

審査の結果の要旨

氏名 吉田 賢弘

本研究は腎臓発生に関与していると考えられている先天性腎尿路異常 (CAKUT) の原因遺伝子である CBWD1 の機能解析を試みたものであり、下記のような結果を得ている。

1. 胎生 12.5 日と Adult の野生型マウスと *Cbwd1* ノックアウトマウス (*Cbwd1*<sup>-/-</sup>) の各種臓器から mRNA を抽出し、逆転写して cDNA を作成した。qPCR を行ったところ、各種臓器で *Cbwd1*<sup>-/-</sup> の *Cbwd1* の発現が低下し、*Cbwd1 mRNA* が各種臓器で発現することが示された。また、胎生 11.5 日の腎臓でも同様に qPCR を行ったところ *Cbwd1*<sup>-/-</sup> で *Cbwd1* の発現が低下し、*Cbwd1 mRNA* が E11.5 の腎臓に発現することが分かった。また、発生期の腎臓における *Cbwd1* の発現部位を同定するため生後 0 日のマウスの胎仔腎で連続切片を作成し、抗 CBWD1 抗体で免疫染色を行ったところ、*Cbwd1* は尿管芽の細胞核に発現していた。
2. 培養細胞内での HA-CBWD1 の発現部位を同定するため HCT116 細胞に強制発現させ、免疫染色を行ったところ、HA-CBWD1 は細胞質主体に発現し、一部が細胞核に発現していた。Flag-GATA3 を強制発現させても HA-CBWD1 の局在は変化しなかった。
3. HA-CBWD1 ベクターと Flag-GATA3 ベクターを HCT116 細胞に共発現させ、Flag ビーズを用いて免疫沈降を行ったところ HA-CBWD1 と Flag-GATA3 は生化学的に結合していることが分かった。そこで、結合が直接的であるかを評価するため、GST 融合 CBWD1 と His 融合 GATA3 を作成し、Pull-down Assay を行った。すると、CBWD1 と GATA3 が直接結合することが示された。次に CBWD1 の結合部位を解析した。CBWD1 はモチーフ解析で DNA-binding domain と COBW domain を有するため、それぞれを削除したベクターを作成した ( $\Delta$  Head、 $\Delta$  Nuc、 $\Delta$  Cobw)。変異ベクターと野生型ベクターを HCT116 細胞に共発現させて Flag ビーズを用いて免疫沈降を行ったところ、 $\Delta$  Head と  $\Delta$  Cobw では結合に変化は認めなかったことから、DNA-binding domain が GATA3 との結合に関与している可能性が考えられた。
4. E14.5 の野生型マウスから胎仔腎を採取して抗 GATA3 抗体、抗 CBWD1 抗体でクロマチン免疫沈降 (ChIP) を行った。次に ChIP 産物に対して、マウスの *Ret* プロモーター領域の GATA エlement 配列を含むプライマーを設計し、qPCR を行った。すると、

GATA3、CBWD1 の複合体が GATA エlement配列を含む領域に *in vivo* で結合することが明らかとなった。

5. CBWD1 が *RET* の転写活性を調節するかを調べるためにルシフェラーゼアッセイを行った。GATA エlement配列を含む *Ret* のプロモーター領域を pGL3 ベクターに導入したレポーターベクター (pGL3-*Ret*) を用いてアッセイを行い、Flag-GATA3 投与下に *Ret* のルシフェラーゼ活性が平均 2.19 倍 (SD 0.091) 亢進した ( $P < 0.001$ )。次に GATA エlement配列に点変異を導入した (Mut pGL3-*Ret*) レポーターベクターを用いてアッセイを行ったところ、Flag-GATA3 投与下でも *Ret* のルシフェラーゼ活性が平均 1.18 倍 (SD 0.090) と亢進しなかった ( $P = 0.082$ )。次にこの pGL3-*Ret* と HA-CBWD1、Flag-GATA3 を共発現させて解析を行った。Flag-GATA3 単独で *Ret* のルシフェラーゼ活性は平均 1.46 倍 (SD 0.11) 亢進した ( $P < 0.001$ ) が、HA-CBWD1 単独では *Ret* のルシフェラーゼ活性は亢進しなかった ( $P = 0.57$ )。HA-CBWD1 と Flag-GATA3 と共発現させることでルシフェラーゼ活性が平均 1.75 倍 (SD 0.29) と更に増幅された ( $P = 0.013$ )。同様の実験を Mut pGL3-*Ret* でも行ったが、Flag-GATA3 による *Ret* のルシフェラーゼ活性の亢進、および HA-CBWD1 と Flag-GATA3 の共発現によるルシフェラーゼ活性の増幅は認められなかった。上記結果から *Cbwd1* 単独では *Ret* の転写活性を調節しないが、*Gata3* と共発現することにより *Gata3* の *Ret* 転写活性を正に調節することが明らかとなった。
6. *Ret* mRNA を評価するため qPCR を行った。E11.5、E12.5、E14.5 の野生型マウスと *Cbwd1*<sup>-/-</sup> の腎臓を採取し、qPCR を行ったが、いずれも *Gata3*、*Ret* の mRNA は有意差を認めなかった。
7. 蛋白質レベルでの *Ret* 発現の変化を評価するために E11.5、E14.5 の野生型マウスと *Cbwd1*<sup>-/-</sup> の腎臓を抗 *Ret* 抗体で染色した。いずれも *Ret* の発現に明らかな差は認められなかった。

以上、本論文は CAKUT の原因遺伝子である CBWD1 について培養細胞およびノックアウトマウスを用いて分子メカニズムの解析を行い、腎発生に関与する転写因子である GATA3 の cofactor として RET の転写活性を正に制御している可能性を明らかにした。本研究は腎発生の主要シグナルである GDNF-RET signal pathway の解明に重要な貢献をなすと考えられる。

よって本論文は博士 (医学) の学位請求論文として合格と認められる。