京都大学	博士（医学）	氏　名	山田　和美
論文題目	*Taip2* is a novel cell death-related gene expressed in the brain during the development. (脳発生過程に発現する新規遺伝子マウス *Taip2* の機能解析)		

（論文内容の要旨）

TAIP3(TGF-β-up-regulated apoptosis-inducing-protein chromosome 3, GenBank: AB063301)はTGF-β応答性遺伝子としてエンハンサートラップ遺伝子同定法によって単離同定され、その相同遺伝子としてデータベースによって*TAIP2*（AB063300）*TAIP12*（AB063302)が同定された。

1) *TAIP2*のＣ末側半分をプローブとした交差ハイブリダイゼーション法にて*mTaip2*（AB091688）をマウス脳cDNAライブラリーから単離同定した。この遺伝子は2番染色体上にマッピングされ、全ゲノム領域は74kbpにおよび４エクソンに分散し、cDNAは1821bpで、翻訳領域は1758 bp、585アミノ酸(AA)からなる蛋白をコードしていることが明らかになった。データベース検索では核移行シグナル配列(AA 176~184),セリンリッチ(AA 15~52), システインリッチ(AA 212~250)、グルタミン酸リッチ(AA 318~383)の部位があるものの、既知の特徴的機能モチーフは認められなかった。RT-PCR によるm*Taip*2の発現は60日齢において脳、腎臓、卵巣、新生仔においては脳、腎臓で顕著な発現が確認され、さらに新生仔では心臓、腸管で微弱な発現が認められた。
2) mTaip2 (AA391-585)をＣ末抗原としたハムスター抗体とmTaip2(AA41–52)をＮ末抗原としたウサギ抗体を作成した。これらの抗体を使用したウエスタンブロッテイングを行い、mTaip2の全長の分子量が約92 kDaであることを明らかにした。
3)主要臓器でのタンパク発現を確認したところ、胎齢15、18日、新生仔、生後6日目の脳に強く発現していた。そこでマウスの胎仔から成体までの脳における発現を詳細に調べたところmTaip2 は、胎児期から生後6日目まで発現しそれ以後消退することが明らかになった。
4)細胞における機能を知る目的で、NIH3T3、COS7にmTaip2-EGFP融合蛋白を強制発現させた。遺伝子導入後24時間で、核内に局在し細胞の縮小、核及び細胞の断片化を認め細胞死を起こしていることが明らかとなった。
5)核局在を決定する機能部位を調べるために種々のデリーションミュータントを作製し遺伝子導入後24時間で観察した。全長、Ｎ末側(AA1~259)では核内に局在しＣ末側(AA258~585)とEGFPのみでは細胞質に局在した。核移行シグナルを削除しても核移行し、N末側(AA1~149)のみでも核移行を認めた。一方、残りのC末側(AA148~585)でも核に移行したため、核局在を規定するのは核移行シグナルのみではなくN末側(AA1~149)にも核移行をうながす部位が存在することが明らかとなった。
6)PI 染色後のＤＮＡ測定による subG1 法にて細胞死活性を調べた。全長とＮ末側(AA1~259)では明らかに subG1 分画が増大し、細胞死を惹起していた。Ｃ末側(AA148~585)では対象の EGFP のみと同じく、細胞死は認められなかった。これよりＮ末側(AA1~259)が細胞死を起こす機能部位を含むことが明らかになった。
7)m*Taip2* の TGF-β に対する反応性を種々の細胞株を用いて調べたが明らかな反応を認めなかった。発現細胞が限られている可能性があるため今後の課題と考えられる。

以上より *mTaip2*は新しい細胞死関連遺伝子で、N末側半分に核移行と細胞死活性を認め、主に胎生期の脳に発現していることから、脳の発生に関与する可能性が強く示唆された。

（論文審査の結果の要旨）

脳の発生に伴う神経細胞死の分子機構については、未だ不明の点が多い。申請者らは、TGF－β応答性遺伝子を検索する中で、*mTaip2*と名付けた新規マウス遺伝子cDNA(1821 Bp)を単離し、以下のような性質を明らかにした。

1)*mTaip2* は2番染色体上に存在し、4つのエクソンを持ち、核移行シグナル(アミノ酸176～184)を持つ585アミノ酸残基よりなるタンパク質をコードする。
2)特異抗体を用いたimmunoblot法では、胎生期から生後6日目までの脳で、約92kDaのタンパク質が検出される。
3)NIH3T3、COS7、HEK293などの細胞に強制発現させると細胞死が誘導される。
4)N末側領域(アミノ酸1～149)に核移行活性が存在する.
5)N末側の半分(アミノ酸1～259)に細胞死誘導活性が存在する。

これらの結果から、*mTaip2*は主に胎生期の脳に発現する新規細胞死関連遺伝子であることが明らかとなった。

以上の研究は、脳発生に伴う細胞死の分子機構解明に貢献する可能性がある。したがって、本論文は博士(医学)の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成20年4月15日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日：　　年　　月　　日　以降