

氏名	板倉 英祐
博士の専攻分野の名称	博士（理学）
学位記号番号	博理工甲第 741 号
学位授与年月日	平成 21 年 3 月 24 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	遺伝子改変動物を用いた遺伝子の機能解析、特に哺乳類新規遺伝子 Atg14 によるオートファジーの機能解析
論文審査委員	委員長 教授 井上 金治 委員 教授 坂井 貴文 委員 教授 西垣 功一 委員 准教授 足立 明人 委員 教授 水島 昇（東京医科歯科大学大学院）

論文の内容の要旨

遺伝子改変動物は遺伝子の欠損、過剰発現などによる特定遺伝子の生理的機能解析、疾患モデル生物の作成、マーカー遺伝子の導入など医学・医療分野、生命科学分野の研究に必須の手法となっている。

1) GFP 特異的発現トランスジェニックラットに (tg ラット) による下垂体濾胞星状細胞の解析

下垂体は主に分泌顆粒を持つ内分泌細胞と分泌顆粒を持たない細胞からなる。内分泌細胞には成長ホルモン (GH)、プロラクチン (PRL)、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、性腺刺激ホルモン (LH/FSH) の 5 種類のホルモン産生細胞が存在する。そしてホルモンを産生しない分泌顆粒を持たない細胞は主に濾胞星状細胞 (FS 細胞) が存在することが古く知られている。だがその FS 細胞の生理的役割はよくわかっていない FS 細胞の生理的役割を調べるために FS 細胞特異的に GFP を発現する Tg の作成を行った。FS 細胞特異的発現のために FS 細胞特異的マーカーとして知られている S-100 b タンパク質を利用した。この S-100 b タンパク質はホルモン産生細胞では発現していないため、FS 細胞特異的なプロモーター活性を有する。まず最初に作成した S-100bGFPTg ラットの下垂体内 GFP 発現を観察した。予想通り S-100b 発現細胞特異的であったことから FS 細胞特異的に GFP 発現をしていることがわかった。また他の組織における S-100b 発現細胞においても GFP 発現を観察できた。次にこの下垂体 GFP 発現細胞を FSCS によって単離後、逆転写 PCR (RT-PCR) によって遺伝子発現を解析した。予想通り GFP 発現細胞において S-100b 遺伝子は発現しており、GFP 非発現細胞においてホルモン遺伝子発現を確認することができた。さらに下垂体凍結切片から GFP 発現の立体構造を作成することもできた。これらの結果よりこの S-100bGFP Tg ラットは FS 細胞の機能解析に非常に優れたツールとなり、その解析により FS 細胞の生理的役割が明らかになると考えられる。

2) 骨格筋特異的オートファジーノックアウトによる筋肉内オートファジーの解析

オートファジーは細胞質内タンパク質大規模分解系として、飢餓時に自己タンパク質の分解を介してアミ

ノ酸を供給し、飢餓を生き延びるために重要なメカニズムとして知られている。しかし哺乳類組織において最もタンパク質を貯蔵している器官である骨格筋においてオートファジーがどのような役割を担っているのかよくわかっていない。今回、骨格筋におけるオートファジーの役割を調べるために骨格筋特異的オートファジーノックアウトマウスを作成し、その解析を行った。骨格筋特異的ノックアウトのために、骨格筋特異的発現が知られているミオシンライトチェーン遺伝子プロモーター (Mlc1l) 特異的に Cre 組み換え酵素を発現するトランスジェニックマウスと、オートファジーに必須の遺伝子として知られている Atg5 遺伝子のエキソン3の両端に Loxp 配列を導入した Atg5Flox マウスを使用した。これらのマウスを交配させ、作成した骨格筋特異的オートファジーノックアウトマウスにおいてオートファジーが骨格筋特異的に欠損しているかどうかを検討した。その結果、LC3II のコンバージョン、オートファジー特異的基質 p62 の蓄積がおこっていたことから、骨格筋においてオートファジーが抑制されていることがわかった。次に筋肉内において p62 の局在を検討した。その結果骨格筋において p62 を含むタンパク質凝集体が蓄積していた。これらのことから骨格筋オートファジーは筋肉細胞内のタンパク質クリアランスに重要であることがわかった。

3) 新規哺乳類オートファジー遺伝子 Atg14 の解析

近年の哺乳類オートファジーの研究によりオートファジーは飢餓応答だけでなく、内因性、外来性の抗原はオートファゴソームを介して MHC クラス分子に提示することで抗原提示に関わっていること、細胞内タンパク質を恒常的に分解することでタンパク質凝集体の形成を防ぐタンパク質クリアランス、進入した細菌を分解する細菌分解、卵由来タンパク質を分解する受精卵発生、細胞内オルガネラなどを過剰に分解することで細胞死を誘導すること、またそれによる癌抑制、いわゆる老化タンパク質を分解することによる長寿など様々な生理現象に関わっていることがわかってきた。これら多くの発見からオートファジーの活性化、または不活性化は様々な臨床的応用が可能であると考えられるが、現在オートファジー特異的な促進剤、抑制剤となるような化合物は見つかっていない。オートファジー特異性のために標的としてはオートファジー特異的遺伝子 Atg が考えられる。酵母の研究によりオートファジーに必須の Atg 遺伝子は多く単離されたが、それら Atg がどのようにオートファゴソーム形成に関わっているのかよくわかっていない。これら Atg 遺伝子の分子機構の解明は Atg を標的とした薬剤開発に非常に役に立つと考えられる。また酵母 Atg のほとんどは哺乳類にホモログがあることが Blast 検索からわかっているが、Atg14 は 10 年ほど前に発見されているにも関わらず、未だにその哺乳類ホモログは見つかっていないため Atg14 は哺乳類にないものと考えられていた。そこで今回哺乳類 Atg14 を PSI-BLAST によって機能未知遺伝子 KIAA0831 (Atg14) として同定し、解析を行った。その結果今回発見した Atg14 はオートファジーに必須であることがわかった。

論文の審査結果の要旨

遺伝子改変動物は機能の明らかになっていない遺伝子の機能解析のために有効な手段として使用されてきた。また、特定の細胞に蛍光物質などのマーカータンパク質を発現させることにより、これらの細胞の機能解析にも重要なツールとして盛んに使用されるようになって来ている。このような遺伝子改変動物を利用し、本論文では第一章では緑色蛍光タンパク質 (GFP) を下垂体の濾胞星状細胞に発現する遺伝子改変動物を作成に関して述べられている。また、第二章および第三章ではこの技術を使用し、オートファジーの機能解析と、新規のオートファジー遺伝子の同定、および、この遺伝子の機能解析についての結果が述べられている。これらの論文の概要は以下の様である。

1) S100b 陽性、下垂体濾胞星状細胞に GFP を特異的に発現するトランスジェニックラットの開発：

下垂体前葉には分泌顆粒を持つ内分泌細胞と、分泌顆粒を持たない無果粒性細胞で、非内分泌細胞である濾胞星状細胞 (FS 細胞) が存在する。従来の研究から FS 細胞は下垂体の支持細胞としての機能が示唆されているが未解明の問題も多く残されている。本研究ではこの FS 細胞の生理的役割を調べるために FS 細胞に特異的に Green Fluorescent Protein (GFP) を発現するトランスジェニックラット (Tg ラット) の作成を目指した。本研究では FS 細胞が細胞特異的に発現する S100b 遺伝子に注目し、この遺伝子の細胞特異的発現に関わるプロモーターの解析が行われた。次にこのプロモーターの下位に GFP 遺伝子を結合し、トランスジェニックラット (S-100bGFPTg ラット) を作成した。得られた S-100bGFPTg ラットは期待されたように S-100b 陽性のアストロサイトや脂肪細胞に GFP が細胞特異的に産生された。また、下垂体前葉では FS 細胞が GFP を特異的に産生することを明らかにした。これらの結果は Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS) や免疫細胞化学による解析からも、FS 細胞が同時に S-100b 遺伝子も発現していることで確認できた。また、得られた S-100bGFP Tg ラットは FS 細胞やアストロサイトなどの S100b 陽性細胞の機能解析に非常に優れたツールになることを示している。この動物は現在京都大学の実験動物センターを通じて国際的に使用されるようになっている。

2) 骨格筋特異的オートファジーノックアウトマウスによる研究：

オートファジーは細胞質内タンパク質の大規模分解系であり、飢餓時に自己タンパク質の分解を介してアミノ酸を供給し、飢餓を生き延びるために重要な役割をもつことが知られている。しかし哺乳類の組織でタンパク質を多く貯蔵している器官である骨格筋においてオートファジーがどのような役割を担っているかは明らかになっていない。本論文では、骨格筋におけるオートファジーの役割を調べるために骨格筋に特異的なオートファジー遺伝子のノックアウトマウスを作成し、その解析を行った。まず骨格筋特異的ノックアウトマウス作製のためにミオシンライトチェーン遺伝子プロモーター (Mlc1l) 依存的に Cre 組み換え酵素を発現するトランスジェニックマウスと、オートファジーに必須の遺伝子として知られている Atg5 遺伝子のエキソン 3 の両端に LoxP 配列を導入した Atg5 Flox マウスを使用した。これらのマウスを交配させ骨格筋特異的オートファジーノックアウトマウスを作成した。そしてこのマウスにおいてオートファジーが骨格筋特異的に欠損しているか否かが検討された。その結果、KO マウスの骨格筋に LC3II フォームとオートファジー特異的基質 p62 の蓄積を引き起こしており、KO 動物の骨格筋ではオートファジーが抑制されることを明らかにした。次に筋肉内において p62 の局在を検討した結果、骨格筋において p62 を含むタンパク質凝集体が蓄積しており、骨格筋におけるオートファジーが筋細胞内でのタンパク質のクリアランスに関与することを明らかにしている。

3) 新規哺乳類オートファジー遺伝子 Atg14 の解析：

オートファジーは飢餓応答だけでなく、内因性、および外因性の抗原をオートファゴソームで断片化し MHC 分子を介して抗原提示に関わっていること、細胞内タンパク質を恒常的に分解することでタンパク質凝集体の形成を防ぐ役割、進入した細菌の分解、哺乳類の受精卵初期発生過程でのアミノ酸供給、細胞内オルガネラなどを過剰に分解することで細胞死を誘導すること、また癌抑制、さらに老化タンパク質を分解することによる老化遅延など様々な生理現象に関わっていることが明らかになってきた。これら多くの生理的役割からオートファジーの活性化、または不活性化は様々な臨床的応用が可能であると考えられる。しかしこれまでオートファジー特異的な促進剤、抑制剤となるような化合物は見つかっていない。一方、オートファジーの標的としてオートファジー特異的遺伝子 Atg が考えられる。これまでの酵母の研究によりオートファジーに必須の Atg 遺伝子は多く単離されたが、それら Atg がどのようにオートファゴソーム形成に関わっているのかは明らかになっていなかった。これに対し、酵母 Atg のほとんどは哺乳類にホモログがあることが明らかになっているが、Atg14 は 10 年ほど前に発見されているにも関わらず、未だにその哺乳類ホモログは見つかっていない。このため Atg14 は哺乳類にないものと考えられていた。これに対し、著者は哺乳類 Atg14 を Position-Specific-Iterative (PSI)-BLAST によって機能未知遺伝子 KIAA0831 (Atg14) として同定し、その機能解析を行った。その結果、KIAA0831 が哺乳類の Atg14 のホモログであり、オートファジーに必須であることを明らかにした。

本論文の研究結果は生命科学に新しい知見を加えた。また、S-100bGFPTg ラットは脳のアストロサイトや下垂体の濾胞星状細胞の研究のために優れた材料として注目され、既にいくつかの研究室において使用されてきている。また、この研究は日本神経内分泌学会で高く評価され若手奨励賞を受賞した。

なお、これらの研究内容は *Endocrinology* や *Mol. Biol. Cell* など一流の国際誌に筆頭著者として発表されている。このため、本論文審査委員会は本論文が博士〔理学〕の学位にふさわしいと判断した。