

氏名(本籍)	たか はし よし のり 高橋良徳(大分県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	博甲第3105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
審査研究科	農学研究科
学位論文題目	Studies on Mammalian Copper Chaperone, Cox17p (哺乳動物の銅シャペロン Cox17p に関する研究)
主査	筑波大学教授 農学博士 深水昭吉
副査	筑波大学教授 農学博士 馬場 忠
副査	筑波大学教授 農学博士 小林達彦
副査	筑波大学教授 理学博士 藤村達人

論文の内容の要旨

ミトコンドリアの酸化リン酸化によるATPの生成は内膜に存在する呼吸鎖電子伝達系で行われるが、その主体となるシトクロムcオキシダーゼ(CCO)はその活性発現に鉄や銅などの金属を必要とする。最近、銅イオンをそれを必要とする特定の酵素へと輸送する、銅シャペロンと呼ばれる分子群が酵母において相次いでクローニングされた。その中の一つである *cox17* は酵母の呼吸鎖欠損株より単離された遺伝子で、細胞質からミトコンドリアへと銅イオンを輸送し、CCOの活性発現に関与している。現在までに、ヒト、マウス、ラット及びブタなど哺乳動物においてもこの遺伝子のホモログが存在することが明らかとなっている。果たしてCox17pは哺乳動物細胞においてもミトコンドリアへの銅シャペロンとして機能しているのだろうか?本研究では、哺乳動物Cox17pの生理学的な機能を明らかにすることを目的とし、まず初めに①マウスCOX17遺伝子構造の決定、次に②その転写調節機構の解明、そして最後に③その遺伝子破壊マウスの作製および解析を試みた。

- ①129SvJマウス染色体DNAライブラリーよりCOX17遺伝子を単離しその構造と構成について検討を行った。その結果、この遺伝子は2つのイントロンで分断された3つのエキソンで構成され、マウス染色体上に単一コピーの遺伝子であることが明らかとなった。また、放射線ハイブリッドマッピング法を用いて染色体上の位置を調べた結果、COX17遺伝子はマウスにおいては16番染色体の中央付近(ヒトでは3番染色体長腕中央付近)に位置することが明らかとなった。また、最近CCO活性の著しい低下を伴うミトコンドリア脳筋症の患者の組織からCCOのassembly factorsの変異が相次いで報告されているが、これらの呼吸関連遺伝子との遺伝的連鎖は認められなかった。
- ②これまでにCox17p mRNAは心臓、腎臓、脳や骨格筋などの比較的エネルギー代謝の高い組織で強く発現していることが報告されている。このことはおそらく転写レベルで調節されていると考え、次に、この遺伝子のプロモーター領域の同定を試みた。まず、プライマー伸長法を用いてCOX17遺伝子の転写開始点を調べ、3つの転写開始点を同定した。次に、これらの転写開始点を含む5'上流領域についてレポーター遺伝子アッセイおよびゲルシフト分析を行い、この遺伝子のプロモーター領域の同定を試みた。その結果、ハウスキープ遺伝子の転写因子であるSplといくつかの呼吸関連遺伝子の転写因子として知られているNRF-1およびNRF-2がCOX17遺伝子の転写に重要な役割を果たしていることが明らかとなった。以上の結果より、COX17遺伝子は呼吸関連遺伝子に特徴的な転写制御を受けていることが示唆された。

③ *COX17* 遺伝子のプロモーター領域の解析により、この遺伝子は哺乳動物においても酵母同様、細胞呼吸に関与している可能性が強く示唆された。そこで次に、*COX17* 遺伝子破壊マウスの作製、解析を行い、この遺伝子の生理学的機能の解明を試みた。まず、全翻訳領域を含むエクソン 1 および 2 を緑色蛍光タンパク質 (GFP) およびネオマイシン耐性遺伝子で置換することにより *COX17* 遺伝子破壊マウスの作製を試みた。ヘテロ欠損マウスは *COX17p* mRNA の発現量が半減していたが、外見上は正常であった。このマウスの脳における CCO 活性は野生型の同腹子と比較して 20% 減少していたが、腎臓および骨格筋においては有為な差は認められなかった。一方、ホモ欠損マウスは胚齢 6.5 日以降発生の遅れが認められ、7.5 日から 8.5 日の間に致死となり、10 日までに母体に呼吸されて消失することが明らかとなった。そこで 6.5 日におけるホモ欠損胚の CCO 活性を調べた結果、その活性は消失していたが、他の呼吸関連遺伝子についていくつか調べたところ、全て正常であった。また、退縮した 8.5 日のホモ欠損胚の組織では核の凝集を伴った矮小細胞が多数認められたことから、*COX17* 遺伝子破壊による CCO の不活性化が原腸陥入期以降の発生を停止し、細胞死を促進した可能性が示唆された。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本研究では、真核細胞の細胞内銅輸送分子と考えられていた *Cox17p* に関して、その哺乳動物における機能を分子生物学的及び発生工学的手法を用いて解析している。*Cox17p* は、当初酵母のミトコンドリア電子伝達系のシトクロム c 酸化酵素 (CCO) の活性発現に必須な銅イオンを、細胞質からミトコンドリア内へ輸送する分子としてクローニングされたが、ごく最近になってその哺乳類ホモログの存在がいくつかの研究グループにより確認された。本研究では最初にマウス *COX17* 遺伝子の構造及び染色体上の位置を、次いでそのプロモーター領域を決定した。この過程で *COX17* 遺伝子は、他の CCO サブユニットや呼吸酵素の転写機構と同様に、転写因子 Sp1 及び NRF-1, 2 の制御下で基本転写が進行することが明らかとなった。さらに、本研究では個体レベルでの機能解析を行うために *COX17* 遺伝子破壊マウスの作成を試みた。その結果 *COX17* 遺伝子欠損をホモにもつ個体は、胎生 6.5 日までは著しい CCO 活性の低下を伴いながらも正常に発生が進行し、胎生 8 日前後で致死となった。この結果は、CCO に依存したエネルギー産生系が、原腸陥入期以降の発生過程に必須である可能性を世界で初めて示唆したものである。

以上のように、本研究は哺乳動物における *Cox17p* の生理機能を明らかにしたばかりでなく、胚発生におけるミトコンドリア電子伝達系の役割の重要性を示唆するものであり、単に細胞生物学のみならず発生生物学的にも与えるインパクトは大きいと判断する。

よって、著者は博士 (農学) の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。