



Title	Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene : differential regulation in the mouse nervous system during development
Author(s)	金井, 将昭
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49850
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、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について 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	かな い まさ あき 金 井 将 昭
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 22797 号
学位授与年月日	平成21年3月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科未来医療開発専攻
学位論文名	Identification and characterization of novel variants of the tryptophan 2,3-dioxygenase gene : differential regulation in the mouse nervous system during development (新規トリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼバリエントの同定 : マウス発生期の中枢神経系における発現調節解析)
論文審査委員	(主査) 教授 米田 悦啓 (副査) 教授 遠山 正彌 教授 武田 雅俊

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

トリプトファン(Trp)とその代謝物は中枢神経系において様々な生理活性を示すことが知られている。なかでもセロトンは情動等の高次脳機能に重要な神経伝達物質であり、その代謝系の破綻はうつ病等の精神疾患と関連することが示唆されている。一方で、Trp代謝の中心であるキヌレニン(Kyn)経路の代謝物が、不安などの精神状態やアルツハイマー病等の神経変性疾患の病態に関与することが報告されているが、その分子機序や責任分子の詳細は不明である。我々は、Kyn代謝の速速酵素の一つであるトリプトファン2,3-ジオキシゲナーゼ(TDO)に注目した。この

酵素は大部分が肝臓に発現し、全身のTrp代謝を制御することが示唆されているが、近年中枢神経系での発現に加え、統合失調症患者の脳組織において発現が増加する事実が報告された。本研究では、未だ詳細の不明であるTDOの中枢神経系における発現分布、ならびに発生期における発現制御について明らかにすることを目的とした。その解析過程で2つの新規バリエントを同定し、解析した。

〔 方法ならびに成績 〕

ノーザンブロット法と定量的real-time RT-PCR法により、脳内にも*tdo* mRNAの発現が認められ、特に海馬、小脳で発現が高く、脳幹部、線条体、大脳皮質にも発現することが明らかになった。以上の結果から、TDOは脳局所で機能している可能性が示唆された。また、ノーザンブロット法で既知のfull-formのバンドに加えて、数本のバンドが認められ、バリエントの存在が示唆された。*tdo* mRNAの5'端に注目し、検索したところ、2つの新規バリエントが同定された。1つは、exon1の上流に存在するexon0領域を含むバリエント1、もう一つとして、exon0の一部が欠損し、exon2に結合するバリエント2を見出した。これらのバリエントの機能を*in vitro* translation系ならびにCOS7細胞発現系で解析したところ、full-formならびにバリエント1は同一サイズの蛋白質であること、バリエント2は前者に比べて低分子であることが明らかになった。Native-PAGEにより、各バリエントはTDO活性に重要な4量体を形成すること、さらに酵素活性測定法により、各バリエントの酵素活性がfull-formと同様に保持されていることが明らかになった。これらバリエントの脳内発現を確認したところ、full-formに比べて発現は低いものの、その発現分布はfull-formと類似することが明らかになった。続いて、*tdo* mRNAsの高発現部位である海馬と小脳について発生期での発現変化を解析した。海馬では、full-formが生後1日(P1)から増加し、P21でピークに達し、その後維持されることが明らかになった。バリエント1は、P21から徐々に発現が増加したが、バリエント2は恒常的に低いレベルで維持されることが明らかになった。一方、小脳ではfull-formの発現がP7からP14で急激に増加しその後維持されるのに対し、バリエント1は、P21から徐々に発現が増加した。興味深いことに、バリエント2は、発達初期のP4からP49まで高いレベルで維持されることが明らかになった。以上の結果から、脳局所ではfull-formとバリエントが異なる発現調節を介して機能する可能性が示唆された。情動等に重要な海馬においては、full-formの発現が維持されることが、海馬機能の維持に重

要である可能性が示唆された。一方で、Trp代謝が小脳発達期に重要であることや、TDOの遺伝子多型と自閉症（小脳発達障害が一因とされる）との相関性が報告されていることから、小脳発達期にはTDOが重要である事が想定され、今回の結果から、発生初期に増加するバリエーション2がその責任分子である可能性が示唆された。

〔 総 括 〕

中枢神経系における*tdo* mRNAの発現は、様々な脳領域で確認され、なかでも海馬と小脳で高発現であることが明らかになった。また、脳内に数種類のバリエーションが認められ、その中の2つのバリエーションを新規に同定し、full-formと同様の酵素活性を持つことを明らかにした。さらに、発生期の各*tdo* mRNAの発現解析から、full-formとバリエーションの発現時期が異なることが明らかとなり、これまで知られている肝臓でのTDOの機能に加えて、脳局所ではTDO full-formとバリエーションが使い分けられることにより、機能している可能性が示唆された。今回見出した新規バリエーションは、今後TDOの新たな機能を探る重要な切り口となると期待される。

論文審査の結果の要旨

本研究は、古くから情動に重要とされるトリプトファン代謝に注目し、その律速酵素であるTryptophan 2,3-dioxygenase (TDO)の脳内の発現分布、ならびに発生期の発現制御について解析した。脳内の様々な領域に*tdo* mRNAが分布し、なかでも海馬と小脳で発現が高いことが明らかになった。また、解析の過程で*tdo*の2つのバリエーションを新規に同定した。これらのバリエーションはいずれも脳内に発現し、酵素活性を有する機能分子であることを明らかにした。また海馬では発生初期からアダルトまでの全ての時期にfull-formの発現が高く、小脳では発生初期にバリエーション2の発現が高いことが明らかになり、full-formとバリエーションが使い分けられている事が明らかとなった。以上の結果は、情動や精神疾患を紐解く新たな基盤となるものであり、本研究は学位に値すると考えられる。