

氏 名 藤井 智明

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1002 号

学位授与の日付 平成 18 年 9 月 29 日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Expression profiling and functional analysis of
Gasdermin (*Gsdm*) family genes in mouse intestinal
tract

論文審査委員	主査教授	相賀 裕美子
	教授	広海 健
	教授	佐々木 裕之
	助教授	平田 たつみ
	助教授	山本 博章（東北大学）

論文内容の要旨

Gsdm/GSDM is a novel gene family consisting of structurally-related seven mouse genes and four human genes. A member of this family, *GsdmA3*, is known to be the causative gene of a mouse skin mutant *Rim3*, which exhibits epidermal hyperplasia, hyperkeratosis and abnormal hair development. All members of the *Gsdm/GSDM* family are expressed predominantly in epithelial cells of various different tissues including skin and gastrointestinal tract. Thus far, expression patterns of *GsdmA* genes clustering in the mouse chromosome 11 have been well analyzed, and it is revealed that they are expressed in skin and upper gastrointestinal tracts, such as esophagus and stomach, in a tissue specific manner. The phenotypes of *Rim3* and other mutants of *GsdmA3* have been well characterized. The results of these studies suggested that function of the *Gsdm/GSDM* gene family is involved in regulation of proliferation and differentiation of epithelial cells.

In mouse, other members of the *Gsdm/GSDM* family, *GsdmC* and *GsdmD*, are known to be expressed in intestinal tracts, small intestine and colon, but information about their genome structures and fine expression patterns is very limited. Moreover, functional analysis of the *GsdmC* and *GsdmD* genes has been hampered by absence of available mutants.

In this study, first I carried out molecular cloning of a new *GsdmC*-related gene, and analyzed fine genome structures of the *GsdmC* and *GsdmD* genes primarily by intensive search for public genome databases. As a consequence, I found that four *GsdmC* genes are clustering in the mouse chromosome 15, and *GsdmD* is linked to the *GsdmC* cluster. Second, I conducted extensive analysis of expression profiling of the *GsdmC* and *GsdmD* genes by Northern blot, quantitative PCR and *in situ* hybridization. The results clearly showed that the expression patterns of these genes are highly tissue specific. Moreover, expression of each gene depends on the cell position along proximal-distal axis of gastrointestinal tract. It was also notable that all genes are expressed in differentiated cells but not in proliferating cells and stem cells, as is the case with the *GsdmA* cluster genes.

Finally, I generated *GsdmD*-null mutant mice to elucidate function of this gene. Surprisingly, the mutant mice showed no marked phenotype in the external appearance, histology of the small intestine and the colon, and cell differentiation and proliferation in the intestinal tract. However, I found that mortality of the mutant homozygotes is elevated after 5 months of age. Furthermore, mutant mice exposed to γ -irradiation revealed to have defect in cell proliferation and tissue recovering in the intestinal tract after injury. This result demonstrated that *GsdmD* plays a role in homeostasis rather than development and morphogenesis of intestinal tract. All results of this study showed that functions of the members of the *Gsdm* family are not simple, but might be rather diverse depending on tissues. Taking account of the strictly restricted

and differential expression patterns of each member of *Gsdm* gene family, they may play differential functions depending on tissues that express specific member(s) of the *Gsdm* gene family.

論文の審査結果の要旨

皮膚ならびに消化管上皮は、細胞増殖と分化、その後の細胞死のバランスにより構造が保たれている。また、上皮は過酷な外部環境変化・外部からの刺激に対してのバリア機能を有し、生体の恒常性を一定に維持する機能を持つ。これまでに、上皮組織の細胞増殖、分化に関わる因子に関して、遺伝学的、発生生物学的手法を用いて多くの解析が成されてきた。一方、恒常性維持機構に関しては、その破綻が様々な疾患の原因と考えられているにも関わらず未だ不明な点を多く残しているのが現状である。

Gasdermin (*Gsdm*) family は、上皮形態形成異常突然変異マウス *Rim3* の原因遺伝子探索過程に見出された新規遺伝子群である。これまでの研究から *Gsdm* family は、4つの subgroup、*GsdmA*, *GsdmB*, *GsdmC*, *GsdmD* から形成され、*GsdmA* クラスター遺伝子(少なくとも *GsdmA3*) は上皮細胞の増殖・分化に深く関与し、上皮形態形成・維持機構に重要な役割を担っていると考えられている。一方、同じ *Gsdm* family に属する *GsdmC*, *GsdmD* 遺伝子も上皮形態形成・維持機構に重要な役割を担っていると予想されたが、その解析は、ほとんど行われていなかった。

そこで、藤井君は、*Gsdm* family の上皮形態形成・維持機構のメカニズムを解明することを目的として、特に *GsdmC*, *GsdmD* を中心に以下の研究を行った。1) 新規 *Gsdm* family 遺伝子を探索すると共に *GsdmC*, *GsdmD* 遺伝子のゲノム構造の解析、染色体位置を同定した。2) *GsdmC*, *GsdmD* 遺伝子の詳細な遺伝子発現パターンを解析した。3) *GsdmD* ノックアウトマウスを作製し、その表現型を解析することにより *GsdmD* 遺伝子の機能解析を行った。

その結果、1) 新たな *Gsdm* family 遺伝子として *GsdmC4* を単離すると共に、*GsdmC1*, *GsdmC2*, *GsdmC3*, *GsdmC4* 遺伝子は、マウス第 15 番染色体(15D1)上でクラスターを形成すること、また *GsdmD* 遺伝子は、*GsdmC* 遺伝子の近傍 15D3 に位置することを明らかにした。2) Northern 法、定量 PCR 法、*In situ* hybridization 法を用いた詳細な遺伝子発現解析により、*GsdmC* クラスターおよび *GsdmD* 遺伝子は、主に下部消化管で、異なった分化段階の細胞群に発現することを明らかにした。3) *GsdmD* ノックアウトマウスを作製し、その解析を行ったところ、予想に反して *GsdmD* ノックアウトマウスは正常に生まれ、かつ生後 2 ヶ月齢までの下部消化管上皮における分化細胞、細胞増殖能、アポトーシスに異常がないことを明らかにした。次に、ノックアウトマウスについて恒常性維持の一つの指標である上皮損傷後の細胞分裂能を調べたところ、その能力が有意に減少しており、更には生後 5 ヶ月齢より死亡率が上昇すると共に、同時期の小腸上皮が崩壊している事を見出した。このことから、*GsdmD* 遺伝子が消化管上皮の形態形成ではなく、恒常性維持機構に働いている可能性が示された。

以上の研究結果をまとめた藤井君の学位論文は、これまで詳細が不明であった *GsdmC* クラスターおよび *GsdmD* 遺伝子の染色体マップ情報や発現パターン等の基盤情報を提示すると共に、*GsdmD* 遺伝子が消化管上皮の恒常性維持機構に関与する可能性を示した点で高い学術的価値を持っている。また、未だ不明な点が多い消化管上皮恒常性維持機構研究にとって重要な手がかりを提示したものとして評価できる。