

学位論文題名

Genetic and Developmental Study
of Tattered^{hokkaido} (*Td^{ho}*) mouse

[Tattered^{hokkaido} (*Td^{ho}*) マウスにおける遺伝学および発生学的研究]

学位論文内容の要旨

遺伝性疾患マウスが、系統維持過程において偶然発見された。本疾患マウスは皮膚に痂皮が生じ、優性・伴性遺伝を示して雄個体が生まれないという特徴を持つことから原因遺伝子がX染色体上に存在するものと推定された。しかし、詳細な遺伝子解析は行われていなかったため、初めにマイクロサテライトマーカ遺伝子を利用して本疾患マウスのX染色体上での位置を解析した。その順序は、X染色体のセントロメア側から(*Tdho*, *DXMit26*, *DXMit55*, *DXMit123*)-*DXMit161*-*DXMit54*-*DXMit103*-*DXMit52*-*DXMit190*-*DXMit138*であった。このマウスの遺伝子の位置と臨床症状が*Td*マウスと類似していることから、複対立遺伝子 *Tdho* と名付けた。*Td*マウスはX線照射により人為的に誘導された変異であるが、*Tdho*マウスは自然発症変異という違いがある。

発生学的に異常雄胎子は12.5日目で正常胎子と同様に生存していたが、14.5日目には死亡していた。雄胎子を組織学的に観察し致死の原因を検討した。さらに *Tdho* の異常に関連する遺伝子群を解明する目的で、妊娠12.5日目の正常雄個体と異常雄個体とを用いPCR-select cDNA サブトラクション法を行なった。N-M群(正常cDNAから異常cDNAを引いた群)から得られた88クローン中、6クロンの胎子ヘモグロビン関連遺伝子(zetaおよびepsilon hemoglobins)が検出された。一方、M-N群(異常cDNAから正常cDNAを引いた群)の88クローン中、19クロンの成熟ヘモグロビン関連遺伝子(alphaおよびbeta hemoglobins)が検出された。二つの群で同一遺伝子は検出されなかった。またグロビン遺伝子のノーザン解析の結果、正常雄個体と異常雄個体の間で胎子および成熟ヘモグロビン遺伝子に明らかな発現差が認められた。さらに組織学的検索から、12.5日目の異常雄

胎子で胎子型赤血球の細胞死が観察された。以上の所見から、血球形成異常が *Tdho* マウス雄胎子に生じていることが推察された。

Tdho の複対立遺伝子である *Td* の原因が *Ebp* (Emopamil binding protein) の変異によると同定されたことから、*Tdho* の原因遺伝子も *Ebp* であると考え、その可能性を検討した。*Tdho* マウスの *Ebp* 遺伝子には 2 箇所の点突然変異が検出され、EBP の第 3 番目膜通過部位の 2 つのアミノ酸が置換していることが認められた。すなわち、132 番の leucine が proline に、133 番の serine が cysteine に置換していた。ノーザンブロット解析により、*Ebp* 遺伝子の発現量は正常胎子と異常胎子の間で差は認められなかった。このことから、*Tdho* マウスの EBP は機能欠損タンパクであると推定された。ガスクロマトグラフィーを用いた解析から、正常雌個体の血液中には通常検出されない cholesterol の中間代謝産物である cholest-8(9)-en-3 β -ol が、*Tdho* 異常雌個体に蓄積していることが明らかにされた。一方、cholesterol と 7-dehydrocholesterol の濃度は正常雌個体と異常雌個体の間で差がなかった。以上の結果に基づき、雄異常胎子の致死と血球異常、雌異常個体の痂皮との関連を議論した。

人の疾患である X-linked chondrodysplasia punctata (CDPX2) も最近 *Ebp* 遺伝子の変異に起因することが報告され、その臨床症状が *Tdho* マウスのように皮膚に痂皮が生じ、優性・伴性遺伝を示して雄個体が生まれないという特徴を持つことが報告された。CDPX2 と *Tdho* マウスの原因遺伝子の一致と臨床症状も似ていることから、*Tdho* マウスはヒトの本疾患の有用なモデルマウスであると今後期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 辺 智 正

副 査 教 授 斉 藤 昌 之

副 査 教 授 梅 村 孝 司

副 査 教 授 林 正 信 (酪農学園大学)

学 位 論 文 題 名

Genetic and Developmental Study of Tattered^{hokkaido} (Td^{ho}) mouse

[Tattered^{hokkaido} (Td^{ho}) マウスにおける遺伝学および発生学的研究]

系統維持過程において偶然発見された遺伝性疾患マウスは、皮膚に痂皮が生じ、伴性遺伝を示して雄個体が生まれないという特徴を持つことより原因遺伝子が X 染色体に存在するものと推定された。マイクロサテライトマーカーを利用して、染色体上での位置を解析したところ、X 染色体のセントロメア側 2 番地に同定された。この位置および臨床症状が Td マウスと類似していることから、複対立遺伝子 Td^{ho} と名付けた。

異常雄胎子は妊娠 12.5 日目では生存していたが、14.5 日目には死亡していた。 Td^{ho} の異常に関連する遺伝子群を検索する目的で 12.5 日目の正常雄胎子と異常雄胎子を用い cDNA サブトラクション法を行なった。正常 cDNA から異常 cDNA を引いた群から得られたクローンの中に、胎子グロビン遺伝子が検出された。一方、異常 cDNA から正常 cDNA を引いた群のクローンの中に、成熟グロビン遺伝子が検出された。グロビン遺伝子のノーザンブロット解析の結果、正常雄胎子と異常雄胎子間で発現に差が認められた。また組織学的検索から 12.5 日目の異常雄胎子で胎子型赤血球の細胞死が観察された。

Td 遺伝子の原因が *Ebp* (Emopamil binding protein)の変異に由来すると同定されたことより、 Td^{ho} の原因遺伝子も *Ebp* であると考え、その可能性を検討した。 Td^{ho} マウスの *Ebp* 遺伝子には 2 つの点突然変異が検出され、EBP の第 3 番膜貫通部位のアミノ酸が置換していることが確認された。すなわち、132 番の Leu が Pro に、133 番の Ser が Cys に置換していた。ノーザンブロット解析より、*Ebp* 遺伝子の発現量は正常胎子と異常胎子の間で差が認められなかった。この結果、 Td^{ho} マウスの EBP は機能欠損タンパクであると推定された。コレステロールの中間代謝産物の定量から、通常検出されない cholest-8(9)-en-3 β -ol が Td^{ho} 異常雌個体の血液中に蓄積していることが明らかとなった。したがって、 Td^{ho} マウスは *Ebp* 遺伝子に突然変異が起こり、コレステロールの代謝異常により、雄胎子の致死、血球異常および皮膚異常が生じるものと推定された。ヒトの疾患である X-linked chondrodysplasia punctata も *EBP* 遺伝子の変異に起因することが最近報告され、その臨床症状は Td^{ho} マウスと類似している。このことから、

Td^{ho} マウスはヒトの有用なモデルマウスとなりうる。

以上のように、本論文は X 染色体上の *Ebp* 遺伝子に起因する新たな疾患マウスを発見し、ヒトのコレステロール代謝異常のモデル動物となりうることを明かにしたものであり、獣医実験動物学への貢献は大である。よって、審査員一同は、徐光源氏が博士 (獣医) の学位を受ける資格が十分あると認めた。