

イッシティアック アリフ氏の学位論文審査の要旨

論文題目

Tsukushi proteoglycan maintains RNA splicing and developmental signaling network in GFAP-expressing subventricular zone neural stem/progenitor cells

(GFAP を発現する脳室下帯神経幹細胞/前駆細胞の RNA スプライシングと発生シグナルネットワークを維持するプロテオグリカン Tsukushi)

Tsukushi (TSK) は分泌型タンパク質で、Wnt、BMP、Notch といった発生に関わる主要なシグナル伝達経路と相互作用することにより、初期の形づくりに関して重要な役割をもつ。中枢神経系においては、Wnt シグナルを介して網膜や脳の形態形成を制御することが明らかになっている。申請者は、本来であれば細胞外に分泌される TSK タンパク質が核内に移行することに着目し、TSK の核内における役割を明らかにする目的で、TSK ノックアウトマウス (TSK^{-/-}) を用いた一連のバイオインフォマティクス解析を行った。

まず、生後3日目の脳組織を用いて抗 TSK モノクローナル抗体により免疫組織染色法を行い、TSK タンパク質が細胞質内だけでなく核内にも局在することを明らかにした。次に、GFAP^{GFP/+}マウスと TSK^{-/-}マウスを用いて、GFAP^{GFP/+}/TSK^{-/-}マウスを樹立した。生後3日目の GFAP^{GFP/+}マウスまたは GFAP^{GFP/+}/TSK^{-/-}マウスから、側脳室下帯を単離し、酵素処理後、FACS を用いて 100 個の GFP 陽性細胞を精製した。TSK の転写制御への関与を調べるために、ultralow input RNA-sequencing 法を採用し解析したところ、GFAP^{GFP/+}マウスと GFAP^{GFP/+}/TSK^{-/-}マウス間では、2,666 遺伝子の発現に差がみられた (62%が上昇、28%が減少)。次に、Gene Set Enrichment 解析を行い、Wnt などの主要なシグナル伝達経路が影響を受けていたことを見出した。解析の進行中に、GFAP^{GFP/+}/TSK^{-/-}マウスでは、多くの新規転写産物がデフォレンシアルエクソン使用産物中に観察されたことから、スプライシングエラーが多く存在することが示唆された。遺伝子オントロジー解析では、神経幹細胞の発生期において TSK がスプライシングに重要な役割を持つことを示した。さらに解析を進めると、転写された mRNA 前駆体からイントロンを取り除くスプライセオソーム関連遺伝子のスプライシングが異常で、特に Rbm5 遺伝子のエクソン変換が異常であった。TSK が制御するスプライシング機構を調べるために、タンパク-タンパク相互作用解析を行なったところ、TSK が Bud31 と相互作用することが明らかになった。TSK^{-/-}マウスでは、Wnt、ソニックヘッジホッグ、mTOR シグナル関連遺伝子の転写とスプライシングが乱れていた。

審査では、TSK と Bud31 の核内結合と細胞周期との関係、TSK 遺伝子欠損が細胞分化やサーカディアンリズムに与える影響、TSK 遺伝子を欠損すると Wnt シグナルは増強するのか、野生型マウスと TSK^{-/-}マウスの脳圧や脳脊髄液量についての比較、TSK タンパク質はどのようにして核内まで運ばれるのか、変異型 TSK タンパク質は Bud31 に結合するのか、脳室に投与した TSK タンパク質は核内に取り込まれるのかなど、多くの質問がなされたが、申請者から概ね適切な回答と考察がなされた。

本研究は、分泌型タンパク質 TSK が核内に移行することで、神経幹細胞の恒常性維持と細胞系譜の制御に関与することを初めて示したものであり、脳幹細胞ニッチの分子機構の解明に新たな知見をもたらしたという点で学位に値する意義ある研究と認めた。

審査委員長 多能性幹細胞学担当教授

丹羽 仁史