

論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博士（理学）	氏名	平林 諒
学位授与の要件	学位規則第4条第①・②項該当		
論文題目			
Analyses of zebrafish Ddx46 function in the tissue and organ formation. (組織・器官形成におけるゼブラフィッシュ Ddx46 の機能解析)			
論文審査担当者			
主査	教授	菊池 裕	
審査委員	教授	小原 政信	
審査委員	教授	矢尾板 芳郎	
審査委員	教授	安井 金也	
〔論文審査の要旨〕			
<p>造血幹細胞は体性幹細胞の一種であり、全ての血球系細胞に分化可能な幹細胞として知られている。この造血幹細胞に異常が生じると正常な血球系細胞が作られず、白血病などの造血障害の原因となる。最近、造血幹細胞の異常により起こるヒト骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndrome; MDS）では、precursor mRNA (pre-mRNA) スプライシングに参与する遺伝子に高頻度に変異が起こっている事が報告された。pre-mRNA は DNA から転写された直後の mRNA であり、タンパク質をコードする遺伝子領域（エクソン）と非コード領域（イントロン）が繋がったものである。Pre-mRNA は pre-mRNA スプライシングによって成熟した mRNA となり、タンパク質への翻訳が可能になる。この pre-mRNA スプライシングは、U1, U2, U4, U5, U6 と呼ばれる5種類の低分子核内リボヌクレオタンパク質（small nuclear ribonucleoprotein; snRNP）と複数のスプライシング特異的タンパク質から構成される spliceosome によって行われることが知られている。しかし、造血幹細胞の異常を起こす pre-mRNA スプライシングの詳細な機構に関しては、未だ不明な点が多く残されていた。</p> <p>Ddx46 は SF2 helicase family に属する RNA ヘリカーゼの一種であり、酵母では pre-mRNA スプライシングに機能する事が報告されていたが、脊椎動物における Ddx46 の機能に関しては不明であった。本論文の著者が所属する研究室では、ゼブラフィッシュを用いた突然変異体のスクリーニングにより、Ddx46 (DEAD-box polypeptide 46) 変異体が単離されていた。Ddx46 変異体の表現型の解析を行った結果、消化器官や脳形成に異常が起こる事、消化器官や脳の形成に必要な遺伝子の pre-mRNA スプライシングが異常になる事が明らかとなった。ゼブラフィッシュ Ddx46 は、発生の初期においては胚全体で発現しているが、発生が進むにつれて特定の組織・器官（消化器官や脳など）に発現が限局していた。この発現が限局する領域は、変異体で異常が確認された領域と一致しており、Ddx46 は発現領域において、pre-mRNA スプライシングを制御している事が予想された。本論文の著者は、更に Ddx46 変異体の詳細な解析を行った結果、Ddx46 遺伝子が尾部造血組織において発現している事を新たに見出し、造血幹細胞における Ddx46 の機能に関し</p>			

て解析を行った。

脊椎動物の造血は生物種間で高く保存されており、発生の初期に胚全体に血液細胞を供給するために行われる一次造血と、大動脈・性腺・中腎領域 (aorta-gonad-mesonephros region ; AGM 領域) から出現する造血幹細胞による二次造血 (生涯を通じた造血に繋がる) が存在している。本論文の著者は、造血における *Ddx46* 変異体の解析を行った結果、一次造血は正常であるが、造血幹細胞が減少することにより二次造血に異常が生じることを明らかにした。この造血幹細胞の異常に関して更なる解析を行った結果、造血幹細胞減少の原因として細胞死や細胞増殖の異常は確認されず、造血幹細胞自身は正常に分化することが明らかになった。しかし、造血幹細胞の維持に必要な遺伝子 (*cmyb*, *tal1*) の発現が消失するため、造血幹細胞が減少すると予想された。

本論文の著者は造血幹細胞からの血球分化を調べた結果、*Ddx46* 変異体では赤血球・リンパ球のマーカ―遺伝子の発現が減少していたが、白血球マーカ―遺伝子の発現は減少していないことを明らかにした。また、赤血球・白血球のマーカ―遺伝子の pre-mRNA スプライシングに関して解析を行った結果、減少している *gata1a* 遺伝子 (赤血球分化を制御する遺伝子) の pre-mRNA スプライシングは異常になっている一方で、減少していない *spi1* 遺伝子 (白血球分化を制御する遺伝子) の pre-mRNA スプライシングは正常であり、スプライシングされる遺伝子に選択性が存在していることが示唆された。更に本論文の著者は、造血幹細胞の維持に必要な *cmyb* 遺伝子の pre-mRNA スプライシングも異常であることを見出した。以上の結果から *Ddx46* 変異体では、造血に関わる遺伝子の pre-mRNA スプライシングに異常が起ることで造血幹細胞の維持や赤血球・リンパ球細胞の分化に異常が生じていると考えられた。従って、生体内における *Ddx46* は、特定の遺伝子の pre-mRNA スプライシングに機能する事により、造血幹細胞の維持及び多系列な血球細胞への分化に機能している事が示唆された。

以上、RNA ヘリカーゼの一種である *Ddx46* が生体内において造血幹細胞の多系列細胞分化能に機能することは、脊椎動物における最初の報告であり、造血幹細胞からの多系列な血球細胞分化におけるスプライシングの機能に関して新たな知見を与えるものであることから高く評価できる。審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

Hirabayashi, R., Hozumi, S., Higashijima, S., and Kikuchi, Y. (2013).

Ddx46 is required for multi-lineage differentiation of hematopoietic stem cells in zebrafish.

Stem Cells and Development 22: 2532-2542.

参考論文

Hozumi, S., Hirabayashi, R., Yoshizawa, A., Ogata, M., Ishitani, T., Tsutsumi, M., Kuroiwa, A., Itoh, M., and Kikuchi, Y. (2012).

DEAD-box protein Ddx46 is required for the development of the digestive organs and brain in zebrafish.

PLOS ONE 7(3): e33675.