

京都大学	博士（医 学）	氏 名	熊 田 知 浩
論文題目	Ttyh1, a Ca ²⁺ -binding protein localized to the endoplasmic reticulum, is required for early embryonic development （Ttyh1 は小胞体に局在するカルシウムイオン結合タンパク質で、初期胚の発生に必要である。）		
（論文内容の要旨）			
中枢神経系の発生において重要な役割を担う遺伝子およびその機能を解明する目的で、マウスの胎生中期の脳で神経幹・前駆細胞に強く発現する遺伝子群をオリゴヌクレオチドアレイを用いてスクリーニングしたところ、マウス <i>Tweety homologue 1</i> 遺伝子（ <i>ttyh1</i> ）を新たに同定した。			
<i>ttyh</i> 遺伝子ファミリーに関しては、ショウジョウバエの <i>Tweety</i> について近傍の遺伝子を含む欠失によりハエの生存率が低下することが最初に報告されたが、その一方でヒト <i>ttyh2</i> 遺伝子はいくつかの癌で高発現しヒト疾患に関与することが示唆される等、 <i>ttyh</i> 遺伝子ファミリーの生体における役割は長らく不明であった。			
そこで、まず Ttyh1 タンパク質の性質と細胞内局在を生体外で調べた。マウス脳のコモジネートに対し新たに作成したペプチド抗体でウェスタンブロットを行ったところ、Ttyh1 の分子量は 50kDa であったが、PNGase F を加えると 45kDa に減少したことより、Ttyh1 は糖タンパク質であることがわかった。ヒト Ttyh1 の C 末端には陰性荷電残基が豊富な領域（アスパラギン酸に富む領域）を有していたので、これらを含む部分タンパク質とこれを欠失させた部分タンパク質をそれぞれ精製し、カルシウムイオン結合能アッセイを行ったところ、この陰性荷電領域がカルシウムイオン結合能を持つことが明らかになった。また、マウス脳のコモジネートを遠心分離で細胞内画分に分けてウェスタンブロットを行うと、Ttyh1 は膜画分に存在し、特に滑面小胞体の画分に一致して存在した。以上より、Ttyh1 は C 末端にカルシウムイオン結合部位を持ち滑面小胞体に局在する膜貫通型糖タンパク質であることが明らかになった。			
次に <i>ttyh1</i> のマウス発生における発現様式を in situ hybridization 法および免疫組織染色を用いて調べた。胎生 14.5 日目の胎仔では脳と脊髄以外の組織には殆ど発現せず、大脳では脳室周囲帯で、特に分裂期の細胞で強く発現していた。7.5 日目では Ttyh1 タンパク質を発現する細胞は胚全体に散在し、これらの細胞は核の形態から分裂期にあることがわかった。さらに免疫電顕法を用いた解析で、Ttyh1 タンパク質は分裂期の細胞の滑面小胞体に局在することが明らかになった。			
さらに、 <i>ttyh1</i> の生体での機能を調べるために、遺伝子改変マウスを作成した。 <i>ttyh1</i> ^{+/-} （ヘテロ）マウスは正常で、ヘテロマウス同士の交配からは <i>ttyh1</i> ^{-/-} （ホモ）マウスは出生せず、ホモマウスは胎生致死であることがわかった。ヘテロマウスの交配によって得られる胎仔に対し、nested PCRを用いた タイピングを行ったところ、胎生 6.5 日以降にはホモ胎仔は認められず、6.5 日までに致死であることがわかった。致死の時期を調べるため、胎生 3.5 日目の初期胚を解析するとホモ胚はメンデルの遺伝則にほぼ合致して存在した。そこで、この 3.5 日目の初期胚を生体外で 1 日培養したところ、ホモの胚は野生型やヘテロ			

型の胚に比べて小さく少数の細胞から成り、発生が止まっていた。さらに 3.5 日目のホモ胚を詳細に観察すると、胚には多くの小さな不規則な核を認めた。以上より、<i>ttyh1</i> 遺伝子が欠失すると発生初期で細胞分裂が正常に行われず、胚盤胞を形成する前に変性してしまうことが明らかになった。 これらの結果より、Ttyh1 は発生初期の胚を含めて細胞分裂の際に不可欠な役割を担っていることが明らかになった。その機序は、Ttyh1 が分裂期の細胞の滑面小胞体に局在しカルシウムイオン結合部位を持つ膜タンパク質であることから、おそらく Ttyh1 は細胞分裂に必須とされるカルシウムイオンの挙動を滑面小胞体にて調節しているものと推測している。 (論文審査の結果の要旨) 中枢神経系の発生において重要な役割を担う遺伝子とその機能を解明する目的で、マウスの胎生中期の脳で神経幹・前駆細胞に強く発現する遺伝子群をオリゴヌクレオチドアレイを用いてスクリーニングしたところ、マウス <i>Tweety homologue 1</i> 遺伝子 (<i>ttyh1</i>) を新たに同定した。 <i>ttyh1</i> の生体での機能を調べるために、遺伝子改変マウスを作成した。<i>ttyh1</i>^{+/-} (ヘテロ) マウスは正常で、ヘテロマウス同士の交配からは <i>ttyh1</i>^{-/-} (ホモ) マウスは出生せず、ホモマウスは胎生致死であることがわかった。初期胚の解析によりホモ胚は胎生 3.5 日目で胚盤胞を形成せずに変性することがわかった。Ttyh1 の性質と細胞内局在を生体外で調べた。Ttyh1 は C末端にカルシウムイオン結合部位を持ち滑面小胞体に局在する膜貫通型糖タンパク質であることがわかった。Ttyh1 の生体での発現部位を調べたところ、胎生期には分裂期の細胞の滑面小胞体に発現することがわかった。 これらの結果より、Ttyh1 は発生初期の胚を含めて細胞分裂の際に不可欠な役割を担っていることが明らかになった。その機序は、細胞分裂に必須とされるカルシウムイオンの挙動を滑面小胞体にて調節しているものと推測した。 以上の研究は Ttyh1 が発生初期の胚を含めて細胞分裂の際に不可欠な役割を担っていることを示したものであり、今後の医学研究や治療開発に貢献する研究である。 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 23 年 2 月 7 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			