

Title	Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF- κ B-dependent gene expression in drosophila and mice
Author(s)	松下, 一史
Citation	大阪大学, 2009, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/49889
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、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【33】

氏 名	まつ した かず みみ 松 下 一 史
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 2 2 7 4 2 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 医学系研究科予防環境医学専攻
学 位 論 文 名	Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF- κ B-dependent gene expression in drosophila and mice (Akirinは高度に保存された核タンパク質であり、ショウジョウバエおよびマウスにおけるNF- κ B依存性の遺伝子発現に必要である)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 審 良 静 男 (副査) 教 授 熊ノ郷 淳 教 授 荒瀬 尚

論文内容の要旨

(目的)

TLR を介したシグナル伝達をはじめ、自然免疫系の病原体認識機構ならびにそのシグナル伝達機構は近年爆発的な勢いで明らかとなってきている。しかし、自然免疫応答において、核内における遺伝子特異的な発現制御機構やそれに関わる核内因子はいまだに不明な部分が多い。我々は自然免疫応答に必要な新規分子、特に核内因子の探索を行い、その生理的な役割を検討した。

(方法ならびに成績)

我々はショウジョウバエ(*Drosophila*)を用いた siRNA スクリーニングにより imd pathway に関与する新規遺伝子 CG8580 を同定し、本遺伝子を日本語の「明らかにする」から Akirin と命名した。Akirin は 201 アミノ酸からなるタンパク質であり、その N 末端側 24 から 29 番のアミノ酸に核移行シグナル(NLS)を有する。Akirin は昆虫類から哺乳類まで高度に保存されたタンパク質であり、脊椎動物では鳥類を除いて二種類の Akirin 相同体が存在することが明らかとなった。したがって、哺乳類における Akirin は Akirin1(マウスにおいて 6330407G11Rik)および Akirin2(マウスにおいて 2700059D21Rik)とした。*Drosophila* Akirin とヒトの Akirin1 および Akirin2 の相同性はアミノ酸レベルでそれぞれ 39%と 40%であり、特に NLS を含む N 末端および C 末端領域が相同性の高い領域であった。これら *Drosophila* およびヒトの Akirin の細胞内における局在を、過剰発現させた細胞を用いて検討したところ、予想されたようにいずれの Akirin も核内に局在し、その NLS を除去すると細胞質においても発現が見られるようになった。*Drosophila* の細胞において、Akirin に対する siRNA は PGRP-LC の細胞内ドメインを過剰発現させることで誘導される Attacin レポーター遺伝子の発現を抑制した。また、これは Imd または Relish の過剰発現により誘導されるレポーター遺伝子の活性化も抑制したことから、Akirin は Relish よりもさらに下流もしくはパラレルな位置において機能していると予想される。この Akirin ノックダウンのフェノタイプはヒトの Akirin2 を過剰発現させることでレスキューされ、したがって Akirin は哺乳類においても同様の機能が保存されていることが予想された。我々は、この哺乳類における Akirin の機能を明らかにするために Akirin1 および Akirin2 のノックアウト(KO)マウスを作製した。

Drosophila における Akirin KO が致死であることが分かっていたので、Akirin1 および Akirin2 ともにコンディショナル KO として作製した。これら Akirin1 または Akirin2 の flox アレルを持つマウスは、全身性に Cre 遺伝子を発現する CAG-Cre トランスジェニックマウスと交配することでコンベンショナルな KO マウスとすることが可能である。Akirin1 に関しては、このコンベンショナルな KO の系において menderian rate にしたがって KO マウスを得ることができた。この Akirin1 KO マウスに関して解析したところ、残念ながら特に免疫学的フェノタイプを見いだすことはできなかった。一方、Akirin2 に関してはコンベンショナルな KO の系では *Drosophila* の場合と同様に KO の個体を得ることができなかった。妊娠 9.5 日目の胎児まで検討したが、KO の胎児を得ることができなかったことから Akirin2 は早期の発生段階に必須の分子であり、また Akirin2こそが *Drosophila* の Akirin の真のカウンターパートであると予想された。

コンベンショナルな系において KO 細胞を得ることができなかったのも、Akirin2 flox^{-/-}のジェノタイプをもつ胎児からマウス胎児繊維芽細胞(MEF)を単離し、*in vitro* において Cre 遺伝子を発現するレトロウイルスを感染させることで Akirin2 KO MEF とした。なおコントロールとしては Akirin2 flox^{+/+}の MEF に同様に Cre 発現ウイルスを感染させたものを用いている。これらの細胞における IL-6 産生を ELISA にて検討したところ、Akirin2 KO MEF では IL-1 β 、TLR リガンドおよび TNF- α 刺激に対する IL-6 産生が著減していた。さらに、northern blot 法によって IL-1 β および LPS 刺激に対する遺伝子発現を検討したところ Akirin2 KO MEF ではどちらの刺激に対しても IL-6、RANTES および IP-10 発現が著減していた。一方で、KC、IkB α および I κ B ζ はコントロールの細胞と変化がなく、その発現に Akirin2 を必要とする遺伝子群と必要としない遺伝子群が存在することが明らかとなった。続いて、Akirin2 KO MEF における IL-1 β および LPS 刺激の下流でのシグナル伝達経路の活性化を検討した。western blot 法および EMSA により Akirin2 KO MEF において I κ B α の分解、そしてそれに続く NF- κ B の活性化が正常に誘導されることが明らかとなった。したがって、*Drosophila* Akirin と同様に、マウスにおいて Akirin2 は核内で NF- κ B の活性化の下流もしくはパラレルな位置で機能していると考えられる。

(総括)

これまでの検討から新規核タンパク質である Akirin は *Drosophila* において Imd 誘導性の遺伝子発現に必須であることが明らかとなった。哺乳類は二種類の Akirin をもつがその内、Akirin2 が *Drosophila*

Akirin のカウンターパートであり、マウスにおいては TLR 誘導性の自然免疫応答に重要な役割を持つことが明らかとなった。その遺伝子発現制御は Akirin が核内因子であることから予想されるように、標的遺伝子特異的に転写制御因子として機能していると考えられる。そして、Akirin は NF- κ B の活性化とパラレルもしくはよりも下流において機能していると予想される。

論文審査の結果の要旨

本研究ではショウジョウバエ(*Drosophila*)を用いた siRNA スクリーニングにより imd pathway に関与する新規遺伝子 Akirin を同定した。Akirin は昆虫類から哺乳類まで高度に保存された核タンパク質であり、哺乳類では二種類の Akirin 相同体、すなわち Akirin1 および Akirin2 が存在することが明らかとなった。*Drosophila* において、Akirin に対する siRNA は PGRP-LC 誘導性の Attacin レポーター遺伝子の発現を抑制した。エピスタティックな検討の結果から、Akirin は Relish よりもさらに下流もしくはパラレルな位置において機能していると予想された。さらに、Akirin の哺乳類における機能を明らかにするために Akirin1 および Akirin2 のノックアウト(KO)マウスを作製した。Akirin1 KO マウスでは特に免疫学的フェノタイプを見いだすことはできなかったが、Akirin2 KO のマウス胎児繊維芽細胞(MEF)では IL-1 β 、TLR リガンドおよび TNF- α 刺激に対する IL-6 産生が著減していた。一方、IL-1 β および LPS 誘導性の I κ B α の分解、および NF- κ B の活性化は正常に誘導されていた。したがって、*Drosophila* Akirin と同様に、マウスにおいても Akirin2 は核内で NF- κ B の活性化の下流もしくはパラレルな位置で機能していると考えられる。

以上の結果は学術的に非常に有意義な研究成果であり、学位の授与に値すると考えられる。