

論文審査の結果の要旨

論文提出者氏名 高橋 慎博

近年、種々の組織で発現している全長 cDNA が網羅的にクローニングされているが、機能が未知の遺伝子がデータベース上に数多く存在する。プロテオーム解析法と機能解析を組み合わせると、データベース上に存在する機能が未知の cDNA の機能を明らかにすることができる。本研究は、運動に伴い骨格筋内で変動する新規タンパク質を見い出し、その機能を明らかにすることを目的とし、マウス水泳運動モデルを用いて、腓腹筋由来のタンパク質をプロテオーム解析法により解析した。

プロテオーム解析の結果、2次元電気泳動ゲル上で、水泳運動（150分間）後に顕著な量的減少がみられたスポットの1つを質量分析法で解析したところ、expressed sequence AI854635タンパク質と同定された。さらに、mRNAレベルでの変動を半定量的RT-PCRによって調べた結果、水泳運動（150分間）後にAI854635 mRNAが23%減少することが確認された。

AI854635は推定アミノ酸配列から、497アミノ酸から成る分子量56 kDaのC2H2型 zinc finger 転写因子と考えられた。しかし、その細胞内機能は明らかでなかった。そこで、AI854635の細胞内機能を推定するために、AI854635の推定アミノ酸配列をNCBIドメイン検索プログラムに供したところ、AI854635は12個のC2H2型 zinc finger ドメインのほかに、LIMドメイン、SIP 1 (Smad-interacting protein 1) ホメオボックス、リプレッサー型転写因子 SALM ドメイン等が高度に保存されていた。これらを有する既知タンパク質に共通する細胞内機能として、発生と分化への関与が示唆された。

そこで、次にマウス筋原細胞 C2C12 を用い、*in vitro* で AI854635 と細胞分化との関連について、C2C12 の細胞分化を誘導し、時間を追って位相差顕微鏡で観察しつつ、細胞内 mRNA 変動を半定量的 RT-PCR によって解析した。分化誘導 20 時間後から C2C12 は筋管を形成し始め、筋原細胞分化の指標となる myogenin mRNA もそれに伴い顕著に増加した。AI854635 mRNA は myogenin mRNA 発現に先立ち、分化誘導 6 時間後から徐々に増加した。この結果、AI854635 は筋原細胞分化に密接に関与していることが示唆された。AI854635 の推定アミノ酸配列全長としては

既知タンパク質と相同性がないことから、AI854635 は筋原細胞分化に関与する新しい転写因子であると考えられた。

マウス成体を用いて各臓器における AI854635 mRNA の発現量を半定量的 RT-PCR で調べたところ、骨格筋（腓腹筋およびヒラメ筋）、全脳、胸腺、腎臓などユビキタスに発現していた。

運動に伴い激しい負荷が与えられた骨格筋は筋分化が誘導されると報告されている。本研究ではマウス水泳運動モデルを用いたが、齧歯類の水泳運動モデルによって筋内で筋分化の指標となる myogenin mRNA が誘導されたという報告は PubMed による検索で見い出されなかった。そこで、本研究ではさらに水泳運動と筋分化制御因子の mRNA 変動を調べた。その結果、水泳運動に伴い、筋分化の指標となる myogenin mRNA が顕著に増加することを確認した。しかしながら、筋原細胞分化に関与することが示唆された AI854635 は水泳運動実験では逆に減少した。この理由は不明であるため、タンパク質の翻訳後修飾を含めて今後の解析が必要である。しかし、運動に伴い骨格筋内で変動する新規タンパク質を見出し、それが、筋分化に密接に関与することを始めて明らかにした本研究は新規性があり、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいものと認定する。