

氏 名	やま もと しげ のり 山 本 薫 紀
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	薬 博 第 467 号
学位授与の日付	平成 13 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 科 学 専 攻
学位論文題目	FGF-14 の構造と発現の多様性に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 伊 藤 信 行 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 佐 藤 公 道

論 文 内 容 の 要 旨

FGF (Fibroblast Growth Factor) は当初、線維芽細胞の増殖を促進する因子として同定された。その後の研究により FGF は線維芽細胞を初めとする様々な細胞に増殖活性を示すペプチド性増殖因子であることが明らかとなり、その主な生理作用として神経栄養作用、血管新生作用、創傷治癒作用などが知られている。FGF は現在までに少なくとも23種類ものメンバーが確認されており、これら多数のリガンドと受容体が複雑に相互作用することでこれらの作用を発現すると考えられている。

申請者は FGF ファミリーに属する未知の因子を同定することは、FGF の生体内における役割を研究する上で必要不可欠なことであると考え、その探索を後述する方法で行った。その結果、申請者は2種類の新規 FGF-14 アイソフォーム (FGF-14B, FGF-14C) を単離することに成功した。そしてこれらのアイソフォームが脳と精巣という全く異なる臓器にそれぞれ特異的に発現している因子であることを明らかにした。以下、これらの新たな知見について二章にわたって論述する。

第一章 新規 FGF-14 アイソフォーム (FGF-14B) に関する研究

Database に登録されていた未知の FGF と思われる cDNA の部分配列情報を元に FGF ファミリー間で最も相同性の高い領域を二カ所選択し、この領域を標的とした Homology-based PCR 法を行った。

その結果、ラット胎児期19日目の cDNA より新規 FGF を単離した。この FGF は当時既に報告のあった FGF-14 (FHF-4; FGF homologous factor-4) に最も類似しており、またそのアミノ酸配列の特徴から FGF-14 のアイソフォーム体であると考えられた。そこで申請者はこの FGF を FGF-14B と名付けた。FGF-14B が生体内でどの組織に発現しているかを RT-PCR 法や in situ hybridization 法, northern blot analysis を用いて検討したところ、成体期において脳にのみ発現が見られた。胎児期においても同様に脳神経系に発現が見られたことから、FGF-14B は神経組織の形成や維持に深く関わっている可能性が示唆された。

さらに FGF-14B は Von Heijne 法に基づく計算によるとその N 末端に典型的なシグナル配列を持たず非分泌型の蛋白であることが予想された。実際、昆虫細胞や動物細胞においてこれらの蛋白を強制発現させたところ、ほぼ細胞内に留まるという結果が得られた。しかし昆虫細胞においては、一定の条件下において細胞外に分泌されるという結果も得られており、生体内においても FGF-14B がある特殊な条件下で細胞外に何らかの輸送機構によって分泌され、細胞間シグナル分子として作用する可能性も否定できない。また FGF-14B は既知の FGFR (FGF 受容体) 以外の未知の受容体と相互作用する可能性も示唆されていることから、すでに脳に発現していることが知られている既知の FGF とは異なる作用機序で機能するユニークな因子であることが期待される。

第二章 新規 FGF-14 アイソフォーム (FGF-14C) に関する研究

申請者は第一章において FGF-14B の発現組織を同定する過程で、精巣においても別の新規 FGF-14 アイソフォームが

存在する可能性を示唆する結果を得た。もし実際に FGF-14B 以外の FGF-14 アイソフォームが精巣に存在するのであれば、その存在を明らかにし発現を確認することは FGF-14 を研究する上で有用であると考えた。そこで FGF-14B の配列情報を元に精巣 cDNA から 5'RACE 法により新規 FGF-14 アイソフォームの単離を試みたところ、FGF-14B とは異なる新たなアイソフォーム (FGF-14C) を単離した。そして in situ hybridization 法により FGF-14C は精巣内において精細管壁の造精細胞系列にのみ発現していることが確認された。また FGF-14C の発現は精細管の全てにおいて発現しているわけではなく、一部の精細管にのみ発現していた。このことから FGF-14C は精細管においてある特定の段階にある造精細胞にのみ発現し、何らかの作用を及ぼしていると考えられる。

以上の結果より、FGF-14 はその構造を多様に変化させ、それぞれが脳と精巣において様々な生理的役割を果たしていると考えられる。

以上、本研究は 2 種類の新規 FGF-14 アイソフォームを同定しその発現特異性を検討した結果、FGF-14B が脳に FGF-14C が精巣にそれぞれ特異的に発現する因子であることを明らかにしたもので、これらの組織での研究における重要な知見を得たものである。

論文審査の結果の要旨

FGF は当初、線維芽細胞の増殖を促進する因子として同定された。その主な生理作用としては神経栄養作用、血管新生作用、創傷治癒作用などが知られている。FGF は現在までに少なくとも 23 種類ものメンバーが確認されている。

申請者は FGF ファミリーに属する未知の因子を同定することは、FGF の生体内における役割を研究する上で必要不可欠なことであると考え、その探索を後述する方法で行った。その結果、申請者は 2 種類の新規 FGF-14 アイソフォーム (FGF-14B, FGF-14C) を単離することに成功した。そしてこれらのアイソフォームが脳と精巣という全く異なる臓器にそれぞれ特異的に発現している因子であることを明らかにした。

Database に登録されていた未知の FGF と思われる cDNA の部分配列情報を元に FGF ファミリー間で最も相同性の高い領域を二カ所選択し、この領域を標的とした Homology-based PCR 法を行った。その結果、ラット胎児期 19 日目の cDNA より新規 FGF を単離した。この FGF は当時既に報告のあった FGF-14 に最も類似しており、またそのアミノ酸配列の特徴から FGF-14 のアイソフォーム体であると考えられた。そこで申請者はこの FGF を FGF-14B と名付けた。FGF-14B が生体内でどの組織に発現しているかを検討したところ、成体期において脳にのみ発現が見られた。胎児期においても同様に脳神経系に発現が見られたことから、FGF-14B は神経組織の形成や維持に深く関わっている可能性が示唆された。

さらに FGF-14B はその N 末端に典型的なシグナル配列を持たず非分泌型の蛋白であることが予想された。実際、昆虫細胞や動物細胞においてこれらの蛋白を強制発現させたところ、ほぼ細胞内に留まるという結果が得られた。しかし昆虫細胞においては、一定の条件下において細胞外に分泌されるという結果も得られており、生体内においても FGF-14B がある特殊な条件下で細胞外に何らかの輸送機構によって分泌され、細胞間シグナル分子として作用する可能性も否定できない。また FGF-14B は既知の FGF 受容体以外の未知の受容体と相互作用する可能性も示唆されていることから、すでに脳に発現していることが知られている既知の FGF とは異なる作用機序で機能するユニークな因子であることが期待される。

申請者は FGF-14B の発現組織を同定する過程で、精巣においても別の新規 FGF-14 アイソフォームが存在する可能性を示唆する結果を得た。そこで FGF-14B の配列情報を元に精巣 cDNA から FGF-14B とは異なる新たなアイソフォーム (FGF-14C) を単離した。そして FGF-14C は精巣内において精細管壁の造精細胞系列にのみ発現していることが確認された。また FGF-14C は一部の精細管にのみ発現していた。このことから FGF-14C は精細管においてある特定の段階にある造精細胞にのみ発現し、何らかの作用を及ぼしていると考えられる。

以上、本研究は 2 種類の新規 FGF-14 アイソフォームを同定しその発現特異性を検討した結果、FGF-14B が脳に FGF-14C が精巣にそれぞれ特異的に発現する因子であることを明らかにしたもので、これらの組織での FGF の機能解明に重要な知見を示したものである。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値あるものと認める。

更に、平成 13 年 2 月 13 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。