



Title	Developmental regulation of Na ⁺ /myo-inositol cotransporter gene expression
Author(s)	郭, 薇
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41670
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	郭 薇
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 4 5 0 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 11 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科内科系専攻
学 位 論 文 名	Developmental regulation of $\text{Na}^+/\text{myo} - \text{inositol cotransporter}$ gene expression (ラット胎生期におけるミオイノシトールトランスポーターの遺伝子 発現)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 岡田伸太郎 (副査) 教 授 三木 直正 教 授 遠山 正彌

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

ミオイノシトールトランスポーターはイノシトールを細胞内に取り込む膜蛋白で、特に細胞外の浸透圧が上昇したときに、その遺伝子発現が増加する。このことによってイノシトールの細胞内への取り込みが増し、細胞内外の浸透圧勾配の差を是正する。このように、ミオイノシトールトランスポーターは、成熟個体では、浸透圧ストレスによる細胞の収縮や膨化等の形態的变化から細胞を保護する役割を担っている。胎生期の脳脊髄液には 3 mM にも及ぶ高濃度のイノシトールが存在しているが、その意義については、明かでない。さらに、ダウン症候群の 21 番目の染色体短腕で trisomy になっている部位に、ヒトミオイノシトールトランスポーターの遺伝子座が位置することから、ダウン症候群における精神遅滞と胎生期の神経系でのミオイノシトールトランスポーターの発現調節には、何らかの関係が存在すると考えられる。また、浸透圧の変化する刺激からオスモライトトランスポーターの発現誘導までの経路はほとんど明らかにされていない。そこで、大腸上皮由来の Caco-2 細胞を用いて、differential display 法によって、浸透圧負荷時に必要となる新規の遺伝子を解析した。

【方法】

胎生 14 日、16 日、18 日と生後 1 日、21 日の Wistar ラットを用いて、ミオイノシトールトランスポーターの cDNA から cRNA プローブを作製し、ラットの発生段階におけるミオイノシトールトランスポーターの遺伝子発現について、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて検討した。また、ミオイノシトールトランスポーターのアミノ酸配列からペプチドを合成し、ウサギで抗体を作製し、ウェスタンブロット解析も同様にを行い、ミオイノシトールトランスポーターの発生段階における蛋白レベルでの解析も同時に行った。

高浸透圧刺激によるオスモライトのトランスポーターの遺伝子発現誘導に関連する遺伝子を検索するため、Caco-2 培養細胞を、高張、等張、低張の条件下で培養し mRNA 抽出後、differential display 法を用いて浸透圧負荷時に発現が上昇する遺伝子をスクリーニングした。この differential display 法で得られた浸透圧応答候補遺伝子について、ノーザンブロット法を用いて、浸透圧変化時の発現誘導を確認した。浸透圧負荷時に実際に発現が上昇する遺伝子については、塩基配列を決定し、その中で興味深い新規遺伝子については cDNA の全長を獲得するために、cDNA ライブラリーをスクリーニングした。ラットに 4 M NaCl 腹腔内投入し、*in vivo* においても浸透圧変化時の発現調

節を検討した。

【成績】

ミオイノシトールトランスポーターの mRNA はラット胎生14日から強いハイブリダイゼーションシグナルが脳で幅広く認められ、このトランスポーターの mRNA の脳における強い発現は、生後1日目まで続く。その後、脳におけるミオイノシトールトランスポーターの発現レベルは急速に減少し、生後21日には、その発現は、脳内では脈絡叢を除くと非常に低いレベルに保たれた。一方、腎臓においては逆に、胎生期のミオイノシトールトランスポーターの発現は弱い、生直後からその発現が急速に増加し、生後21日には非常に強い発現レベルに到達する。さらに、ミオイノシトールトランスポーターに対する抗体を用い、脳におけるこのトランスポーター蛋白の動態を解析したところ、mRNA の変化と同時に、胎生16, 18, 生後1日の脳では、約80kDa の濃い単一バンドを認めたが、生後21日の脳ではバンドはほとんど認められなかった。

Differential Display 法により浸透圧調節に関係する新規の RNA helicase 遺伝子ファミリーに属する cDNA を単離し、osmoresponsive RNA helicase (ORH) と名づけた。このクローンは458個のアミノ酸から成り、他の RNA helicase 遺伝子ファミリーと同様に ATP/GTP-binding site motif や DEAD-box ATP dependent helicase signature がよく保存されていた。この遺伝子の浸透圧負荷による発現変化をノーザンブロット法により解析すると、高浸透圧負荷後48時間で mRNA の強い発現の上昇が認められた。さらに、ORH を正常浸透圧下で、Caco-2 細胞に強制的に過剰発現させると、コントロールのベクターのみを transfection した細胞に比べると、ミオイノシトールの取り込みの強い上昇が認められた。*in vivo* でも ORH が高浸透圧負荷によって実際に遺伝子発現が上昇するかどうかを検討するために、ラットに高張 NaCl を腹腔内注射し、*in situ* hybridization 法を用いて解析したところ、高張 NaCl の投与による血清浸透圧の上昇にともなって ORH mRNA の大腸上皮で発現の上昇を認めた。

【総括】

腎臓では尿の濃縮機能が、盛んに行われる生後に著しくミオイノシトールトランスポーターの発現が上昇することから、尿細管での浸透圧負荷から細胞を保護するためにミオイノシトールトランスポーターが機能しているものと考えられる。一方、脳ではミオイノシトールトランスポーターが胎生期に多量に発現し、成熟個体においてはその発現レベルが低い。胎生期の脳ではイノシトール自体の含有量が極端に高いことやダウン症候群の染色体異常部位にミオイノシトールトランスポーターの遺伝子座が存在し、患者の線維芽細胞ではこのトランスポーターの発現調節異常が報告されていることから、ミオイノシトールトランスポーターは胎生期の脳の発達において何らかの重要な役割を演じ、ダウン症候群における精神神経症状もミオイノシトールトランスポーターの発現異常が一因であるかもしれない。Caco-2 細胞は、高浸透圧に曝されるとミオイノシトールトランスポーターの遺伝子発現が上昇し、ミオイノシトールの取り込みも上昇する。一方、今回 differential display 法で同定した高浸透応答性の RNA helicase ORH は、等張で培養している Caco-2 細胞に強制発現させてもミオイノシトールトランスポーターの活性が上昇することから、高浸透圧ストレス、ミオイノシトールトランスポーターの活性の上昇、細胞の保護という一連のストレス応答過程の中で、ORH がミオイノシトールトランスポーターの up-regulation に関与する一つの因子であると考えられた。

論文審査の結果の要旨

本研究は、細胞内の浸透圧調節に深く関わっているミオイノシトールトランスポーターが、胎生期に脳内で特徴的に一過性に強く発現していることを明かにするとともに、このミオイノシトールトランスポーターの発現を調節する因子として、新規の RNA helicase の遺伝子を単離しその構造も明らかにした。これらの知見は、ミオイノシトールトランスポーターの遺伝子発現異常が報告されているダウン症候群における精神神経症状の原因の究明に貢献するものであり学位の値するものと認める。