

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

## 主論文の要旨

論文題目 タンパク質架橋化酵素 transglutaminase のメダカにおける  
オルソログとその遺伝子変異体の解析

氏名 \* 申請者氏名 渡邊 優子

## 論文内容の要旨

Transglutaminase (TGase) は、タンパク質の翻訳後修飾に関わる酵素である。具体的には  $\text{Ca}^{2+}$  存在下でタンパク質中のグルタミン残基とリジン残基との間に、イソペプチド結合での架橋形成を触媒し、基質タンパク質の構造や機能に変化をもたらすことにより、様々な生体内の現象に寄与している。哺乳類においては 8 種類 (TG1-TG7 および FXIII) のアイソザイムが存在しており、その局在と基質特異性によって、それぞれ異なる生理的機能を有している。その中でも TG1 は、TG3 および TG5 とともに表皮を含む上皮組織に存在しており、哺乳類においてはケラチノサイトの角化に関与している。哺乳類における表皮は、体外からの物理的および生理的バリアとして機能し、正常な構造の表皮が形成されない場合は疾患をもたらす。例えば葉状魚鱗癬は、表皮の角質化に異常がある角化症であり、TG1 がその原因遺伝子の 1 つにあげられている。一方、TG2 は組織型 TG (tTG) と呼ばれ、他のアイソザイムと比較すると普遍的に組織に存在し、その機能も多岐にわたる。さらに TG2 は架橋化酵素活性の他にも、GTP と結合し G タンパク質としての機能を有する。関連疾患としては、パーキンソン病やアルツハイマー病、およびハンチントン病などの神経変性疾患や小腸の自己免疫疾患であるセリアック病への関与が報告されている。本博士論文は、アイソザイムの中でも主要な TG1, TG2 のメダカにおけるオルソログとその遺伝子変異体について解析を行ったものである。メダカは近年ゼブラフィッシュとともに頻用されているモデル動物であり、脊椎動物としてヒトと共通の生体内システムを有し、コスト面や短い世代時間などの利点がある。

我々はすでにメダカにおいて、TG1 のオルソログとして OITGK1, OITGK2 および OITGK3 を、また TG2 のオルソログとして OITGT を同定してきた。これらの TG1 オルソログのうち、発現が主要である OITGK1 と OITGK2 について、タンパク質レベルでも表皮における発現を確認した。この結果を背景とした、OITGK1, OITGK2 の

遺伝子変異体を用いた表現型解析を行った。OITGK1<sup>+/-</sup> OITGK2<sup>+/-</sup>の遺伝子変異体同士を交配させ、OITGK1<sup>-/-</sup> OITGK2<sup>+/-</sup>及び OITGK1<sup>+/-</sup> OITGK2<sup>-/-</sup>を得た。この2種類の遺伝子変異体をそれぞれ交配させた仔魚と、同時期の野生株 (WT)仔魚を用いて、150 mM NaClを含む生育環境での浸透圧耐性について調べた。その結果、OITGK2<sup>-/-</sup> < OITGK1<sup>-/-</sup> < WTの順に浸透圧耐性が弱いことが示された。この表現型は正常な表皮構造を欠くことにより、浸透圧耐性が弱くなったと考えられ、表皮構造の異常や浸透圧耐性についてのメカニズムなどの詳細が解明されれば、表皮構造を修復するような薬剤や、体表からの感染症治癒の薬剤のスクリーニングを行うことが期待できる。

TG2 オルソログである OITGT については、クローニングおよび組換えタンパク質による生化学解析と、パラフィン切片を用いた免疫組織化学的解析を行った。大腸菌を用いて発現精製した組換えタンパク質を用いた TGase 活性測定では、基質及び時間依存的に TGase 活性の上昇を認めた。TG2 は、GTP 結合タンパク質として機能する際には TGase 活性が阻害される。組換え OITGT は GTP 存在下でも TGase 活性を示し、GTP 結合タンパク質としての機能は有していないことが示唆された。また、この組換え OITGT を抗原としてモノクローナル抗体を作製した。この抗体による解析では、脳、眼、脊髄およびガス腺に OITGT の発現を認めた。

また、OITGT の生体内の機能を明らかにするため、遺伝子変異体について表現型の解析を行った。さらに、より詳細な組織分布を把握するため、ポリクローナル抗体を用いたイムノブロットィングと免疫染色を行った。OITGT について作製した遺伝子変異体 2 種は生殖系に異常はなく、OITGT<sup>+/-</sup> 同士の子 F2 の遺伝子型は、メンデル比に従っており、外観に異常は見られなかった。しかしながら 5 分間の総泳動距離を測定したところ、変異体 2 種のどちらも WT と比較して総泳動距離が短くなった。

ポリクローナル抗体を用いたイムノブロットィングでは、発現量に多少の差異があるものの、ほぼ普遍的に発現していることが示された。同様の結果がパラフィン切片の免疫染色でも得られた。さらに、脳の凍結切片を作製し、欠失変異体の切片を比較対象としてポリクローナル抗体を用いて OITGT の詳細な発現部位を調べたところ、視蓋の脳室周囲層のニューロンの一部に強い発現を認めた。OITGT を強く発現しているニューロンがメダカの総泳動距離に影響を及ぼすメカニズムの解明にはさらなる解析が必要になるが、OITGT が魚類において神経系と行動に関与していることと、神経変性疾患のモデル動物としての可能性を示した。OITGT を発現している脳室周囲層ニューロン群の投射先とその機能が解明されれば、関連した疾患のモデル動物としての利用が可能になる。例えば、薬剤を含む水槽に一定時間移すことで薬剤を摂取させたのち、行動解析を行うことでスクリーニングに利用できると考えられる。

以上のことより、本博士論文では、TG1, TG2 の遺伝子変異体メダカが疾患モデル動物として利用できる可能性を示した。これらのメダカを用いれば、大量の検索試行やコストダウンが可能であり、マウスで行うよりも有利であることを強く示唆した。