

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	竹立 恭子
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1、2 項該当		
論文題目 Manipulation of Cell Cycle and Chromatin Configuration by Means of Cell-Penetrating Geminin (膜透過型ジェミニンによる細胞周期およびクロマチン構造の操作)			
論文審査担当者			
主 査	田代 聡	印	
審査委員	稲葉 俊哉		
審査委員	孫 継英		
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>本著者の所属する研究室では造血幹細胞の活性を制御する分子基盤を解明することを目的として、ポリコーム遺伝子群(PcG)複合体と Hox について研究を進めてきた。そして PcG 複合体と Hox それぞれが、DNA 複製ライセンス化制御因子 Geminin タンパク質の分解制御を介して造血幹細胞の活性を制御していることを明らかにした。これらの結果から Geminin が造血幹細胞の活性制御において中核的役割を果たしていることが推測された。Geminin は DNA 複製ライセンス化因子 Cdt1 と直接結合して、その機能を阻害することで DNA 複製を制御する分子である。一方で、Geminin はクロマチンリモデリング因子である Brahma や Brg1 と直接結合し、その機能を阻害することによって神経幹細胞や胚性幹細胞、さらに人工多能性幹細胞の未分化性維持に関与していることが知られている。これらの知見から、Geminin が造血幹細胞の増殖と分化の誘導を掛け分ける機能をしていることが予測された。そこで、本著者は造血幹細胞における Geminin の機能を詳細に解析することを目的として、細胞内の Geminin タンパク質量を操作するための新たな技術開発を目指し、本研究を計画した。</p> <p>研究室ではこれまでに、レトロウィルスベクターや shRNA 技術を用いた Geminin の高発現系と発現抑制系を作製している。しかし、これらの方法は恒常的に Geminin を高発現もしくは発現抑制させるために、細胞機能を破綻させる可能性がある。造血幹細胞が自己複製、あるいは分化して成熟血球を産生する過程においては、Geminin の発現変化によって、その増殖と分化の機能制御がなされていることが推測される。従って、造血幹細胞の機能を詳細に解明するためには Geminin の発現を自由自在にコントロールできる実験系を構築する必要がある。そこで、本著者は FGF4 の membrane translocating motif</p>			

(MTM) 配列を融合することによって細胞内に直接導入することができる遺伝子組換え型タンパク質 cell-penetrating (CP-) Geminin の開発を計画した。まず大腸菌を用いた発現系で CP-Geminin を大量に産生させ、アフィニティ精製を行った。この CP-Geminin は、培養液中に添加することによって、濃度依存的、かつ時間依存的に NIH 3T3 細胞内に導入されることが解った。また、培養液中から CP-Geminin を除くと細胞内に導入されていた CP-Geminin は速やかに分解され消失する。従って、CP-Geminin を用いることによって細胞内の Geminin タンパク質量を速やかに操作できる。さらに、CP-Geminin が内在性の Geminin 分子と同様に Cdt1 や Brahma/Brg1 と細胞内で直接結合することを免疫沈降法で確認した。次に、細胞レベルで機能を調べたところ、導入された CP-Geminin は核に移行し、細胞周期の S 期への移行を阻害することや、クロマチンリモデリングの抑制を介して、転写を制御することが解った。これらの結果は、CP-Geminin を培養液中に添加あるいは除去することにより、細胞内の Geminin タンパク質量を自在に増減させ、細胞周期やクロマチンリモデリングを制御できることを示している。

本論文は、Geminin の新規な発現操作法の開発について報告しており、造血幹細胞の増殖と分化を制御する Geminin の機能をさらに詳細に明らかにするために有用なツールを提供するとともに、造血幹細胞や白血病幹細胞をはじめとする幹細胞の活性を制御することのできる新技術の開発に道を開くことが期待される。よって審査委員会委員全員は、本論文が著者に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値があるものと認めた。