

氏 名 FATCHIYAH

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 961 号

学位授与の日付 平成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Differential Gene Dosage Effects of Ad4BP/SF-1 on
Target Tissue Development

論文審査委員 主 査 教授 長濱 嘉孝
教授 諸橋 憲一郎
教授 笹岡 俊邦
教授 吉岡 秀文(兵庫教育大学)

題目 Differential gene dosage effects of Ad4BP/SF-1 on target tissue development

Ad4BP/SF-1 はステロイドホルモン産生組織において、組織特異的に発現する遺伝子の転写制御を行う因子として同定された。構造上の特徴から核内受容体ファミリーに属する。この因子の発現は生殖腺や副腎皮質などのステロイドホルモン産生組織の発生初期に開始することから、これらの組織形成に関わっていると推測された。実際に、本因子のノックアウトマウスからはこれらの組織が消失したことで、本因子が生殖腺や副腎皮質の形成に必須であることが示された。また、Ad4BP/SF-1 は視床下部腹内側核、脳下垂体性腺刺激ホルモン産生細胞、ならびに脾臓においても発現し、ノックアウトマウスにおけるこれらの組織にも異常が認められる。これらの結果は Ad4BP/SF-1 が組織形成に必要な遺伝子の転写を制御していることを示唆するものであったが、ノックアウトマウスは副腎の欠損により出生直後に死に至るため、成獣における本因子の機能をノックアウトマウスによって調べることはできなかった。彼女は Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現を薬剤処理によって制御できるマウスを作製し、本因子のノックアウトマウスをレスキューすることを試みた。レスキューが成功すれば、成獣において Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現を低下、もしくは消失させることが可能となり、その影響を個体レベルで調べることができると考えた。そこで、Ad4BP/SF-1 遺伝子とその前後の遺伝子を含む、全長 100-200 kb の2種類の BAC clone をもとに、テトラサイクリンによって Ad4BP/SF-1 遺伝子の発現を抑制できるようなコンストラクトを作製した。このコンストラクトには lacZ 遺伝子も含まれており、Ad4BP/SF-1 遺伝子のプロモーターによって lacZ 遺伝子が活性化される。彼女はこの DNA を用いてトランスジェニックマウスを作製し、lacZ 遺伝子が内在性の Ad4BP/SF-1 遺伝子とほぼ同様の発現を示す系統を複数得た。これらの組織におけるトランスジーン発現は mRNA レベルで検出可能で、内在性の遺伝子からの転写と合わせて mRNA はいずれの組織においても増加していた。しかしながら、Ad4BP/SF-1 のタンパク量を調べたところ、脾臓における発現は増加していたが、他の組織では明瞭なタンパク量の発現上昇は認められなかった。実際に、脾臓は正常個体と比較して増大していたが、他の組織にはこのような変化は認められなかった。このことは lacZ の発現や mRNA の発現上昇とは矛盾するが、興味深いことに脾臓以外の組織では Ad4BP/SF-1 抗体が認識する分子量の小さなタンパク質の発現が認められ、これらの分子が正常 Ad4BP/SF-1 に対し抑制的に機能することが示唆された。

彼女はこれらのトランスジェニックマウスを用いて Ad4BP/SF-1 遺伝子ノックアウトマウスのレスキュー実験を行ったが、残念ながらレスキュー個体はノックアウト個体と同様に出生後に死亡した。レスキュー個体を調べたところ生殖腺は形成されていたが、副腎は形成されておらず、このことがレスキュー個体を得ることができなかった理由であると思われる。そこで、レスキュー個体の生殖腺と副腎の発生初期過程について、マーカー遺伝子の発現を検討した。生殖腺と副腎皮質の原基となる細胞集団は胎齢 11.5 日前後までは一つの集団として存在するが、後に生殖腺原基と副腎原基に分離することが知られている。副腎皮質特異的に発現する Cyp21a1 遺伝子と、生殖腺と副腎皮質のステロイドホルモン産生細胞に発現する 3 β -Hsd 遺伝子の発現を胎齢 11.5 日で調べたところ、野

生型個体では Cyp21a1 遺伝子は副腎皮質原基に、3 β -Hsd 遺伝子は生殖腺と副腎皮質原基に認められたが、レスキュー個体の副腎皮質には Cyp21a1 遺伝子の発現が認められなかった。このことは副腎皮質の形成がその初期において障害されていることを示すものであった。一方、雄の生殖腺では、その後 3 β -Hsd 遺伝子とセルトリ細胞のマーカー遺伝子であるミューラー管障害因子の発現が認められたことから、生殖腺の発生は正常に進んでいることが確認された。また、タンパク質レベルで発現上昇が確認された脾臓はノックアウトマウスの表現型が完全にレスキューされており、タンパクレベルの発現上昇を認める組織と認めない組織の間でレスキューの程度に差があることが示唆された。

Ad4BP/SF-1 遺伝子は雌雄生殖腺、副腎皮質、視床下部腹内側核、脳下垂体性腺刺激ホルモン産生細胞、ならびに脾臓の形成に関わるが、Ad4BP/SF-1 の発現量がそれぞれの組織に与える影響は異なっていることが明らかになった。特に生殖腺と副腎皮質を比較すると、生殖腺が低い発現量で発生が正常に進むのに対し、副腎皮質の形成には一定量の Ad4BP/SF-1 の発現が必要であることが示唆された。彼女の成果は Ad4BP/SF-1 遺伝子の標的となる組織や細胞が、それぞれ異なる程度に Ad4BP/SF-1 の発現量を必要としていることを明らかにしたものであり、特に生殖腺と副腎皮質の分化メカニズムを明らかにする上で貴重な情報である。

論文の審査結果の要旨

核内受容体型転写因子Ad4BP/SF-1は雌雄生殖腺、副腎皮質、脳下垂体性腺刺激ホルモン産生細胞、視床下部腹内側核、脾臓血管系内皮細胞に発現し、これらの組織や細胞の形成と機能の維持に重要な働きを担っている。本因子遺伝子の破壊マウスからは雌雄生殖腺と副腎皮質が消失し、他の標的組織にも異常が認められる。しかしながらこのマウスは副腎の消失に伴う、副腎コルチコイドの欠損が原因で生後直ぐに死亡する。従って、Ad4BP/SF-1の機能を成獣組織を用いて調べることは不可能であった。そこで、本研究ではAd4BP/SF-1遺伝子破壊マウスの新生児期における死亡を回避するために、Ad4BP/SF-1遺伝子座を含むBACを用い、トランスジェニックマウスを作製した。用いたBACプラスミドにはTet-OFFシステムを導入しており、得られたマウスをドキシサイクリン処理することでAd4BP/SF-1遺伝子の発現を任意に消失させることを可能にした。また、トランスジーン発現はlacZの発現をもってモニターできるような工夫を施した。実験には2種類のBACを用い、それぞれ複数のラインを得た。これらのラインについてAd4BP/SF-1の発現を調べたところ、精巢のセルトリ細胞を除く全てのAd4BP/SF-1遺伝子の発現部位にトランスジーン発現を確認することができた。そこで、得られたトランスジェニックマウスを用いてAd4BP/SF-1遺伝子破壊マウスのレスキュー実験を行ったところ、予想に反して生きてレスキュー個体を得ることはできなかった。そこで、遺伝子破壊個体を調べたところ、生殖腺や脾臓は正常に戻っていたにもかかわらず、副腎は消失したままであった。実際に副腎原基を構成する細胞が存在する領域に副腎皮質のマーカー遺伝子の発現は確認することができなかった。また、この消失は胎齢11.5日に認められ、遺伝子破壊個体とほぼ同時期に始まることが分かった。副腎がレスキューできなかった原因を調べるために、トランスジーン由来のAd4BP/SF-1の発現やBACトランスジェニックにおけるAd4BP/SF-1のmRNA量とタンパク量などを検討した結果、mRNA量の顕著な増加を認めるラインにおいてもタンパク量が増加していないものや、分解産物もしくはトランケート型のタンパク質と推測されるAd4BP/SF-1タンパク質の存在が明らかになった。これらの産物が正常なAd4BP/SF-1に対しドミナントネガティブに働いたために副腎のレスキューが成功しなかった可能性が指摘された。また、コンストラクトにはTet-offシステムを採用したために、本来のAd4BP/SF-1遺伝子からの発現に比べ、トランスジーンからの発現が遅れることとなる。この初期の発現の遅れがその原因となった可能性も指摘された。申請者はこのトランスジェニックマウスを用いてレスキューされた脾臓のサイズとAd4BP/SF-1の遺伝子量ならびに発現量を比較した。その結果、脾臓のサイズはAd4BP/SF-1の遺伝子量と発現量に極めて良い相関を示すことが明らかになった。申請者の所属する研究室では、Ad4BP/SF-1がサイクリンD1とE1遺伝子の発現を調節することで細胞増殖を活性化することが明らかにされており、脾臓においても同様の機能を発揮していると推測された。以上のAd4BP/SF-1遺伝子を用いたトランスジェニックマウスによる研究より、Ad4BP/SF-1の発現量がそれぞれの標的組織において特異的に調節されていること、発現開始時期と標的組織の発生開始の時期の関係は厳密に制御されているらしいこと、脾臓においては発現量と組織のサイズの間が良い相関があることなどが明らかになった。以上の成果は学位の取得に値すると審査員全員が判断した。