

京都大学	博士 (薬学)	氏名	三輪 裕幸
論文題目	神経系特異的に発現する新規BMPアンタゴニストBrorin及びBrorin-likeの発見とその機能解析		
<p>(論文内容の要旨)</p> <p>分泌性因子は細胞間のシグナル伝達に働き、組織の機能・形成に重要な役割を果たす。そのため、医療・医薬品のターゲットになり得る可能性が高い。一般に、分泌性因子はそのN末端に疎水性アミノ酸が多く含まれる分泌性シグナル配列を持つ。そこで、分泌性シグナル配列を指標に、データベースから新規遺伝子の探索を行い、互いに高い相同性を持つ二つの機能未知な新規遺伝子を同定した。これらをBrorin及びBrorin-likeと命名し、生理的役割について検討を行った。</p> <p>第一章 Brorinの同定及び機能・発現解析</p> <p>マウス胎児よりBrorinを単離・同定したところ、Brorinは324アミノ酸からなり、ヒトオルソログは約90%の相同性を有していた。また、C末端側にBMPアンタゴニストであるChordin familyに共通のcysteine-rich domainを2つ有していた。</p> <p>Brorinの発現をRT-PCRにより検討した結果、生後56日齢においては脳特異的に発現していることが分かった。また、その発現は胎児期から発達が進むにつれて上昇していた。更にin situ hybridizationを行ったところ、Brorinは胎児期においても脳・神経系特異的に発現していることが分かった。8週齢の脳において、特に間脳、中脳、延髄に強く発現しており、その発現は神経細胞特異的であった。</p> <p>Brorinの分泌能を検討するため、BrorinをCOS-7細胞で強制発現させたところ、培養上清中から組換えBrorinが検出された。この結果から、Brorinは細胞外分泌因子であることが明らかになった。その後、バキュロウイルス発現系を用いて組換えBrorinを得た。</p> <p>BrorinはChordin familyに共通のcysteine-rich domainを有することからBMP阻害活性を持つと考え、MC3T3-E1細胞を用いてその活性を検討した。先の組換えBrorinを添加したところ、BMPによるアルカリフォスファターゼ活性の上昇とSmadのリン酸化を抑制した。また、胎生13.5日齢のマウスより得た神経系前駆細胞に組換えBrorinを添加し、その活性を検討した結果、Brorinによって神経系前駆細胞のニューロンへの分化が促進されることが分かった。これまでにBMPは神経系前駆細胞に働きかけ、ニューロンへの運命決定を阻害することが分かっており、BrorinがBMP活性を抑制することでニューロンへの分化を促進したと考えられる。</p> <p>第二章 Brorin-likeの同定及び機能・発現解析</p> <p>マウス胎児よりBrorin-likeを単離・同定したところ、Brorin-likeは222アミノ</p>			

酸からなり、Brorinとの相同性は48.6%であった。また、Brorinと同様に2つのcysteine-rich domainを有していた。

Brorin-likeの発現をRT-PCR及びin situ hybridizationにより調べた結果、Brorin-likeは胎児期より脳・神経系特異的に発現していた。なお、成体での脳における発現部位にはBrorinと若干の違いが見られた。

Brorin-likeをCOS-7細胞で強制発現させたところ、培養上清中から組換えBrorin-likeが検出された。これにより、Brorin-likeも分泌性因子であることが分かったので、バキュロウイルス発現系により組換えBrorin-likeを作製し、以下の実験に用いた。

作製した組換えBrorin-likeをMC3T3-E1細胞に添加したところ、Brorin-likeはBMPの活性を弱いながらも有意に抑制した。また神経系前駆細胞の初代培養系においてBrorin-likeを添加したところ、ニューロンへの分化が促進された。

第三章 ゼブラフィッシュを用いたBrorin及びBrorin-likeの生理的役割の検討

Brorin及びBrorin-likeはゼブラフィッシュにおいてもオルソログが存在しており、それらもマウスと同様に脳・神経系特異的に発現していた。そこで、ゼブラフィッシュの受精卵にBrorinまたはBrorin-likeを特異的に阻害するモルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入したところ、脳及び眼の形成不全が見られた。これらの結果からBrorin及びBrorin-likeは脳・神経系の形成に関与することが示唆された。

以上より、新規分泌性因子Brorin及びBrorin-likeは、BMPの活性を阻害し、神経系前駆細胞のニューロンへの分化を促進することで脳・神経系の形成に関与することが明らかとなった。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

分泌性因子は細胞間のシグナル伝達に働き、組織の機能・形成に重要な役割を果たす。そのため、医療・医薬品のターゲットになり得る可能性が高い。一般に、分泌性因子はそのN末端に疎水性アミノ酸が多く含まれる分泌性シグナル配列を持つ。申請者は分泌性シグナル配列を指標に、データベースから新規遺伝子の探索を行い、互いに高い相同性を持つ二つの機能未知な新規遺伝子を同定した。さらに、これらをBrorin及びBrorin-likeと命名し、生理的役割について検討を行った。

申請者はマウス胎児よりBrorinを単離・同定した。マウスBrorinは324アミノ酸からなり、ヒトBrorinは約90%の相同性を有していた。また、C末端側にBMPアンタゴニストであるChordin familyに共通のcysteine-rich domainを2つ有していた。

申請者はBrorinの発現をRT-PCRにより検討した、生後56日齢においては脳特異的に発現していることを明らかにした。また、その発現は胎児期から発達が進むにつれて上昇していた。更にin situ hybridizationを行ったところ、Brorinは胎児期においても脳・神経系特異的に発現していることが分かった。8週齢の脳において、特に間脳、中脳、延髄に強く発現しており、その発現は神経細胞特異的であった。

B申請者はBrorinの分泌能を検討するため、BrorinをCOS-7細胞で強制発現させ、培養上清中に組換えBrorinを検出した。この結果から、Brorinは細胞外分泌因子であることが明らかになった。その後、バキュロウイルス発現系を用いて組換えBrorinを得た。

申請者はBrorinはChordin familyに共通のcysteine-rich domainを有することからBMP阻害活性を持つと考え、MC3T3-E1細胞を用いてその活性を検討した。先の組換えBrorinを添加したところ、BMPによるアルカリフォスファターゼ活性の上昇とSmadのリン酸化を抑制した。また、胎生13.5日齢のマウスより得た神経系前駆細胞に組換えBrorinを添加し、その活性を検討した結果、Brorinによって神経系前駆細胞のニューロンへの分化が促進されることが分かった。これまでにBMPは神経系前駆細胞に働きかけ、ニューロンへの運命決定を阻害することが分かっており、BrorinがBMP活性を抑制することでニューロンへの分化を促進したと考えられる。

申請者はさらに、マウス胎児よりBrorin-likeを単離・同定した。Brorin-likeは222アミノ酸からなり、Brorinとの相同性は48.6%であった。また、Brorinと同様に2つのcysteine-rich domainを有していた。

Brorin-likeの発現をRT-PCR及びin situ hybridizationにより調べた結果、Brorin-likeは胎児期より脳・神経系特異的に発現していた。なお、成体での脳における発現部位にはBrorinと若干の違いが見られた。

Brorin-likeをCOS-7細胞で強制発現させたところ、培養上清中から組換えBrorin-1

ikeが検出された。これにより、Brorin-likeも分泌性因子であることが分かったので、バキュロウイルス発現系により組換えBrorin-likeを作製し、以下の実験に用いた。

申請者は組換えBrorin-likeをMC3T3-E1細胞に添加した。Brorin-likeはBMPの活性を弱いながらも有意に抑制した。また神経系前駆細胞の初代培養系においてBrorin-likeを添加したところ、ニューロンへの分化が促進された。

Brorin及びBrorin-likeはゼブラフィッシュにおいてもオルソログが存在しており、それらもマウスと同様に脳・神経系特異的に発現していた。そこで、申請者はゼブラフィッシュの受精卵にBrorinまたはBrorin-likeを特異的に阻害するモルフォリノ修飾アンチセンスオリゴヌクレオチドを導入した。その結果、脳及び眼の形成不全が見られた。これらの結果からBrorin及びBrorin-likeは脳・神経系の形成に関与することが示唆された。

以上、申請者は新規分泌性BMPアンタゴニスト因子として、Brorin及びBrorin-likeを発見した。さらに、申請者はBrorin及びBrorin-likeはBMPの活性を阻害し、神経系前駆細胞のニューロンへの分化を促進することで脳・神経系の形成に関与することを明らかにした。

よって本論文は博士（薬学）の学位論文として価値あるものと認める。

さらに、平成22年2月23日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。

論文内容の要旨及び審査の結果の要旨は、本学学術情報リポジトリに掲載し、公表とする。特許申請、雑誌掲載等の関係により、学位授与後即日公表することに支障がある場合は、以下に公表可能とする日付を記入すること。

要旨公開可能日： 平成22年12月31日以降