OUKA
Osaka University Knowledge Archive

Title	遺伝学的手法による細胞死制御遺伝子の同定
Author(s)	船橋, 義光
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/41696
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。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	船橋義光（ふなはしよしみつ）
博士の専攻分野の名称	博士（医学）
学位記番号	第 14463 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 医学系研究科生理系専攻
学位論文名	**遺伝学的手法による細胞死制御遺伝子の同定**
論文審査委員	（主査） 教授 辻本 賀英 （副査） 教授 岡野 栄之　教授 内山 安男

論文内容の要旨

【目的】

細胞死の制御に関与する遺伝子産物は種を超えて保存されていることが知られている。ショウジョウバエにも哺乳類と同様に線虫の細胞死実行に関与するced－3遺伝子のホモローグが存在することが示されており，この遺伝子産物は，実際にショウジョウバエの生体内で細胞死実行に関与していると考えられている。Ced－3の哺乳類ホモローグはcaspase familyと呼ばれ，システインプロテアーゼ活性を持ち，現在までに10数種類のfamilyのメンバーが知られている。Caspase familyの遺伝子産物は多くの細胞での細胞死実行において重要な役割を果たしていると考えられている。Casapase familyの遺伝子産物は長い不活性な前駆体として産生された後，酵素的に切られて活性化することが知られている。しかし，多くのcaspaseの活性化の制御の分子機構は解明されていない。そこで，本研究では，細胞死実行の分子機構を解明するために，caspaseの活性化の制御に関与する遺伝子とその下流で機能する遺伝子を得ることを目的とした。実験は，ショウジョウバエの生体に人工的にヒトのcaspase－1を過剰発現させることにより細胞死を誘導する系を作り，さらにその復帰突然変異体を得ることにより目的の遺伝子を探索した。

【方法】

復帰突然変異体のスクリーニングにはUAS－caspase－1の系統を用いてGal4誘導によってcaspase－1をショウジョウバエの生体に異所的に発現させる実験系を用いた。Gal4活性化のための系統は，Gal4を神経系で発現させるsca－Gal4系統，蛹化ホルモン産生細胞で発現させる71B－Gal4系統，胸の筋肉細胞で発現させるT93－Gal4系統の3種類を用いた。

UAS－caspase－1の系統のオスにT93－Gal4，sca－Gal4，71B－Gal4のメスを交配することにより過剰な細胞死が引き起こされ，その結果ハエの個体そのものが致死になる系を復帰突然変異体のスクリーニングの系として用いた。UAS－caspase－1の系統のオスに，点突然変異誘発剤である0.025M Ethyl methanesulphonate（EMS）を含む1％ショ糖培地で一晩飼育した後，sca－Gal4，T93－Gal4，71B－Gal4のそれぞれのメスと交配させて復帰突然変異体をスクリーニングし，その系統を確立した。

X染色体に復帰突然変異を保持する系統のメスに，X染色体のマーカーである*y w m f*の系統のオスを交配して復帰突然変異のマッピングを行った。

【成績】

T93－Ga14，71B－Ga14，sca－Ga14によるヒトcaspase－1の過剰発現による細胞死を復帰させる復帰突然変異体をT93－Ga14，71B－Ga14，sca－Ga14の3種のGa14について約10,000ずつスクリーニングを行い，それぞれのGa14について復帰突然変異体の候補を複数得た。これらの系統に関してX染色体についてマッピングを行ったところ，T93－Ga14誘導のスクリーニングによって得られた1系統のみがX染色体上の単一の位置に復帰突然変異がマップされた。この系統（系統479）に関してさらに詳細なマッピングを行った結果，この復帰突然変異はX染色体上の1－80の付近に位置することが予想された。

系統479の復帰突然変異が他のGa14の系統によって誘導されたcaspase－1の過剰発現の細胞死による致死をも止めるかどうかを検討した。この結果，系統479の復帰突然変異はT93－Ga14誘導によるcaspase－1過剰発現の細胞死による致死だけでなく，71B－Ga14誘導のそれをも阻害した。しかし，sca－Ga14のそれは抑制しなかった。

【総括】

本研究では遺伝学的な手法を用いて細胞死の制御に関与する遺伝子を探索した。この方法には，分子生物学的手法による場合のような人工的な試験管での細胞死の実験ではなく，実際の生体内での細胞死の制御が観察できるという長所がある。今回用いた遺伝学的手法は現在主流である分子生物学的手法とは異なる有力な手法と思われる。

今回の実験では哺乳動物の代表的な細胞死実行遺伝子に対する制御遺伝子の変異体をハエの生体で得ることができた。このことは，多細胞生物にとって共通の機能である細胞死の分子機構が種を超えてよく保存されているためだと思われ，ショウジョウバエを使った本研究の結果は広く哺乳動物にも適用することができる可能性がある。

論文審査の結果の要旨

アポトーシスは，生物の発生にとって不可欠な機能であり，個体発生や恒常性の維持のために重要な役割を果たしている。細胞死制御の破綻は種々の疾患の原因にもなりうるため細胞死の分子機構は，発生生物学のみならず，医学・薬学への応用の面からも早期の解明が期待されている。

本研究では細胞死の際重要な働きをすると考えられている細胞死のシグナル伝達因子であるcaspase－1遺伝子産物の制御機構の解明を目的とした。ショウジョウバエの生体にヒトcaspase－1を過剰発現させることによりショウジョウバエの個体が致死になる変異体を作成し，この変異体にさらにランダムに点突然変異を加えることにより致死を免れる復帰突然変異体のスクリーニングを行った。その結果，遺伝子座1－80に復帰突然変異を有する復帰突然変異体を同定した。種々の解析からこの変異体はcaspase－1遺伝子産物の制御または下流で細胞死の実行において重要な働きをする遺伝子の変異体であると考えられた。

本研究はアポトーシスの分子機構の解明の為に，従来多く用いられてきた分子生物学あるいは生化学的な手法と異なるショウジョウバエの遺伝学の実験系を確立し，細胞死の制御に関わる遺伝子の変異体の同定に成功したもので学位に値するものと認める。