

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 18 年度博士課程進学
氏 名 大野 陽子
指導教員名 秋山 徹

論文題目 RNA 結合タンパク質 D8 の個体レベルでの機能解析

序論

生体において遺伝子発現は様々な機構により調節されている。これまでに解明されてきた遺伝子発現の機構は転写制御に関するものが中心であったが、近年の精力的な研究により転写後調節に大きな注目が集まっている。例えばスプライシングの制御、mRNA 安定性の制御、mRNA からタンパク質への翻訳制御などがあげられる。また、20 塩基前後の small RNA (miRNA) が標的遺伝子の発現を負に制御し、細胞増殖や分化の調節を担っていることが明らかになりつつある。

転写後調節がその発現制御に重要な役割を果たしている因子として、サイトカインがあげられる。サイトカインは免疫応答において細胞から分泌されるタンパク質で、細胞間の情報伝達を担っている。サイトカインは免疫応答に必須の因子であるが、不適切な場所や時間での産生は、組織障害をもたらす様々な疾患を引き起こす。例えば、炎症性サイトカインである TNF α は生体防御機構において重要な働きをしているが、その持続的かつ過剰な産生は、関節リウマチや炎症性大腸炎の原因となることが知られている。これらのことから、生体は、免疫系を効率的に活性化するだけでなく、逆に抑制するシ

システムも備えており、炎症反応が過剰にならないように巧妙に調節していると考えられている。

サイトカインの mRNA の 3'-UTR には、シグナル特異的な mRNA の分解に関与する RNA 配列が多く存在することが明らかになっており、その中でも最もよく研究が進められている RNA 分解制御配列が AU-rich element (ARE) である。ARE に結合しサイトカインの発現制御を行う RNA 結合タンパク質が、これまでに複数報告されている。例えば、mRNA の分解を促進するものとして TTP や AUF1 が、翻訳の制御を行うものとして HuR や TIA-1 などが知られている。これらの RNA 結合タンパク質については、ARE に協同的にもしくは競合的に結合することなどが示唆されているが、標的遺伝子の発現制御機構については未だ不明な点が多い。

D8 は当研究室において、p53 と TGF- β によって発現誘導される遺伝子として単離された。D8 は 569 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端に RNA 結合ドメインである KH ドメインを 2 つ持ち、C 末端にタンパク質のユビキチン化に関わる RING フィンガードドメインを持つ。これまでに、D8 がアポトーシス誘導因子 Bim の mRNA に結合し、安定化させることによってアポトーシスを誘導することが明らかになっている。

D8 はこのように、RNA との結合を通じて遺伝子発現の制御を行う RNA 結合タンパク質である。また D8 は線虫およびショウジョウバエにホモログが存在し進化的に保存されていること、さらに D8 と相同性が高い D8 関連タンパク質がヒト、マウスでは 3 種類存在しファミリーを構成していることから、これらの RNA 結合タンパク質と RNA との相互作用は、遺伝子発現の制御において普遍的に重要なメカニズムである可能性がある。

本研究では D8 の生理的機能をさらに明らかにするために、D8 ノックアウトマウスの作製および解析を行った。

第一章 「D8 ノックアウトマウスの作製」

D8 ゲノムを含む BAC クローンを用い、D8 のタンパク質コード領域をネオマイシン耐性遺伝子と置換することによりターゲティングベクターを構築した。ベクターを BALBc/A ES 細胞にエレクトロポレーション法により遺伝子導入し、相同組換え体を単離、同定した。得られたポジティブクローンを用いてインジェクション法によりキメラマウスを作製した。

D8 ノックアウトマウスはメンデルの法則に従って生まれ、野生型マウスに比べてやや体の大きさが小さい傾向があるものの、通常通り成育し繁殖能力もあることがわかった。そのため D8 は発生段階及び生存においては必須ではないと考えられた。

第二章 「D8 の発現組織の解析」

マウスの各組織での D8 の発現量を RT-PCR 及び Western blotting により検討した。その結果、D8 はユビキタスに発現しているが、脳や精巣及び胸腺や脾臓などの免疫系の組織で特に高い発現が見られた。

第三章 「D8 の細菌感染における機能」

D8 が免疫系の組織で高い発現を示すこと、またこれまでにサイトカインの発現調節を行う RNA 結合タンパク質が複数報告されていることから、D8 も免疫系においてサイトカインの発現調節を担っていることが考えられた。そこで、LPS (リポ多糖) を用い、細菌感染時のサイトカイン量の調節において D8 が果たしている役割について検討を行った。

LPS とはグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分であり、脂質及び多糖から構成される。LPS は内毒素、エンドトキシンとも呼ばれ、この LPS が宿主細胞の細胞膜表面に存在する TLR4 によって認識されることによって、細菌感染における免疫応答が開始される。LPS は炎症性サイトカインの分泌を促進し、サイトカインの産生は細菌を除去するための生体防御反応として行われるが、過剰になった場合には全身での炎症応答がおこりショック状態 (敗血症) に陥ることが知られている。

D8 ノックアウトマウスの腹腔に LPS (10mg/kg weight) を投与したところ、運動量の低下や結膜炎、立毛、下痢などの症状を示し、3 日以内に半数以上が死亡した。一方野生型マウスは、症状は示すものの程度は緩やかであり、その後症状の回復が見られ多くは生存した。このことから D8 が細菌感染において重要な役割を担っていることが考えられた。

D8 が免疫系細胞の分化を制御している可能性を考え、D8 ノックアウトマウスと野生型マウスにおける各免疫系細胞の割合を FACS により解析した。その結果、胸腺や脾臓における T 細胞、B 細胞、マクロファージの割合に異常は見られなかった。

敗血症は過剰な炎症性サイトカインの分泌によって起こることが知られている。そこで、D8 ノックアウトマウスにおける炎症性サイトカインの発現量を検討した。腹腔内マクロファージを初代培養し、LPS 添加後の炎症性サイトカイン量を ELISA により検出した。その結果、D8 ノックアウトマウスは野生型マウスと比較し、炎症性サイトカイン量が増大していることが明らかになった。

また、LPS 刺激後の D8 発現量を RT-PCR により検討したところ、発現量の低下が認められた。この点においても、D8 が LPS シグナルにおいて何らかの機能を担っていることが示唆された。

総括

D8 ノックアウトマウスの解析から、D8 が細菌感染後の免疫応答において重要な働きを担っていることが明らかとなった。また、D8 がサイトカインの発現制御を行っていることを示し、D8 の新たな機能を見出した。これまでに、RNA 結合タンパク質である AUF1 や TIA-1 のノックアウトマウスが D8 ノックアウトマウスと似た表現型を示すことが報告されており、D8 もサイトカインの発現制御を行う重要な因子であると考えられる。また、当研究室における解析により D8 と miRNA との関連が示唆されており、転写後調節について新たな知見が得られる可能性がある。今後、D8 ノックアウトマウスをさらに詳細に解析することにより、サイトカインの発現制御機構を分子レベルで解明することが可能になると期待される。