摂食の開始に伴って *mir-235* の発現は減少した。*daf-2/InsR* の変異体における *mir-235* の発現変動を検討したところ、*daf-2/InR* 変異体においては、栄養条件下での発現減少が見られなかった。さらに、飢餓条件下においても、野生型と比較して、*daf-16/FoxO* 依存的に *daf-2/InR* 変異体でその発現量が上昇していた。以上から、*mir-235* は栄養に応答してインスリン経路によって発現が抑制されていることが明らかとなった。

4. *mir-235* は *nhr-91* の発現抑制を介して飢餓時の芽細胞休眠を維持する

複数のアルゴリズムによって重複して予測された標的遺伝子候補の中で、飢餓条件下において、野生型に比較して *mir-235* 変異体で発現が増加している遺伝子を探索し、*nhr-91/GCNF* を見出した。*nhr-91* が *mir-235* の直接の標的遺伝子であるか検討するために、*nhr-91* の 3'-UTR を用いた GFP レポーター実験を行った。GFP を *nhr-91* の 3'-UTR の制御下で発現させると、GFP が発現しない形質転換体が多く見られる一方で、その 3'-UTR における二カ所の *mir-235* 認識配列の 2 残基を異なる塩基に置換すると、GFP を発現する形質転換体が有意に増加することから、*mir-235* が *nhr-91* の 3'-UTR の認識配列を介して直接発現制御していることが示された。さらに、*mir-235* 変異体の飢餓時の神経芽細胞の細胞移動は、*nhr-91* の欠失により有意に抑制された。以上から、飢餓時の芽細胞の休眠維持に、*mir-235* による *nhr-91* の発現抑制が関わるということが明らかとなった。

本論文から、microRNA *mir-235* が *nhr-91/GCNF* の発現抑制を介して、飢餓条件下における芽細胞群の休眠状態を維持すること、またその発現が、栄養によってインスリン経路を介して抑制されることを明らかとなった。*mir-235* は哺乳類 miR-92 の相同遺伝子であり、miR-92 は miR-17~92 クラスターファミリーの一つとして発現する。このクラスターはリンパ腫や各種固形癌での高発現が報告されており、癌原遺伝子として初めて示された microRNA 群である。今後、これら哺乳類相同遺伝子の栄養応答性や幹細胞制御への関与の検討から、幹細胞の栄養応答性制御の理解に重要な知見を与えることが期待される。以上を要するに、本論文は博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。