The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	哺乳類におけるGyrIホモログ遺伝子の機能解析
Author(s)	高岡, 匠
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/54043
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　高岡　匠　）	
論文題名	哺乳類における*GyrI*ホモログ遺伝子の機能解析 (Functional analyses of *GyrI*-like gene in mammalian)

論文内容の要旨

生物のDNAには、転写・複製といった代謝過程で捻じれや絡まりが生じ、その蓄積は円滑なDNA代謝を阻害する。これを回避する為、細胞にはDNA topoisomeraseと呼ばれる、DNA鎖を切断し再結合する機能を持つタンパク質が備わっており、捻じれや絡まりを解消することで円滑なDNA代謝に寄与している。我々のグループでは、大腸菌のII型topoisomeraseであるgyraseに直接結合してその活性を阻害するタンパク質を同定し、gyrase inhibitor（GyrI）と命名した。GyrIと部分的相同性を持つタンパク質は哺乳類にも存在し、データベース上ではtestis expressed 264（Tex264）として登録されているが、その機能は明らかにされていない。
私は、個体および細胞内におけるTex264の機能を明らかにすることを目的として研究を行った。
まず、GyrIがgyraseに結合してその活性を阻害することから、組換えタンパク質とキネトプラストDNA（kDNA）を用いたデカテネーションアッセイを実施し、Tex264の、哺乳類のII型topoisomeraseであるtopoisomerase II（TopoII）に対する阻害機能の有無を検証したが、Tex264によるTopoII阻害効果は検出されなかった。
デカテネーションアッセイにおいてTopoII阻害効果が検出されなかったことから、Tex264の主要機能はTopoIIの阻害ではなく、それ以外にあるのではないかと考え、Tex264とTopoII、およびその他のタンパク質との相互作用について検証した。
C57BL/6Jマウス胚性繊維芽細胞（MEF）でFLAGタグ付きTex264（C末端側にタグを付加したTex264-FLAG）を発現させ、この細胞から抽出したタンパク質を材料としてanti-FLAG M2 agaroseを用いた免疫沈降を実施した。沈降画分をSDS-PAGEに供し、銀染色を実施したところ、Tex264-FLAG過剰発現細胞由来沈降画分をロードしたレーンの分子量160-220 kDaの間に、ネガティブコントロールとして使用したTex264過剰発現細胞由来沈降画分をロードしたレーンには見られないバンドが観察された。このバンドを切り出し、質量分析を実施したところ、小胞体においてタンパク質への糖鎖付加に寄与するタンパク質であるUggt1が検出され、このことからTex264はUggt1およびUggt1関連タンパク質と相互作用するのではないかと考えた。そこで、小胞体の膜上における糖タンパク質折り畳み過程においてUggt1と協調して機能するタンパク質であるERp57、非糖タンパク質折り畳み過程において中心的な役割を担うPdia1と、Tex264の相互作用についても検証した。大腸菌を材料として発現・精製したGST-Tex264をグルタチオン Sepharoseに結合させることでアフィニティービーズを作製し、成体マウスの肝臓から抽出した膜画分タンパク質とこのビーズを混合した後、溶出画分をウエスタンブロットに供したところ、Uggt1、ERp57、Pdia1とGST-Tex264の相互作用を示唆する結果が得られた。さらに、N末端側にEGFPを付加したTex264（Tex264-EGFP）を発現させたヒト細胞株を材料として抗UGGT1抗体、抗PDIA1抗体を用いた免疫蛍光染色を実施したところ、Tex264-EGFPとUGGT1、PDIA1は共局在を示した。これらの結果から、Tex264は小胞体に局在し、糖タンパク質と非糖タンパク質、両方の折り畳みに寄与していると考えられる。
一方、小胞体においてタンパク質折り畳みに寄与するタンパク質の内、幾つかは欠損時に個体に顕著な影響が顕れることが判っている。例えば、Uggt1やERp57のホモ欠損マウスは、詳細な解析は行われていないものの、交配後13.5日前後に死亡することが判っており、Sep15、Calr、Cnx等のホモ欠損マウスでも、様々な異常が顕れることが報告されている。これらのことから、個体レベルでTex264を欠損させた場合、何らかの表現型異常が顕れることが予想され、異常の詳細を解析することで、個体におけるTex264遺伝子の機能が明らかになると考え、Tex264欠損マウスの作出を試みた。
開始メチオニンの存在する第3エキソンを欠失させることで作出したTex264ヘテロ欠損個体は雌雄共に外観上正常で、生殖能力を保持していたが、Tex264ヘテロ欠損個体の雌雄を掛け合わせ、得られた個体の離乳後に遺伝子型判定を実施したところ、Tex264ホモ欠損個体は含まれておらず、全てが野生型もしくはTex264ヘテロ欠損個体であった。このことから、Tex264ホモ欠損個体は母体内での発生途中から離乳期までの間に死亡していると考え、致死の原因と性状

を調べる目的で交配後10.5日の時点で胚を回収し、観察と遺伝子型判定を実施した。その結果、全てのホモ欠損胚に全体の萎縮と眼胞の形成異常を中心とした形態異常が認められ、また、その内の殆どは交配後8.5日様の形態を示した。交配後10.5日の段階でTex264ホモ欠損胚に顕著な異常が認められたことから、Tex264遺伝子が発現されるのはより初期の時点であると考え、交配後6.5-9.5日の野生型胚を対象としたリアルタイムPCRを実施し、Tex264遺伝子の発現レベルの推移を調べた。その結果、交配後6.5日において最も高い発現レベルが検出され、以降、発生の進行に伴って発現レベルの低下が認められた。また、交配後6.5-7.5日の野生型胚を対象としたホールマウントin situハイブリダイゼーションを実施し、Tex264遺伝子の発現部位の同定を試みたところ、胚体外領域を中心として胚全体でシグナルが検出された。こうしたことから、Tex264ホモ欠損胚の異常が顕れ始めるのは交配後7.5日以前であると考え、交配後6.5-7.5日前後の胚を回収して観察したところ、primitive streak stage後期（交配後7.25-7.75日）までは外観上正常であったが、neural plate stage前期（交配後7.25-7.75）以降の胚では、胚の頭部側組織の萎縮と、これに伴う胚全体の頭部側への屈曲が観察された。頭部側組織の萎縮の原因がアポトーシスにあるのではないかと考え、ホールマウントTUNEL（TdT-mediated dUTP nick end labeling）染色を実施し、同時期の野生型胚と比較したところ、Tex264ホモ欠損胚の頭部側神経外胚葉とノード周辺では、同時期の野生型胚に見られないTUNEL陽性細胞が観察された。交配後10.5日時点で体全体の萎縮が認められたものの、neural plate stageにおいて頭部側の異常が顕著であったことと、頭部側神経外胚葉で多数のTUNEL陽性細胞が認められたことから、頭部の異常に着目してTex264ホモ欠損胚の解析を実施した。Tex264ホモ欠損胚の頭部周辺の異常はheadfold stage（交配後7.5-8.0日）以降になると更に顕在化し、somite stage（交配後8.0日-）のTex264ホモ欠損胚ではANR（anterior neural ridge)を含め、野生型胚の前脳にあたる領域の顕著な萎縮が認められた。前脳形成に寄与する遺伝子の発現状態を調べる目的で、somite stage前期の胚を用いたホールマウントin situ ハイブリダイゼーションを実施したところ、前脳形成において重要な役割を果たすANR（anterior neural ridge）、脊索前板、脊索、ノードは形成されているものの、前脳で発現され、その発生に寄与する遺伝子であるHesx1遺伝子の発現領域が縮小し、発現量にも減衰が認められた。これにより、neural plate stage前期（交配後7.25-7.75日）以降に発生した頭部側の萎縮は、前脳の萎縮を伴う、頭部形成異常につながることが明らかとなった。

本研究により、Tex264は小胞体に局在し、小胞体においてタンパク質折り畳みに寄与するタンパク質と相互作用することと、Tex264遺伝子が、pre-streak stage（交配後6.5日）以前の段階から胚体外領域を中心として胚全体で発現され、アポトーシスの抑制とHesx1遺伝子の転写活性化を介し、胚発生における頭部形成に寄与することが明らかとなった。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　高岡　匠　）			
論文審査担当者	（職）		氏　名
	主 査	教　授	花岡　文雄
	副 査	教　授	八木　健
	副 査	教　授	山本　亘彦
	副 査	准教授	白鳥　秀卓

論文審査の結果の要旨

本論文は、これまで機能が不明であったTex264の個体および細胞内における機能を明らかにすることを目的とした。アミノ酸配列の相同性より、Tex264は大腸菌のDNA ジャイレース阻害タンパク質であるGyrIと同様の機能をもつと予想されていたが、哺乳類のII型トポイソメラーゼを阻害せず、また核でなく小胞体に存在することが分かった。相互作用タンパク質を質量分析で調べた結果、Tex264は糖タンパク質と非糖タンパク質の両方の折り畳みに関与していることが示唆された。Tex264欠損マウスを作出してその個体における機能を解析しようとしたところ、Tex264ホモ欠損個体は胎生致死となり、交配後10.5日でTex264ホモ欠損胚に顕著な異常が認められた。また*Tex264*遺伝子が、pre-streak stage（交配後6.5日）以前の段階から胚体外領域を中心として胚全体で発現され、アポトーシスの抑制と*Hesx1*遺伝子の転写活性化を介し、胚発生における頭部形成に寄与することを明らかにした。以上の結果は、新規遺伝子についての新たなタンパク質機能、遺伝子欠損マウスを用いた*in vivo*での機能に新知見を得ており、学位の授与に値すると評価された。