

論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	※乙 第 号
------	--------

氏 名 渡邊優子

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

論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	人見清隆
委 員	名古屋大学教授	饗場浩文
委 員	名古屋大学教授	廣明秀一
委 員	名古屋大学准教授	加藤竜司
委 員	名古屋大学准教授	小坂田文隆

論文審査の結果の要旨

本論文で研究対象としたトランスグルタミナーゼ (Transglutaminase: TGase) は、カルシウムイオン依存的に、タンパク質中のグルタミン残基と一級アミン、またはリジン残基との間に共有結合を形成し、基質となるタンパク質の構造や機能を変化させることによって、多彩な生命現象に関与する。またこの酵素は微生物から高等動物まで広く生物界に存在しており、哺乳類においては 8 種類のアイソザイム (TG1-TG7 および Factor XIII) が酵素ファミリーを形成して、それぞれ異なる発現分布のもとで、異なる基質タンパク質を対象に架橋化修飾を行っている。このうち主要なものは TG1、TG 3 (表皮形成)、TG2 (細胞死、細胞外マトリクス強化)、および Factor XIII (血液凝固) であり様々な分野で研究されている。

本論文では TGase の中で主要な酵素である、TG1 および TG2 を対象として研究する過程で、モデル生物としてのメダカ (*Oryzias latipes*) を用いて研究展開したものである。メダカはゼブラフィッシュとともに広く用いられてきたモデル動物 (魚) であり、ヒトと同じ脊椎動物として共通する生物現象を多く有する一方で、低い飼育コストや短い世代時間、受精卵への操作の容易さなどの利点を有する。本論文で研究対象とした TG1 は表皮および上皮の形成に関与し、表皮細胞では角化に必須である。一方 TG2 は広くあらゆる組織に発現し、その機能は多彩である。また TGase の活性異常は様々な疾患をもたらすことが知られている。例えば TG1 が欠損する場合は皮膚疾患である魚鱗癬を、TG2 の局所的な異常活性は神経変性疾患や小腸の自己免疫疾患を起こす。

本論文では以上の背景を詳細に述べたうえで、TG1、TG2 のメダカにおけるオルソログ (異種生物で進化的に相当する遺伝子) について組換えタンパク質や抗体を用いて生化学的な解析を行った実験結果を述べ、さらにゲノム編集技術を用いた遺伝子欠損変異体の取得経過および各変異体の表現型について綿密な観察とそれに基づく考察を行っている。

メダカにおいて、TG1 のオルソログとして OITGK1 と OITGK2 の同定はすでに完了していたが、申請者の渡邊は OITGK1 と OITGK2 について表皮における発現を免疫組織学的手法により確認した。また、両遺伝子の欠損変異体を作製して、表現型解析を行いその影響を観察している。ヒトではこのアイソザイム (TG1) が表皮形成に必須であることから、変異体の表現型については体表に何らかの影響があるのではないかと推定した。すなわちこの 2 種類それぞれの遺伝子変異体に加えて、および両方を欠損させた変異体を掛け合わせて作製し、生育 10 日程度の「仔魚」について、高い浸透圧水での生存耐性について調べた。その結果、野生型に比べて変異体の浸透圧耐性が弱いことを見出し、これが酵素の欠損に起因する異常な表皮に由来することを考察している。これらの一連の研究結果から、メダカの遺伝子変異体を用いれば表皮修復や体表での感染症予防に資する化合物の探索等が期待されることを示した。

一方、多様な機能を有するヒト TG2 のオルソログである OITGT については、まず作製した組換えタンパク質による生化学解析と免疫組織化学的解析によって性状解析を進めた。その結果、この酵素はタンパク質架橋化酵素活性を有しつつも哺乳類 TG2 の特徴である、GTP 結合タンパク質としての性質を持たないことを明らかにした。進化上の意義は不明であるが、役割の異なる可能性について新たな知見である。また免疫組織化学的解析では、普遍的に存在しながらも、特に脳、眼、脊髄およびガス腺に OITGT に高いレベルでの発現を確認した。

さらに渡邊は OITGT についても遺伝子欠損変異体を作製して、表現型の解析を行った。作製した変異体 2 種はともに外観に異常は見られないことを示しつつ、一定時間当たりの泳動距離においては野生型と比較すると、変異型の総泳動距離が短くなっていることを見出した。このような遊泳行動に異常が見られる現象から、脳での OITGT の発現に着目して、脳切片を詳細に欠損変異体と比較しつつ調べたところ、視蓋の脳室周囲層のニューロンの一部に OITGT が特異的に発現していることを見出した。この発見は、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すことになる新たな知見である。こうしたことから、薬剤を含む水槽において、野生型および変異体の行動解析を行うことでこれらの細胞や組織に影響を与える化合物を有効にスクリーニングに利用できると考えられる。

以上より、本博士論文で渡邊優子は、ヒトの主要なタンパク質架橋化酵素・トランスグルタミナーゼのアイソザイムである TG1 および TG2 について、メダカでのオルソログの生化学的性状を明らかにするとともに、変異体メダカを確立し解析して、これらが疾患モデルとして利用できる可能性を示した。これまでの報告からも、対象とするタンパク質架橋化酵素の異常な活性発現が種々の疾患をもたらす事実があることから、モデル生物としてのメダカを用いたこれら一連の成果は創薬科学において有意義なものとして認められ、論文博士としてふさわしいものと評価できる。