

Title	新規ABC膜輸送体のノックアウトマウス作成と機能解析
Author(s)	久保, 義行
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/44146
rights	
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	久保 義行
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 17758 号
学位授与年月日	平成 15 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科分子薬科学専攻
学位論文名	新規 ABC 膜輸送体のノックアウトマウス作成と機能解析
論文審査委員	(主査) 教授 山口 明人 (副査) 教授 前田 正知 教授 馬場 明道 教授 花岡 文雄

論文内容の要旨

ヒトを含む高等生物では、生細胞から様々な物質が排出(放出)されている。その代表例としては、生体情報伝達分子が挙げられる。現在、生体情報伝達分子の分泌機構として開口放出が知られている。グルタミン酸やカテコールアミン類などは、小胞体膜上に発現する VGLUT や VMAT によって小胞体内腔に輸送され、充填される。また、インスリンなどのペプチド分子はシグナルシーケンスの働きにより、分泌小胞内に封入される。小胞内に蓄えられた生体情報伝達分子は、その後、開口放出によって細胞外に分泌される。しかしながら、エストロゲンなどのステロイドホルモン類、プロスタグランジン、スフィンゴシン-1-リン酸などの脂質メディエーター類、インターロイキン-1 などのシグナルシーケンスを有していないペプチド性分子などは開口放出によらずに分泌されるが、その分泌機構は知られていない。しかし、生体内において、これらの分泌は厳密に制御されており、これを担う膜輸送体が存在するはずである。

私は脳・神経組織に発現している ABC トランスポーター A サブファミリーに注目し、遺伝子クローニングから生理的役割解明までを目指した。新生仔マウス脳において検索を行った結果、4 種の新規遺伝子を見出した。これらは、それぞれヒト ABCA5、ABCA8a、ABCA8b、ABCA9 のマウス・オルトログ (mABCA5、mABCA8a、mABCA8b、mABCA9) であることが明らかとなった。さらに神経細胞からは mABCA5 と mABCA8b の 2 つのみが見出された。結局、マウス新生仔脳および神経細胞両方に共通に発現する新規遺伝子は、mABCA5 と mABCA8b であった。

その後、私は mABCA5 に注目して研究を進めてゆくこととし、mABCA5 の完全長 cDNA のクローニングを行った。ABCA5 はゲノムプロジェクトの結果、存在が明らかとなった ABC トランスポーターであり、機能および臓器分布は解明されていない。また、ABCA5 はヒト 17q24.3 に存在することが明らかになっているが、ヒト 17q24.3 には ABCA5、10、6、9、8 が連続的に存在し、「ABC クラスター」を構成している。また、マウス・ゲノムにおいても 11E1 に同様のクラスターが存在していることを確認している。

mABCA5 遺伝子断片に関して、BLAST サーチを行った結果、マウス第 11 番染色体ゲノム断片のエキソン部分と完全マッチした。次に、このゲノム断片配列に関して、BLAST サーチを行った結果、mABCA5 に相当する EST クローンを 3 クローンを見出した。このうちの 2 つを連結することで、mABCA5 の完全長 cDNA を得ることができることが明らかとなった。よって、これらを遺伝子組換えによって、哺乳類発現用ベクター (pEGFP-C1、pEGFP-N1、pcDNA3) に組み込んだ。クローニングに成功した mABCA5 は 1642 アミノ酸からなり、疎水性アミノ酸の占める割合は 52% であった。また、推定される分子量は 185 kDa であった。また、予測される構造は 12 回膜貫通構造であり、

細胞質側に NBD が 2 箇所存在する。

ノーザンブロット解析の結果、mABCA5 遺伝子転写産物は、精巣、脳、肺に最も多く発現しており、心臓、腎臓に中程度、骨格筋、皮膚、肝臓に微弱に発現していることが明らかとなった。

完全長 cDNA クローニング以降、mABCA5 に関して臓器分布などの知見が得られた。その一方で、ABCA5 の機能の解明に向け、ABCA5 ノックアウトマウスの作成・解析を行った。作成に成功した ABCA5 ノックアウトマウスは正常に分娩され成獣するが、成熟期に入った後、ノックアウトマウスにおいて異常が観察される。具体的には、活動性の低下、腹部が膨大した異常な体型、眼球突出が挙げられる。このような状態になったマウスは回復せず、死亡する。検死解剖では、さらに皮下浮腫、腹水滞留、末梢臓器の鬱血、肝臓異常、心拡張が確認されたが、主要発現臓器である精巣・脳に特に異常は確認されなかった。このことは病理切片の解析においても、同様であった。腹部の膨大に関しては、皮下浮腫がその実体である。肝臓異常が確認できることから浮腫・腹水の原因は、肝機能低下に伴うアルブミン合成低下によって、血漿膠質液浸透圧が減少したためであると考えられる。

病態発症機構としては肺が mABCA5 の主要発現臓器の 1 つであることから、「肺異常→肺性心（右心不全）→鬱血性肝不全」の図式が考えられる。これは、肺循環障害のため右心室の肥大拡張を生じるものである。しかしながら、心臓の病理切片を見るとノックアウトマウスでは心室は左右ともに拡張していることから、この可能性は低い。むしろ、心筋症の症状に近いとも考えられる。心筋症については、その発症機構に不明な点が多く、もし、mABCA5 が心筋症原因遺伝子の 1 つであるならば、ABCA5 ノックアウトマウスの解析は、心臓疾患の究明と治療に貢献することになるだろう。また、もう 1 つの興味深い点としては、mABCA5 の主要発現臓器は精巣、脳、肺であったが、ノックアウトマウスにおいて顕著な異常が確認された臓器（心臓、肝臓）は mABCA5 低発現であったことが挙げられる。このことから、1) mABCA5 が心臓や肝臓にとって極めて重要な役割を担うものである可能性、あるいは、2) mABCA5 欠損によって主要発現臓器である脳において問題が生じ、心臓や肝臓にとって重要な因子がカットされた可能性である。いずれにしても、この疑問に回答を得るためには、ノックアウトマウスの病態発症機構をさらに詳しく解き明かさなければならない。

本研究を通して、mABCA5 が生体にとって非常に重要な ABC トランスポーターであることが明らかにされた。

論文審査の結果の要旨

高等生物では、細胞から様々な情報伝達物質が放出されている。その分泌機構としては、開口放出がよく知られている。ところが、ステロイドホルモン類、プロスタグランディン、スフィンゴシン 1 リン酸などの脂質メディエーター類、インターロイキン 1 などのシグナルシーケンスを持たないペプチド性情報伝達分子などは開口放出によらずに分泌されるが、その機構は不明である。久保君は、ABC トランスポーターの中のとくに A サブファミリーに注目し、情報伝達分子の分泌を担う膜輸送系がその中に存在するのではないかという作業仮説の下に新規 ABCA 遺伝子の検索、クローニング、ノックアウトマウスの作成を行い解析した。

まず RT-PCR 法により、マウス脳特異的に発現している 4 種の新規 ABCA ファミリー遺伝子を見だし、そのうち AB1 の完全長 cDNA クローニングを行った。結果的には、ヒト ABCA5 のマウスホモログであることが判明したが、ABCA5 については本年 1 月の BBRC 論文以外に報告がなく、その論文でも機能等は全く未知の遺伝子である。久保君は C 末端抗体を作成して、初めてたんぱく質レベルで細胞質膜への発現を確認した。

さらに、ノックアウトマウスの作成を行った。ノックアウトマウスは正常に分娩され、発育するが、11 週齢以降拡張型心筋症および肝不全を起こし死亡する。肝臓では、とくに静脈近傍に鬱血が見られることから、心臓の不全による 2 次的障害と考えられる。脳特異的に発現する遺伝子のノックアウトにより、なぜ拡張型心筋症が起こるのかはきわめて興味深い。同時に、眼球突出が観察されることから、甲状腺機能亢進が考えられる。さらに、脳下垂体の TSH、視床下部の TRH などの分泌に関連している可能性もあり、ABCA5 はこれまでに知られていない全く新しいタイプの情報伝達分子排出系である可能性が高いと考えられる。

ノックアウトマウス作成は技術的難度が高く、長期を要する。久保君は博士後期 3 年間でその難関をよく突破し、興味深い新規排出系の発見に突破口を開いた。博士（薬学）の学位に値する研究と認められる。