

氏 名	わきもと こうじ 脇 本 公 嗣
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学 位 記 番 号	論 薬 博 第 660 号
学位授与の日付	平 成 13 年 11 月 26 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 2 項 該 当
学位論文題目	Na ⁺ /Ca ²⁺ 交換体遺伝子欠損マウスの作製とその機能に関する研究

論文調査委員 (主 査) 教 授 川 寄 敏 祐 教 授 市 川 厚 教 授 佐 藤 公 道

論 文 内 容 の 要 旨

細胞機能の調節に重要な働きを担っている Ca²⁺ は、様々なチャンネル、ポンプ、トランスポーターによりその細胞内濃度が厳密に制御されている。Na⁺/Ca²⁺ 交換体 (NCX1) は細胞形質膜に存在し、細胞内外の Na⁺ 濃度勾配を利用して、通常、細胞内の Ca²⁺ を細胞外へ汲み出し細胞外の Na⁺ を細胞内へ流入させる役割を果たしている (forward mode)。しかし、この交換活性は細胞内外の Na⁺ と Ca²⁺ の電気化学ポテンシャルのバランスによって決定されるため、条件によっては細胞外カルシウムが流入する方向にも作用する (reverse mode)。NCX1 は心臓に最も豊富に存在し、心筋細胞におけるカルシウムホメオスタシスに重要な役割を果たしていると考えられているが、生体内における機能は不明な点が多い。本研究では、NCX1 欠損マウスを作製し、その生体内での役割の解明を試みた。

第一章 マウス Na⁺/Ca²⁺ 交換体の遺伝子構造と組織分布

マウス NCX1cDNA 配列をもとに、RT-PCR 法により得たマウス cDNA 断片をプローブとしてマウスゲノムライブラリーをスクリーニングし、マウス NCX1 遺伝子断片を得た。これらの遺伝子を解析することにより、タンパク質の 2/3 を占める大きなエクソンが 1 個存在すること、また、多様な選択的スプライシングアイソフォームを生じさせる小さな 6 個のエクソン (A, B, C, D, E, F) がヒトやウサギと同様に存在することを明らかにした。また、マウスには少なくとも 15 種類の NCX1 の選択的スプライシングアイソフォームが存在することを示し、各アイソフォームの組織分布を明らかにした。その過程でエクソン A, C, D, F を含む新規なスプライシングアイソフォームを発見し、脳と精巣に存在すること示した。

第二章 Na⁺/Ca²⁺ 交換体遺伝子欠損マウスの解析

クローニングしたマウスゲノムを用いて遺伝子欠損マウス作製用の targeting vector を構築し、相同組み換え ES 細胞、キメラマウスの作製を経て、NCX1 のヘテロマウスを得ることに成功した。ヘテロマウス同士の交配によりホモマウスの作製を試みたが、生まれてきた産仔にホモマウスは認められず、胎生 9.5 日齢で致死であることを明らかにした。胎生 9.5 日齢のホモマウスは野生型マウスに比べ体が小さく、心臓は拍動していなかった。また、卵黄囊上には明瞭な血管が認められなかった。組織学的解析により心筋細胞の減少が認められ、TUNEL 染色によりアポトーシスが生じていることを明らかにした。さらに、神経系においても心臓以上に多数の TUNEL 陽性細胞が存在することを見出した。NCX1 mRNA は胎生 9.5 日には心臓に限局して発現していることから、神経系におけるアポトーシスは心臓の拍動不全による虚血によるものと考えられた。卵黄囊上について血管内皮細胞と特異的に反応する抗 PECAM 抗体を用いて調べたところ、太い血管 (vessel) は存在しないものの、蜂の巣状の細い血管 (capillary) は存在するが示された。また、ホモマウスの造血能を調べたところ、血島が認められたことから、造血は正常に行われていることが示された。これらの結果は、ホモマウスでは心拍の欠如により血液細胞が造血領域から移動できないために、胎生致死が生じることを示している。ホモマウスの心臓における NCX1 の活性を測定したところ、forward mode, reverse mode とともに完全に消失しており、心臓における Na⁺ 依存性の Ca²⁺ 交換活性は NCX1 のみが担っていることが明らかとなった。一方、ヘテロマウスの心臓、血管平滑筋および腎臓においては NCX1 タンパク質量が約半分に減少していた。また胸部大動脈の血管平滑筋における細胞内 Na⁺ 依存性 Ca²⁺

取り込み活性を調べたところ、ヘテロマウスでは約半分に低下しており、タンパク質量の低下をよく反映していた。胸部大動脈リング標本を作製し、 Na^+ 依存性の血管弛緩および収縮反応を調べたところ、ヘテロマウスの血管では野生型マウスに比べ、反応性がそれぞれ低下していることを見出した。ヘテロマウスの血管平滑筋においては NCX1 のタンパク質量低下による機能低下が認められ、本マウスが NCX1 の生理学的、病理学的役割を解明する上で重要な動物モデルとなることを明らかにした。

第三章 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体遺伝子のマウス胎児における発現解析

NCX1 mRNA のマウス胎児における発現を調べたところ、胎生7日齢から発現しており胎生15~17日に最も高い発現を示すことを明らかにした。各マウス胎生期における NCX1 の局在は胎生10.5日までは心臓に局限して発現しているものの、それ以後胎生14.5日齢や16.5日齢では心臓に加えて、大脳皮質や脊髄にも発現していることを発見した。一方、生後10週齢のマウスの脳では、海馬にのみ局限して強く発現することを明らかにした。また、各胎生期において発現している NCX1 のスプライシングアイソフォームを同定し、胎生期においては少なくとも8種類のアイソフォームが存在することが、NCX1 遺伝子がマウス胎生期の発生過程で重要な役割を担っていることが示唆された。

以上、本研究はマウス NCX1 の遺伝子構造を明らかにし、その欠損マウスを作製、解析することにより、NCX1 が正常な心臓の発生および拍動の開始に必須であることを明らかにした。さらに NCX1 欠損ヘテロマウスの解析により、生体内における NCX1 の生理的役割に関する重要な知見を得たものである。

論文審査の結果の要旨

細胞内の Ca^{2+} 濃度は、様々なチャンネル、ポンプ、トランスポーターにより、厳密に制御されている。 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換体 (NCX) は細胞膜上に存在し、細胞内外の Na^+ 濃度勾配を利用して、細胞内の Ca^{2+} を細胞外へ汲み出す働きをもつ。現在までに3種類のサブタイプ (NCX1, NCX2, NCX3) が知られている。NCX1 は心臓に最も豊富に存在しており、心筋細胞におけるカルシウムホメオスタシスに重要な役割を担っていると考えられているが、生体内における役割は不明な点が多い。本研究は、NCX1 遺伝子欠損マウスを作成し、個体レベルで NCX1 の役割を解明したものである。

まず、マウスの NCX1 遺伝子を解析し、本遺伝子が1個の長いエクソンと6個の短いエクソンから成ることを示した。さらに、15種類のスプライシングアイソフォームが存在することを示し、それぞれの組織分布を明らかにした。

ついで、相同組み換え ES 細胞を作製し、常法に従い NCX1 遺伝子欠損マウスの作製を試みたところ、ホモマウスは胎生9.5日齢で致死を示した。胎生9.5日齢のホモマウスは野生型に比べ身体が小さく、心臓の拍動が停止していた。このとき、造血能には変化が見られず、血管形成も観察された。これらの結果は、ホモマウスでは心臓の拍動が停止することにより血球芽細胞の造血領域からの移動が妨げられるために、組織への酸素供給が途絶え、胎生致死が生じたことを示している。なお、ホモマウスの心臓においては $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換活性は完全に消失しており、心臓における $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換活性は NCX1 のみが担っていることが明らかとなった。

一方、ヘテロマウスの血管平滑筋においては NCX1 のタンパク質量の低下を反映した機能低下が示され、本マウスが NCX1 の生理的役割を解明する上で重要な動物モデルとなることが示された。

さらに、発生段階における NCX1 mRNA の発現をノーザンブロット、*in situ* ハイブリダイゼーションにより調べたところ、発現は胎生7日齢から始まり、15~17日で最高値を示すこと、胎生10.5日齢までは心臓に局限しているのに対し、14.5日齢や16.5日齢では大脳皮質や脊髄にも発現しており、さらに、生後10週齢のマウスでは海馬にのみに局限して強く発現することを見いだしている。

以上、本研究はマウス NCX1 遺伝子のクローニングに成功し、その主要な塩基配列を明らかにするとともに、遺伝子欠損マウスを作製し解析することにより、NCX1 が心臓の発生および拍動の開始に必須であることを明らかにしたものである。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10月29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。