

## 論文審査の結果の要旨

申請者氏名 大野 陽子

---

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制御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。

D8 は当研究室において、p53 と TGF- $\beta$  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。本論文は、D8 ノックアウトマウスの作製および解析から、D8 の生理的機能をさらに明らかにすることを試みたものである。

まず、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 BALB/c/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。

次にマウスの各組織での D8 の発現量を検討したところ、D8 はユビキタスに発現しているが、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。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 はグラム陰性菌細胞壁外膜の構成成分で、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 は細菌を除去するための生体防御反応として炎症性サイトカインの分泌を促進するが、過剰な促進がおこ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 を致死未満量投与したところ、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 が細菌感染後の免疫応答において重要な役割を担っていることが考えられた。

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の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測定した。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、TNF $\alpha$  の産生量が増大していることが明らかになった。IL1 $\beta$  や IL6 の産生量には差が見られなかったことから、D8 が TNF $\alpha$  特異的に産生量の調節を行っている可能性が考えられた。さらに TNF $\alpha$  の mRNA 量及び mRNA の安定性を比較したところ、野生型マウスと D8 ノックアウトマウスで差が見られなかったことから、D8 が TNF $\alpha$  の翻訳を調節している可能性が考えられた。

また、LPS 刺激後の D8 発現量を検討したところ、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。

以上、本論文は D8 が細菌感染に対する生体防御機構において重要な役割を果たしていることを個体レベルで明らかにしたもので、学術上、応用上貢献することが少なくない。なお、本論文は岡部勝、安居輝人、菊谷仁、秋山徹との共同研究であるが、いずれも論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。よって審査委員一同は、本論分が博士（農学）の単位論文として価値あるものと認めた。