




## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 (課)・論	第 4 3 4 号	氏 名	中 村 憲一郎
審 査 委 員 会 委 員	主査氏名	津 村 弘	
	副査氏名	三 股 浩 光	
	副査氏名	松 尾 哲 孝	
<p>Induction of GNE in Myofibers after Muscle Injury. (筋障害後の筋線維における GNE の誘導) Pathobiology 2010; 77: 191-199.</p> <p>【背景・目的】 GNE はシアル酸生合成酵素として知られており、正常マウス組織ではユビキタスに発現している。GNE の変異によって縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーを発症することが知られているが、障害時及び再生時の筋線維における生理的 GNE 発現については明らかにされていない。マウスの筋に障害を与え、障害時と再生時の筋線維における GNE の発現について調べた。</p> <p>【方法】 培養細胞からクローニングしたヒト GNE 遺伝子を用いて、大腸菌発現系で、それぞれ epimerase ドメインあるいは kinase ドメインを含む 2 個の GST 融合組換え蛋白質を作製した。それらをウサギに免疫し、得られた血清を精製して、抗 GNE ポリクローナル抗体 (抗 GNE-E 抗体、抗 GNE-K 抗体) を作製した。C57BL/6 マウス (雄) の右腓腹筋に、cardiotoxin (CTX) を筋注後、1, 2, 4, 7 日後に腓腹筋を採取し、凍結組織標本及び 4% paraformaldehyde 固定・パラフィン包埋 標本作製した。免疫組織化学、免疫電顕、ウエスタンブロッティングを行い、GNE 蛋白質の発現と局在を調べた。Laser-capture microdissection (LCM) を用いて凍結組織切片から障害筋線維あるいは再生筋線維及び対照として同一切片の非障害筋線維を採取し、定量的 RT-PCR を行って GNE 遺伝子発現量を測定した。</p> <p>【結果】 作製した 2 つの抗 GNE 抗体は GNE を特異的に認識した。免疫組織化学では、正常筋線維において GNE は <math>\alpha</math>-アクチニンと共局在しており、過去の報告に合致した。免疫電顕では、GNE は Z-line と I-band に局在を認めた。本抗体を用いて CTX 障害筋モデルにおける GNE の発現を調べた。CTX 筋注 1 日後及び 2 日後では、デスミン陰性の障害筋線維において GNE が強陽性であり、ウエスタンブロッティングでは GNE 蛋白質量の増加を認めた。CTX 筋注 4~7 日後では、成熟筋線維と比較して再生筋線維において GNE が強く染色された。免疫電顕では、再生筋線維の核において、GNE は核小体とヘテロクロマチン領域に局在を認めた。LCM を用いて採取した障害筋線維及び再生筋線維では GNE 遺伝子発現が亢進しており、障害筋線維及び再生筋線維において GNE が誘導されることを確認した。</p> <p>【考察】 障害筋線維及び再生筋線維において GNE の発現誘導は、CTX 障害に特異的な現象ではない。障害筋線維では、GNE 蛋白質の分解は少なくともデスミンより遅いと推察された。再生筋線維では neural cell adhesion molecule (NCAM) がポリシアル化されるが、NCAM のポリシアル化は GNE によって調節されることから、GNE はシアル酸調節に関与している可能性がある。GNE が転写抑制因子である PLZF と結合するという報告があり、再生筋線維の成熟と共に GNE が核に集積する知見から、シアル酸生合成酵素としての機能とは別に、再生筋線維の核内で転写調節因子として機能している可能性が示唆された。</p> <p>GNE の役割はまた不明な点も多いが、本大学で継続的に行なわれている研究で、今後の発展が期待でき、審査委員の合議により本論文は学位論文に値するものと判定した。</p>			

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 中村 憲一郎

## 論 文 題 目

Induction of GNE in myofibers after muscle injury (筋障害後の筋線維における GNE の誘導)

## 要 旨

【背景・目的】 GNE はシアル酸合成酵素として知られており、正常マウス組織ではユビキタスに発現している。GNE の変異によって縁取り空胞を伴う遠位型ミオパチーを発症することが知られているが、障害時及び再生時の筋線維における生理的 GNE 発現については明らかにされていない。GNE の骨格筋における生理機能を理解する目的で、マウスの筋に実験的に障害を与え、障害時と再生時の筋線維における GNE の発現について調べた。

【方法】 培養細胞からクローニングしたヒト GNE 遺伝子を用いて、大腸菌発現系で、それぞれ epimerase ドメインあるいは kinase ドメインを含む 2 個の GST 融合組換え蛋白質を作製した。それらをウサギに免疫し、得られた血清をアフィニティ精製して、抗 GNE ポリクローナル抗体 (抗 GNE-E 抗体、抗 GNE-K 抗体) を作製した。C57BL/6 マウス (雄) の右腓腹筋に、cardiotoxin (CTX) を筋注射後、1, 2, 4, 7 日後に腓腹筋を採取し、凍結組織標本及び 4% paraformaldehyde 固定・パラフィン包埋

標本を作製した。免疫組織化学、免疫電顕、ウェスタンブロッティングを行い、GNE 蛋白質の発現と局在を調べた。Laser capture microdissection (LCM) を用いて凍結組織切片から障害筋線維あるいは再生筋線維及び対照として同一切片の非障害筋線維を採取し、定量的 RT-PCR を行って GNE 遺伝子発現量を測定した。

【結果】作製した抗 GNE 抗体は両者とも *in vitro* において GNE を特異的に認識し、マウス筋組織から抽出した蛋白質を用いたウェスタンブロッティングで約 79kDa の高さに GNE 蛋白質を検出した。免疫組織化学では、正常筋線維において GNE は  $\alpha$ -アクチニンと共局在しており、過去の報告に合致した。免疫電顕では、GNE は Z-line と I-band に局在を認めた。本抗体を用いて CTX 障害筋モデルにおける GNE の発現を調べた。CTX 筋注 1 日後及び 2 日後では、デスミン陰性の障害筋線維において GNE が強陽性であり、ウェスタンブロッティングでは GNE 蛋白質量の増加を認めた。CTX 筋注 4~7 日後では、成熟筋線維と比較して再生筋線維において GNE が強く染色された。細胞質に対する核の GNE の染色性は、CTX 筋注 4 日後と比較して 7 日後の方が強かった。免疫電顕では、再生筋線維の核において、GNE は核小体とヘテロクロマチン領域に局在を認めた。免疫組織化学における抗 GNE 抗体の反応は抗原吸収実験によって特異的反応であることを確認した。LCM を用いて採取した障害筋線維及び再生筋線維では GNE 遺伝子発現が亢進しており、障害筋線維及び再生筋線維において GNE が誘導されることを確認した。

【考察】障害筋線維及び再生筋線維において GNE の発現誘導は、ドライアイス障害筋においてもみられたことから、CTX 障害に特異的な現象ではなく、様々な筋障害でみられる現象であることが示唆される。こうした GNE の発現誘導は遺伝子発現レベルで調節されていると考えられる。障害筋線維では蛋白質分解が亢進しておりデスミンは速やかに分解されるが、GNE 蛋白質の分解は少なくともデスミンより遅いと推察される。再生筋線維では neural cell adhesion molecule (NCAM) がポリシアル化されるが、NCAM のポリシアル化は GNE によって調節されることから、再生筋線維において GNE はシアル酸調節に預かっている可能性が示唆される。GNE が転写抑制因子である PLZF と結合するという報告があり、再生筋線維の成熟と共に GNE が核に集積する知見から、シアル酸生合成酵素としての機能とは別に、GNE は再生筋線維の核内で転写調節因子として機能している可能性が示唆される。

【結論】GNE は筋の障害及び再生過程において誘導される。