

京都大学	博士（ 薬科学 ）	氏名	佐藤 美穂
論文題目	核-細胞質間輸送因子Transportin1の発現解析と遺伝子欠損マウスの作出		
（論文内容の要旨） 真核生物において遺伝情報がRNAへと転写される場合は核であり、その情報が蛋白質へと翻訳されるのは細胞質である。従って、遺伝子発現の制御に関する蛋白質が作用するには、細胞質から核への移動が必要である。近年、核-細胞質間の蛋白質輸送を担う物質が続々と発見されている。その中で、importinβファミリーは最大のものであり、このグループに属する蛋白質は、それぞれに特異的な標的蛋白質をもつことが知られている。Transportin1(Tnpo1) はそのひとつであり、mRNA結合蛋白質 hnRNP A1 を核内移行させる因子として始めて単離された。その後、リボソーム蛋白質 rpL23a、TAP、JKTBP、HuR、hnRNP D、c-Fosなど多くの重要な蛋白質の核内輸送因子であることが明らかにされ、最近ではX船構造解析による分子構造レベルでの解明も進んでいる。 このように、本蛋白質の構造と細胞内機構の解析は進んでいるものの、この物質の実際の生体レベルでの機能解析はほとんど解明されていない。本研究は、Tnpo1 の生体内における発現検索を行い、さらにTnpo1 遺伝子欠損マウスを作出し、マウス in vivoでの Tnpo1の機能を明らかにしたものである。 第1章 Tnpo1 の発現組織、細胞の検索 ノザンブロットティングを用いてTnpo1 のmRNA発現を調べたところ、骨格筋を除くすべての組織における発現を認めた。具体的には、肝臓、心臓、精巣、腎臓、肺、脾臓と脳において発現していることがわかった。また、in situ ハイブリダイゼーションを用いて成獣脳における発現を詳細に探索した結果、Tnpo1 の発現は脳内の特定の領域に局在して発現していた。このことは、脳の特定機能と結びついている可能性を示唆している。まず、神経幹細胞のある側脳室脳室下帯と海馬顆粒細胞層下部に強く発現していた。これらの領域は神経発生が成獣になっても起こっている場所として注目される。次に、脳脊髄液産生に関与する脈絡叢や脳脊髄液の液性情報処理を行う脳室周囲器官（脳弓下器官、交連下器官、OVLТ (organum vasculosum lamina terminalis)) にも強く発現していたことも重要な特徴である。通常の脳内では、皮質や神経核にも、嗅球から脊髄まで広く発現しているが、とりわけ概日リズムの中核である視交叉上核にも多く発現しているのが注目される。この中核では、多くの遺伝子が概日振動しているので、視交叉上核においてTnpo1 の発現量を経時的に調べたところ、暗期の初めに最高			

値、明期の初めに最低値をもつ概日振動を示した。これは、Tnpo1遺伝子発現が概日リズムの生成機構と何らかの関係があることを示唆する。

第2章 *Tnpo1* 遺伝子欠損マウスの作出と表現型解析

次に、Tnpo1の生体内での機能を調べるため、ES細胞での相同組換えによってTnpo1遺伝子欠損マウスの作製を行った。*Tnpo1* のヘテロマウスを作製し、ヘテロ交配によってホモ欠損マウスの作製を試みたが、出生後の遺伝子型確認ではホモ欠損マウスの存在を確認できなかった。そこで、ヘテロ交配の母獣を開腹して調べたところ、ホモ欠損マウスは受精後6.5日目までは正常な形態をとり、7.5日目には野生型と比べてやや形態異常を示し、8.5日目には胚自身の形態は完全に変性していた。また、形態異常を示す直前の7.0日目においてアポトーシス検出反応を行ったところ、胚自身へと分化する領域特異的にアポトーシスが検出された。すなわち、*Tnpo1* 遺伝子欠損マウスは受精後7.0日目に細胞死を起こし、受精後8.5日目までに死亡することがわかった。このことより、Tnpo1は原腸陥入に必須の因子であることが明らかとなった。

本研究はTnpo1の生体内での役割の研究を、ノザンブロットティング、in situ を用いて詳細に行うのみならず、Tnpo1遺伝子欠損マウスの作製を行い、その生体内における機能を明らかにしようとした。その結果、本研究では、特定の脳機能に関与する細胞に多く発現し、個体発生では原腸陥入時に必須の因子であることが解明された。

(続紙 2)

(論文審査の結果の要旨)

真核生物においては、核の内外は核膜で明瞭に隔てられており、その相互間の物質交換は、厳密に制御されている。近年、核-細胞質間の蛋白質輸送を担う物質が続々と発見されており、Transportin1(Tnpol) は importin β ファミリーの代表的な核-細胞間移送因子であり、多くの核内で働く転写因子を輸送している。しかるに、蛋白質の構造解析と細胞内の核-細胞質輸送機構の解析は進んでいるものの、この物質の実際の生体レベルでの機能解析はほとんど解明されていない。本研究は、ノザンブロッティングやin situ ハイブリダイゼーションによって生体における遺伝子発現を始めて明らかにしたのみならず、Tnpol 遺伝子欠損マウスを作成し、Tnpolが個体発生の必須の因子であることを明らかにした。

Tnpolは、ほとんどの臓器に発現している、きわめて普遍的な物質であることが明らかとなった。それにもかかわらず脳では、脳脊髄液の産生、液性情報の調節・伝達、神経発生、生体リズムなど、特定の機能と関係ある場所に強く分布する、というきわめて特徴のある発現様式をすることが始めて解明された。この結果は、複雑な機能を行っている脳内の機能遺伝子の遺伝子発現を制御する転写因子などの核内輸送に、Tnpolが深くかかわっていることを示している。なかでも、転写による新しい形質発現が起こる神経発生や、転写によるフィードバックループがリズム産生の基盤である視交叉上核において強い発現が見られたのが注目され、これら機能への分子レベルでの解明に関する研究の進展が期待される。

Tnpolという蛋白質と細胞内機能は判っているが、全く生体内での機能が判っていない生体内の機能を解明するため、本研究は遺伝子欠損マウスの作製という最も正統的な方法にて研究を行った。その結果、Tnpol のホモ欠損マウスは、胎生致死であり、詳細な時間的検討の結果、原腸陥入の時期に一致して、アポトーシスが起り細胞死となることがわかった。すなわち、本研究で始めて、Tnpolが初期発生に必須の因子であることが明らかになったのである。

本研究は、重要な核-細胞質間輸送因子であるTnpolの生体内での発現をはじめて解明したとともに、その機能をTnpolノックアウトマウス作成により明らかにした初めての論文である。

よって本論文は博士(薬科学)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 3月10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 年 月 日以降