

氏名(本籍)	むかい がさ かつ き 向 笠 勝 貴 (新潟県)
学位の種類	博 士 (医 学)
学位記番号	博 甲 第 6350 号
学位授与年月日	平成 24 年 11 月 30 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	Analysis of zebrafish mutant that endogenous stress is genetically induced (内在性ストレスを自然発症する突然変異ゼブラフィッシュの解析)
主 査	筑波大学教授 薬学博士 熊 谷 嘉 人
副 査	筑波大学講師 博士(理学) 塩 見 健 輔
副 査	筑波大学講師 博士(理学) 三 輪 佳 宏
副 査	筑波大学講師 博士(農学) 中 川 嘉

論 文 の 内 容 の 要 旨

(目的)

転写因子 Nrf2 は、多くの抗酸化酵素の発現を制御し、生体の恒常性維持のために重要な役割を担っている転写因子である一方で、内在性ストレスに対して活性化した Nrf2 がどのような役割を果たしているのかまだ不明な点が多い。本研究では、Nrf2 変異ゼブラフィッシュを作成して、本転写因子の生理的役割について検討した。

(対象と方法)

Nrf2 が常時活性化している突然変異ゼブラフィッシュ *pmm2^{Δ768}* 系統を用いて解析を行った。また、Nrf2 変異ゼブラフィッシュ *nrf2^{Δ318}* 系統は、TILLING 法により単離した。*nrf2^{Δ318}* 系統の解析に関して、幼魚を薬剤の含まれる飼育水中におくことで薬剤暴露を行い、その後、RT-PCR とホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによる遺伝子発現の解析や、生存率解析を行った。

(結果)

pmm2^{Δ768} 系統は糖鎖形成に関わる *pmm2* 遺伝子に変異を生じている系統である。表現型解析の結果、*pmm2* 遺伝子のスプライシングの異常、糖鎖形成不全、肝臓細胞におけるリソソーム残余体や脂肪滴の増加、摂食障害、小胞体シャペロン *bip* の遺伝子発現上昇が観察された。リソソーム残余体の増加に関しては、野生型の小胞体ストレス誘導剤処理個体でも同様に観察された。摂食障害に関しては、ヒト PMM2 の過剰発現により回復した。

TILLING 法による Nrf2 変異ゲノムのスクリーニングの結果、R485L の変異を持つ *nrf2^{Δ318}* 系統を単離した。*nrf2^{Δ318}* 系統では、Nrf2 活性化剤による標的遺伝子 *gstp1* の発現誘導が減弱していたが、通常状態では、野生型と変わらず発生、成長し、生殖も可能であった。また、過酸化処理に対する生存率が顕著に低く、過酸化水素に対して、*prdx1*、*gclc*、*txn1* などの抗酸化遺伝子の発現誘導が低下していた。

(考察)

pmm2^{Δ768} 系統は、*pmm2* 遺伝子のスプライシング異常、糖鎖形成異常、小胞体シャペロンの遺伝子発現上

昇が見られ、小胞体ストレスが亢進していると考えられた。*pmm2^{fl768}* 系統は Nrf2 が常時活性化している突然変異系統として単離されたが、Nrf2 活性化には小胞体ストレスが起因しているが示唆された。

TILLING 法により単離した *nrf2^{fl318}* 系統の解析により、Nrf2 変異ゼブラフィッシュは、発生や生殖には異常がないが、いくつかの抗酸化遺伝子の誘導が減弱しており、酸化ストレスに対して高い感受性を示した。Nrf2 ノックアウトマウスでも、類似の結果が見られることから、Nrf2 の機能は脊椎動物間で保存されていると考えられた。一方、Nrf のオルソログである線虫 Skn-1 やショウジョウバエ Cnc の変異は発生に異常を示すことから、脊椎動物と無脊椎動物では、Nrf が異なる進化をしてきたと予想された。

近年、神経変性疾患やメタボリックシンドロームなどの病態発症に対して、小胞体ストレスの関与が示唆されてきているが、これらの病態に対して、Nrf2 がどのような役割を担っているか、まだ不明な点が多い。この点の解明のため、*pmm2^{fl768}* 系統と *nrf2^{fl318}* 系統をさらに解析することで、今後有用な結果が得られることが期待される。

審査の結果の要旨

本研究の長所は、遺伝学を用いて、新たな変異系統を単離していることである。解析を行った突然変異ゼブラフィッシュ *pmm2^{fl768}* 系統は、Nrf2 標的遺伝子 *gstp1* の発現上昇を指標とした順方向遺伝学により単離された系統、*nrf2^{fl318}* 系統は逆方向遺伝学により単離された系統であり、これらは 2 系統とも新規の変異系統である。さらに、複数の解析系で、それぞれの系統の表現型も詳細に明らかにしている。しかし、*pmm2^{fl768}* 系統に関しては、その発症原因は多くの部分が不明のままである。糖鎖形成は生体内で広く行われているため、糖鎖形成不全により影響を受ける糖タンパク質を特定することは難しく、病態に至るまでのメカニズムを明らかにするためには、さらなる解析が必要と言えよう。また、*nrf2^{fl318}* 系統に関して、今回は単離した系統そのものの解析で終わらせている。*pmm2^{fl768}* 系統や、その他レポータートランスジェニックフィッシュなど、別の系統と組み合わせることで、Nrf2 の役割について、より多くの結果が得られることが期待されるので、今後の課題として *nrf2^{fl318}* 系統のさらなる活用が重要となると考えられる。

平成 24 年 10 月 10 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもと論文について説明を求め、関連事項について質疑応答を行い、最終試験を行った。その結果、審査委員全員が合格と判定した。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。