

|           |                                                                                                                                                                                      |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 氏 名       | なか 中 村 とも 智 之 之                                                                                                                                                                      |
| 学位(専攻分野)  | 博 士 (医 学)                                                                                                                                                                            |
| 学 位 記 番 号 | 医 博 第 1849 号                                                                                                                                                                         |
| 学位授与の日付   | 平 成 9 年 3 月 24 日                                                                                                                                                                     |
| 学位授与の要件   | 学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当                                                                                                                                                              |
| 研究科・専攻    | 医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻                                                                                                                                                                  |
| 学位論文題目    | The murine lymphotoxin- $\beta$ receptor cDNA: Isolation by the signal sequence trap and chromosomal mapping<br>(シグナルシークエンス・トラップ法を用いたマウスリンホトキシン $\beta$ 受容体のクローニングとその染色体マッピングに関する研究) |
| 論文調査委員    | (主 査)<br>教 授 成 宮 周 教 授 西 川 伸 一 教 授 篠 山 重 威                                                                                                                                           |

### 論 文 内 容 の 要 旨

サイトカインやその受容体が中胚葉誘導・臓器形成に重要な役割を果たしていることはよく知られている。しかし一般に未知の細胞間シグナル分子を同定するためには *in vitro* でのアッセイ系を確立しなければならず、またそのタンパク量はわずかしかないため、困難を伴うものであった。これを解決するため、我々はアミノ末端のシグナルペプチドを指標に分泌タンパクと I 型膜タンパクを効率よくクローニングするシステム、シグナルシークエンス・トラップ (SST) 法を開発し報告してきた。本論文では、マウスの発生に関与する細胞間シグナル分子を同定するため、SST 法を応用した。

マウス胎仔心臓 (受精後 9 日) から SST cDNA ライブラリーを形成しスクリーニングしたところ、シグナルシークエンスを持つ 1 つのクローン、N60b1 を得た。N60b1 をプローブに全長 cDNA (F-N60b1) をクローニングした。F-N60b1 は全長 388 アミノ酸の I 型膜タンパクで、細胞外ドメインに特徴的なシステインに富む繰り返し配列を持っており、TNF 受容体ファミリーに属することが判明した。その中でも特に最近発見されたヒトのリンホトキシン $\beta$  (LT $\beta$ ) 受容体にホモロジーが高く (66%)、他の TNF 受容体ファミリーメンバーに比べて (30%以下) 明らかに以ているため F-N60b1 はマウスの LT $\beta$  受容体であると考えられた。

マウス LT $\beta$  受容体の各臓器における発現、発生の各時期における発現をノーザンブロット法にて検討した。2.2 kb の単一のバンドが肺・肝臓・腎臓に強く、心臓・睾丸に中等度、また脳・胸腺・脾臓・リンパ節にごく弱く発現していた。LT $\beta$  受容体のリガントである LT $\alpha$ -LT $\beta$  ヘテロ 3 量体は活性化したリンパ球に発現されるが、LT $\alpha$ -LT $\beta$  の主なターゲットはリンパ球以外であると考えられた。また受精後 7 日目の早期胚から強い発現が認められ、LT $\alpha$ -LT $\beta$ /LT $\beta$  受容体システムの発生期における何らかの役割が示唆された。

最近、LT $\alpha$  欠損マウスがリンパ節欠損と脾臓の構造異常を示すことが報告された。LT $\alpha$  ホモ 3 量体の

受容体である TNF 受容体 p55, p75 の欠損マウスではリンパ節が存在するため, LT $\alpha$  欠損マウスのリンパ組織異常は LT $\alpha$ -LT $\beta$  ヘテロ 3 量体ができないことによるものと思われる。従って LT $\alpha$ -LT $\beta$  ヘテロ 3 量体の受容体である LT $\beta$  受容体はリンパ組織の発生に何らかの役割を持っていると考えられる。また最近報告されたリンパ節欠損マウス *alymphoplasia* (*aly*) の原因遺伝子は不明であるが 11 番染色体にマッピングされている。そこで, LT $\beta$  受容体が *aly* の原因遺伝子である可能性を検討するため LT $\beta$  受容体遺伝子の染色体マッピングを行った。BXD recombinant inbred strain の制限酵素断片長多型を LT $\beta$  受容体について解析したところ, 6 番染色体, 特に TNF 受容体のごく近傍 (確率 95% で 7.6 cM 以内) に位置することが判明した。マウス LT $\beta$  受容体遺伝子が 6 番染色体に位置することが判ったため, *aly* 突然変異は LT $\beta$  受容体の突然変異によるものではないということになる。LT $\beta$  と *aly* 遺伝子産物はリンパ組織発生において別々の役割を果たしていると考えられた。

以上, SST 法を用いたマウス LT $\beta$  受容体のクローニングとその染色体マッピングを報告した。

### 論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は, 心臓発生期に発現する細胞間シグナル分子をクローニングするため, 最近医化学の本庶教授グループにより開発されたシグナルシーケンス・トラップ (以下 SST) 法を応用した研究である。

マウス胎仔心臓 (受精後 9 日) から SST cDNA ライブラリーを作成してスクリーニングを行い, シグナルシーケンスを持つ一つのクローンを得た。このクローンの全長 cDNA をクローニングし, 塩基配列を決定したところ, 最近開発されたヒトリンホトキシン  $\beta$  (LT $\beta$ ) 受容体のマウスホモログ (マウス LT $\beta$  受容体) であることが判明した。その発現は受精後 7 日の早期胚から見られ, 発生期における役割が示唆された。またマウス LT $\beta$  受容体の染色体マッピングを行い, それが 6 番染色体の TNF 受容体 (p55) のごく近傍に位置することを明らかにした。

以上の研究は, SST 法を発生期細胞間シグナルのクローニングに応用した最初のものである。LT $\beta$  受容体は Fas / TNF 受容体ファミリーの新たなメンバーとして注目される分子であり, マウスホモログの発見とその発生への関与の示唆, 染色体マッピングによる染色体地図作成への寄与において評価できる。

したがって, 本論文は博士 (医学) の学位論文として価値あるものと認める。

なお, 本学位授与申請者は, 平成 9 年 1 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け, 合格と認められたものである。