

論文内容の要旨

申請者氏名 古川 智久

動物個体内で特定の細胞のみを除去する手法（細胞ノックアウト法）は、細胞の生理機能を解析する時や、細胞移植実験などに必要となる疾患モデル動物を作製する時に役立つ。そこで、動物個体内の特定の細胞のみを任意の時期に除去できる、ジフテリア毒素（DT）受容体を用いた細胞ノックアウト法（TRECK 法）が開発された。しかしながら TRECK 法では、増殖因子として働くヒト HB-EGF を標的細胞へ過剰発現させることで、トランスジェニックマウスの組織や個体に異常を生じる可能性が考えられる。また、プロテアーゼにより切断されたヒト HB-EGF は DT 受容体として機能しない。以上のことを考慮し、生化学的な実験や X 線結晶構造解析により報告されているアミノ酸の情報を利用し、DT 受容体機能を保持しつつ増殖因子活性を失い、プロテアーゼによる切断が起こらない変異型ヒト HB-EGF を作製することで、TRECK 法の改良を行うことを考えた。作製した変異型ヒト HB-EGF を培養細胞に導入して調べた結果、2 つの有効な変異体を得ることに成功した。そのうちの 1 つである I117A/L148V 変異型ヒト HB-EGF は、DT 受容体機能に関しては野生型に比べやや低下してはいるものの、増殖因子活性をほぼ完全に失った変異体であった。もう 1 つの I117V/L148V 変異型ヒト HB-EGF は、DT 受容体機能は野生型と同程度に保持しており、かつ増殖因子活性を大幅に低下した変異体であった。さらにこれら 2 つの変異体は、プロテアーゼによる切断に耐性を持っていた。次にこれら 2 つの変異型ヒト HB-EGF を用いてトランスジェニックマウスを作製したところ、トランスジーンを発現したマウスが得られる割合が高いことが示された。したがって、I117A/L148V または I117V/L148V の変異型ヒト HB-EGF は、TRECK 法に用いる毒素受容体として適していると結論した。

一方、脳細胞を標的として TRECK 法を用いる時は、DT が血液脳関門を通過できるかどうかが問題となる。DT 受容体をオリゴデンドロサイト特異的に発現するトランスジェニックマウスを作製し、TRECK 法を用いて脳細胞を特異的に除去することが可能であるかどうかを調べた。その結果、マウスの腹腔内に投与した DT は、特別な処置を行わなくても血液脳関門を通過し、毒素受容体を発現したオリゴデンドロサイト特異的に障害を与えることが示された。腹腔内への DT 投与量と脳内標的細胞への障害の程度との関連など検討すべき課題は残っているが、TRECK 法を用いて脳細胞を特異的に除去することは可能であると考えられる。

今後、本研究で作製した変異型ヒト HB-EGF を毒素受容体として利用することや、脳内の細胞も標的とすることで、TRECK 法を用いた研究の幅が広がることが期待される。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 古川 智久

ジフテリア毒素 (DT) 受容体を利用した標的細胞ノックアウト法 TRECK(toxin receptor-mediated cell knockout)は、細胞機能や細胞系譜の解析、ヒト疾患モデル動物の作製などに大変有用な方法であるが、毒素受容体としてヒトヘパリン結合性 EGF 様増殖因子(human Heparin-Binding EGF-like Growth Factor: hHB-EGF)を使用するため、野生型を用いる場合には毒素受容体活性だけでなく、本来の機能としての増殖因子活性をもっている。また hHB-EGF は細胞表層に発現されたのち、プロテアーゼにより切断され増殖因子として機能することが知られているが、毒素受容体として働く分子は膜貫通型 proHB-EGF のみである。TRECK 法においては、標的細胞に hHB-EGF を発現させ毒素受容体として機能させるため、増殖因子活性やプロテアーゼ感受性活性はできるだけ無いことが望ましい。申請者は、hHB-EGF にアミノ酸置換変異を導入し、増殖因子活性を欠失しプロテアーゼによる切断を受けず、かつ毒素受容体活性を維持している、いわゆる人工毒素受容体とでも呼ぶべき分子の作製を試みた。この変異導入の難しい点は、毒素受容体機能ドメインが EGF 様増殖因子ドメインと完全に重なることであった。申請者は毒素受容体としての機能に重要なアミノ酸、EGF 活性に重要なアミノ酸、などの過去の情報と hHB-EGF の立体構造を調べ、候補を 5 つのアミノ酸に絞り、種々のアミノ酸変異を導入し検討し以下の新知見を得た。

- 1) I117A/L148V 変異型 hHB-EGF は、DT 受容体能に関しては野生型に比べ 10 分の 1 に落ちているが、増殖因子活性は完全に失った変異体であった。
- 2) I117V/L148V 変異型 hHB-EGF は、DT 受容体能に関しては野生型と同程度であり、増殖因子活性は大幅に低下した変異体であった。
- 3) 上記 2 つの変異体はプロテアーゼに耐性型を示した。
- 4) これらの変異型 hHB-EGF と野生型 hHB-EGF とを用い、全身でこれらの毒素受容体を発現するトランスジェニックマウスを作製したところ、変異型 hHB-EGF を発現するマウスが野生型に比べ有意に高い比率で生まれてきた。これらの結果から上記 2 つの変異型毒素受容体は、TRECK 法における毒素受容体として理想的なものである。

以上のように、本論文は TRECK 法における理想的な毒素受容体を明らかにしたもので、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。