



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

ニワトリ胚神経管および心臓形成におけるFK506結合タンパク質12の役割に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2008-02-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 小畑, 孝二 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/2579

氏名(本国籍)	小畑孝二(岐阜県)
学位の種類	博士(農学)
学位記番号	農博甲第238号
学位授与年月日	平成14年3月13日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科及び専攻	連合農学研究科 生物生産科学専攻
研究指導を受けた大学	信州大学
学位論文題目	ニワトリ胚神経管および心臓形成におけるFK506 結合タンパク質12の役割に関する研究
審査委員会	主査 信州大学 教授 佐々木 晋 一 副査 信州大学 教授 小野 珠 乙 副査 静岡大学 教授 森 誠 副査 岐阜大学 教授 上 吉 道 治

論文の内容の要旨

免疫抑制剤として知られているFK506、サイクロスポリンAおよびラバマイシンは、細胞内のイムノフィリンと総称されるタンパク質に結合する。サイクロスポリンAはサイクロフィリンに、FK506およびラバマイシンはFK506結合タンパク質(FKBP)12と結合し、免疫抑制作用を発揮するとされている。FKBPに属するファミリーはpeptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase活性を有し、FK506およびラバマイシンと結合することにより、その活性は抑制される。FK506-FKBP12の複合体はCa²⁺-カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの活性を抑制し、T細胞の分化増殖因子の一つであるインターロイキン2等のサイトカインの産生を阻害する。一方、ラバマイシン-FKBP12の複合体はセリン-スレオニンキナーゼであるFKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) やrapamycin and FKBP12 target 1 (RAFT1) に結合し、T細胞の細胞増殖を抑制する。

しかし、ほとんどのFKBPファミリーは各臓器に偏在しており、多くのシグナル伝達系に関与していると考えられ、その働きの詳細は明らかではない。そこで本研究では、ニワトリ胚およびこれの初代培養心筋細胞を用いて、FKBP12の胚発生における役割の解明をめざした。

本研究においてニワトリFKBP12遺伝子を同定した。得られたニワトリFKBP12cDNAをプローブとするとサイズの異なるふたつの転写産物が現れた。免疫組織化学により、中隔膜、内膜側、心筋層における局在が示された。胚へのFKBP12投与は、孵卵7日以前の胚では致死的であり、孵卵7および9日胚では顕著な心腔の拡大と心室壁の菲薄化がみられ、ヒトの拡張型心筋症様を呈した。組織学的には、拡張型心筋症でみられるような線維化は認められず、間質には糖タンパク質の沈着が観察された。しかし、サイクロスポリンAあるいはラバマイシンを投与した胚では胚発生および心臓形成における影響は認められなかった。初代培養心筋細胞へのFK506投与は明らかな細胞増殖及び細胞間連絡網形成の抑制、筋特異的タン

バク質であるミオシン等の減少を示した。以上の結果から、ニワトリ胚発生における心筋細胞の収縮弛緩あるいは形質発現の調節機構において、FKBP12が重要な役割を持つことが示唆された。

さらにニワトリ胚初期発生におけるFKBP12mRNAの局在をホールマウントin situハイブリダイゼーション法により調べた。心臓原基、体節、神経管に強いシグナルが得られ、特に神経管では左右の神経褶が融合し管を形成する部位に多く局在していることを明らかにした。そこで、FKBP12特異的抑制剤であるFK506とラパマイシンを孵卵約24時間胚に投与したところ、神経管形成欠損、体節の凝集の異常および胚の軸形成の遅延等の異常が観察された。しかし、FK506投与した胚では影響は認められなかった。以上の結果から、ニワトリ胚発生においてFKBP12が神経管形成に深く関与していることが想定され、ラパマイシンによる神経管形成の異常を主とした胚発生への影響は、ラパマイシン・FKBP12の複合体の形成によるFRAPやRAFT1のシグナル伝達系の障害によるものであることが推測された。

本研究の結果から、ニワトリ胚発生においてFKBP12は神経胚形成と心筋細胞の形質発現を調節する因子の一つと考えられた。FKBP12ノックアウトマウスでは拡張型心筋症様の症状や心室中隔壁欠損等、心臓の異常や神経管形成の異常を示すなどの報告がある。それらの結果は本研究と一致しており、FKBP12の胚発生における役割の重要性が示唆された。本研究はFKBP12の胚発生における神経管および心臓形成における役割を中心としたが、FKBP12は様々なタンパク相互作用に関わり、細胞内シグナル伝達系を調節する因子であると考えられ、その働きの解明は畜産学だけでなく基礎生物学、医学薬学等においても必須と思われる。本研究による新知見は、今後の研究に不可欠な基盤となるはずである。

審 査 結 果 の 要 旨

平成14年1月30日(水)に信州大学農学部において審査委員を含む関連教官、学生の出席のもと、小畑孝二氏の博士論文公開発表会が行われ、引き続き質疑応答が行われた。小畑孝二氏の博士論文の概要は以下のように要約される。免疫抑制剤として知られているFK506、サイクロスポリンAおよびラパマイシンは、細胞内のイムノフィリンと総称されるタンパク質に結合する。サイクロスポリンAはサイクロフィリンに、FK506およびラパマイシンはFK506結合タンパク質(FKBP)12と結合し、免疫抑制作用を発揮するとされている。FKBPに属するファミリーはpeptidyl-prolyl *cis-trans* isomerase活性を有し、FK506およびラパマイシンと結合することにより、その活性は抑制される。FK506-FKBP12の複合体はCa²⁺-カルモデュリン依存性脱リン酸化酵素であるカルシニューリンの活性を抑制し、T細胞の分化増殖因子の一つであるインターロイキン2等のサイトカインの産生を阻害する。一方、ラパマイシン-FKBP12の複合体はセリン-スレオニンキナーゼであるFKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) やrapamycin and FKBP12 target 1 (RAFT1) に結合し、T細胞の細胞増殖を抑制する。

しかし、ほとんどのFKBPファミリーは各臓器に偏在しており、多くのシグナル伝達系に関与していると考えられ、その働きの詳細は明らかではない。そこで本研究では、ニワトリ胚およびこれの初代培養心筋細胞を用いて、FKBP12の胚発生における役割の解明をめざした。

本研究においてニワトリFKBP12遺伝子を同定した。得られたニワトリFKBP12cDNAをプローブとするとサイズの異なるふたつの転写産物が現れた。免疫組織化学により、中隔膜、内膜側、心筋層における局在が示された。胚へのFKBP12投与は、孵卵7日以前の胚では致死的であり、孵卵7および9日胚では顕著な心腔の拡大と心室壁の菲薄化がみられ、ヒトの拡張型心筋症様を呈した。組織学的には、拡張型心筋症でみられるような線維化は認められず、間質には糖タン

パク質の沈着が観察された。しかし、サイクロスポリンAあるいはラパマイシンを投与した胚では胚発生および心臓形成における影響は認められなかった。初代培養心筋細胞へのFK506投与は明らかな細胞増殖及び細胞間連絡網形成の抑制、筋特異的タンパク質であるミオシン等の減少を示した。以上の結果から、ニワトリ胚発生における心筋細胞の収縮弛緩あるいは形質発現の調節機構において、FKBP12が重要な役割を持つことが示唆された。

さらにニワトリ胚初期発生におけるFKBP12mRNAの局在をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べた。心臓原基、体節、神経管に強いシグナルが得られ、特に神経管では左右の神経褶が融合し管を形成する部位に多く局在していることを明らかにした。そこで、FKBP12特異的抑制剤であるFK506とラパマイシンを孵卵約24時間胚に投与したところ、神経管形成欠損、体節の凝集の異常および胚の軸形成の遅延等の異常が観察された。しかし、FK506投与した胚では影響は認められなかった。以上の結果から、ニワトリ胚発生においてFKBP12が神経管形成に深く関与していることが想定され、ラパマイシンによる神経管形成の異常を主とした胚発生への影響は、ラパマイシン-FKBP12の複合体の形成によるFRAPやRAFT1のシグナル伝達系の阻害によるものであることが推測された。

本研究の結果から、ニワトリ胚発生においてFKBP12は神経胚形成と心筋細胞の形質発現を調節する因子の一つと考えられた。FKBP12ノックアウトマウスでは拡張型心筋症様の症状や心室中隔壁欠損等、心臓の異常や神経管形成の異常を示すなどの報告がある。それらの結果は本研究と一致しており、FKBP12の胚発生における役割の重要性が示唆された。本研究はFKBP12の胚発生における神経管および心臓形成における役割を中心としたが、FKBP12は様々なタンパク相互作用に関わり、細胞内シグナル伝達系を調節する因子であると考えられ、その働きの解明は畜産学だけでなく基礎生物学、医学薬学等においても必須と思われる。本研究による新知見は、今後の研究に不可欠な基盤となるはずである。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合農学研究科の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

「基礎となる学術論文」

1. Obata, K., Koide, M., Nagata, K., Iio, A., Yazawa, S., Ono, T., Yamada, Y., Tuan, R. S., and Yokota, M. (2001) Role of FK506-binding protein 12 in development of the chick embryonic heart. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283, 613-620.
2. Obata, K., Koide, M., Nagata, K., Iio, A., Yazawa, S., Ono, T., Sasaki, S., Yamada, Y., Tuan, R. S., and Yokota, M. (2002) Effects of FK506 and rapamycin on formation of the neural tube in chick embryos. *Animal Science Journal*, in press.