SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

Molecular Study on the Transcription Factors, Nkx2 and Pax8, and Clusterin Expressed in Endocrine Cells

メタデータ	言語: en 出版者: Shizuoka University 公開日: 2017-06-07 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: Sakamoto, Joe メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/10209

（課程博士・様式９）　　審　査　要　旨

専攻　バイオサイエンス　学籍番号　5544-4004　学生氏名　坂本　丞

論文題目 Molecular Biological Study on Transcription Factors, Nkx2 and Pax8, and Clusterin Expressed in Endocrine Cells（内分泌細胞に発現する転写因子 Nkx2 と Pax8 およびクラスタリンに関する分子生物学的研究）

本博士論文は，物質代謝や変態などに関与する甲状腺ホルモンおよびカルシウム代謝に関わるカルシトニンの合成機構の解明，ならびに魚類で鰓後腺とブロックマン小体（哺乳類の膵島に相当する器官）にタンパク質が検出されるクラスタリンの機能解析を目指した研究報告である。本研究では，まず転写因子 Pax8 について解析している。脊椎動物には 9 種類の Pax 遺伝子（Pax1～9）が存在するが，甲状腺ホルモンを分泌する甲状腺濾胞上皮細胞では，哺乳類において Pax8 が転写因子 Nkx2-1 と共に，甲状腺ホルモンの前駆体として働くチログロブリン(Tg)や甲状腺ホルモンの合成反応を触媒する甲状腺ペルオキシダーゼ(TPO)の転写活性を相乗的に亢進することが報告されている。本研究では，ニジマスの甲状腺に，通常の Pax8（Pax8a）と共に少なくとも 1 種類のスプライシング・バリアント（Pax8b）が発現することを明らかにした。さらに，ルシフェラーゼアッセイにより，Pax8a は Nkx2-1 と協調して TPO 遺伝子の転写を促進するが，Pax8b は転写促進能を持たず，Pax8a と Nkx2-1 の協調作用を抑制する可能性があることを示した。また，ゲルシフトアッセイにより，Pax8a と Pax8b がそれぞれ直接エンハンサーに結合することも確認した。本研究は，哺乳類以外で初めて Pax8 の甲状腺での機能を実証したものである。つぎに，本研究では Nkx2-4 と Nkx2-1 について解析を進めている。Nkx2 には 10 種類のサブタイプ（Nkx2-1～Nkx2-10）が存在するが，哺乳類では甲状腺濾胞上皮細胞とカルシトニン産生細胞の双方で Nkx2-1 が発現し，ホルモン産生の亢進に関与する。その一方，Nkx2-4 の機能は明確ではない。本研究により，ニジマスの甲状腺濾胞上皮細胞には 3 種類の Nkx2-4（a-c）が発現し，カルシトニンを分泌する鰓後腺には Nkx2-1 が発現していることが判明した。ルシフェラーゼアッセイにより，ニジマスの Nkx2-4a，Nkx2-4b，Nkx2-1 が Tg プロモーターからの転写を促進することを示し，さらにニジマス Nkx2-1 についてはカルシトニン遺伝子の転写を促進する可能性があることも示した。また，ゲルシフトアッセイにより，これらの転写因子がそれぞれ直接エンハンサーに結合することも確認した。本成果は，Nkx2-4 の機能を初めて明らかにした点，ならびに魚類では甲状腺ホルモンの合成に関与するのが Nkx2-1 ではなく Nkx2-4 であることを明示した点で意義深い。本成果により，脊椎動物の誕生後，当初は Nkx2-4 が甲状腺濾胞上皮細胞で甲状腺ホルモンの合成に関与し，Nkx2-1 が鰓後腺でカルシトニンの合成に関与していたが，哺乳類では Nkx2-1 が双方のホルモン合成に関与するように移行したという進化の道筋が初めて考察できるようになった。本研究では，さらに鰓後腺で発現量の多いクラスタリンについて解析を進めた。また，それに関連して，クラスタリン変異メダカを選別するための技術開発も行っている。クラスタリンは哺乳類では多様な機能が報告されているが，その本質的な機能は不明である。本研究では，蛍光免疫染色により，モデル生物であるメダカでクラスタリン・タンパク質が鰓後腺とブロックマン小体に存在することを示した。この結果は，ニジマスでの知見と一致しており，多くの魚類でクラスタリンがこれらの内分泌器官で分泌されていることを示唆するものである。本研究では，TILLING 法により得られたクラスタリン・ヘテロ変異体メダカを交配して，ホモ変異体メダカを作出した。さらに，変異体を選別する際に有効な HRM（高解像度融解温度曲線解析）法を改良し，ホモ変異体も簡便に選別できる手法を開発した。本成果は，クラスタリンの機能解析ならびに変異体の選別一般に大きく貢献するものと考えられる。

なお，本博士論文の内容の一部は，既に国際的学術雑誌に掲載されている。坂本氏の氏名は第２番目に記載されているが，ゲルシフトアッセイを行ったり論文を作成したりするなど第一著者と貢献度が同等（equally contributed）である。

以上のことから，本論文は博士（理学）の学位を授与するに値するものと認められる。