

学位論文内容要旨

論文題目

Title

Construction of a novel system for detecting inducible nuclear translocation

邦題

新しい刺激誘導性核移行の検出システム

指導(紹介)教授: 加藤 宏司

申請者氏名: 星野 明美

要旨

[目的]

ホルモンやサイトカインなどの細胞外情報伝達物質の多くは細胞表面の特異的受容体に結合することで、細胞の増殖や分化、機能発現を制御している。

受容体活性化は多くの場合、核内での遺伝子発現に影響を与える。細胞膜近傍付近での受容体活性化が核内事象の制御につながるには、細胞質から核内へのシグナル分子の移動が必須であり、多くのシグナル伝達系で転写因子や蛋白質リン酸化酵素などが細胞質から核へ移行することが知られている。

本論文では、核へ移行するシグナル伝達分子の同定と移行機序の解明を目的として、誘導性核移行トラップ (Inducible Translocation Trap: ITT) システムを構築した。

[方法]

① Inducible Translocation Trap (ITT) システムの構築

LexA DNA結合ドメイン (LexA DB)、転写活性化因子の転写活性化ドメイン、そして、解析対象蛋白から成る融合蛋白を発現するレトロウイルス・ベクターを作成した。

次いでLexA結合部位を発現制御領域に含むレポーター遺伝子を作成した。

② 解析用培養細胞への遺伝子導入

①で作成したレポーター遺伝子を解析用培養細胞のゲノム中に組み込み、さらに解析対象蛋白を発現するレトロウイルス・ベクターを遺伝子導入した。

③ フローサイトメトリーによる解析

解析蛋白が刺激誘導性の核移を行うと、先のレポーター遺伝子の発現が開始され、レポーター蛋白が細胞膜表面に発現する。このレポーター蛋白をフローサイトメトリーを用いて検出した。

[結果]

このITTのシステムを用いて、まず初めに、IFN γ 刺激による転写因子Stat1の核移行の検討を行い、ITTシステムによってStat1の核移行を感度良く検出することを確認した。

また、このシステムの信頼性と汎用性を確認するため、TGF β 刺激による転写因子Smad3の核移行についても検討を行い、Smad3の核移行もITTシステムを用いて検出できることを確認した。

さらに、このシステムの応用として、①のレトロウイルス・ベクターを用いたcDNAライブラリーを作成し、フローサイトメトリーを使用したcDNAスクリーニングの系を作成した。その結果、IFN γ 刺激によって核に移行する分子として、Stat1の遺伝子を単離することに成功した。

ITTは様々な生物系で動的な核移行メカニズムを解き明かすための有効な手段となり得ると考える。

平成 17 年 2 月 31 日

山形大学大学院医学系研究科長 殿

学位論文審査結果報告書

申請者氏名： 星野 明美


論文題目： 新しい刺激誘導性核移行の検出システム

Construction of a novel system for detecting inducible nuclear translocation

審査委員：主審査委員

遠 藤 政 夫 

副審査委員

倉 智 博 久 

副審査委員

藤 井 順 逸 

審査終了日：平成 17 年 2 月 27 日

【論 文 審 査 結 果 要 旨】

細胞の増殖や分化をはじめとする核内遺伝子調節機構は、種々のホルモンやサイトカインなどの細胞外情報伝達物質の細胞膜表面特異的受容体への結合によってトリガーされる。受容体活性化による遺伝子発現は細胞質内から核内へのシグナル分子の移動により仲介される。従って個々の受容体に特有のシグナル伝達機構活性化による転写因子やタンパクリン酸化酵素の細胞質から核内への移行シグナルを把握することは遺伝子レベルにおける調節機構解明の最重要過程のひとつである。

星野明美氏は細胞質シグナル伝達分子の核内移行の同定とその機序解明を目的として新しい実験方法である誘導性核移行トラップ (Inducible Translocation Trap: ITT) システム構築をめざして実験を施行した。ITT システムは、2つの要素すなわち (1) 融合タンパク発現ベクター (Lex A DB: LexA DNA 結合ドメイン; 転写活性化因子の転写活性化ドメイン; 解析対象タンパク); (2) レポーター遺伝子 (発現制御領域に LexA 結合部位をもつ) から構成される。ある細胞外情報伝達物質によって、解析対象タンパクが細胞質から核内に移行するとき、ゲノム中に (2) を挿入した培養細胞に (1) を遺伝子導入すると刺激依存性に融合タンパクが核内へ移行し、LexA の結合部位への LexA DB 結合を介してレポーター遺伝子発現が誘導される。このレポーター遺伝子の発現をフローサイトメトリーの方法で検出する。

星野氏は、この ITT システムを用いて、先ず既知の誘導性核移行分子の刺激依存性核移行を検出できることを確認した。すなわち、BL2 細胞において、インターフェロン γ (INF γ) が、hCD2 レポーター遺伝子を発現させること、また ITT システムは INF γ -Stat1 系および TGF β -Smad2/3 系で核移行シグナル検出の有用な方法であることを示した。さらに、(1) のレトロウイルス・ベクターを用いて cDNA ライブラリーを作成し、フローサイトメトリーで検出しうる DNA スクリーニング系を作成し、INF γ による刺激に反応して核内に移行する分子として Stat1 の遺伝子を単離することに成功した。

本研究では分子生物学における遺伝子調節の機構に関する最新の実験方法の構築をめざして実験は慎重に実施されており、構築された新しい実験法は核移行シグナルの解析に非常に有効なストラテジーとなり得るものと考えられる。従って、学位審査委員会は、本論文が博士 (医学) の学位取得に値すると判定した。

(1,200 字以内)