

氏 名	くろ おか ひさ のり 黒 岡 尚 徳
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 1836 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 生 理 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Rescue of the hairless phenotype in nude mice by transgenic insertion of the wild-type <i>Hfh11</i> genomic locus. (野生型 <i>Hfh11</i> ジェノミックローカスの人為的挿入によるヌードマウスにおける無毛症の回復)

(主 査)
論文調査委員 教 授 芹 川 忠 夫 教 授 日 合 弘 教 授 本 庶 佑

論 文 内 容 の 要 旨

ヌードマウスは、体毛が成長せず、また胸腺がないため正常な T リンパ球が発生しない。この 2 つの欠損を持つ突然変異体が、マウスとラットで独立に 2 つずつ見つかったことから、原因遺伝子は単一であることが示唆されている。最近、ポジショナルクローニングの手法を用いてヌード遺伝子であると予想される遺伝子が、winged-helix family に属する転写因子 *Hfh 11*(*whn*) をコードすることが報告された。しかし、ポジショナル・クローニングにより単離・同定された候補遺伝子が、突然変異体の表現形を引き起こす原因遺伝子であることを機能的に証明するには、

- 1) 原因遺伝子を破壊し突然変異体と同じ表現形を示すか？
- 2) 正常遺伝子を突然変異体に導入し表現形が野性型に戻るか？

のどちらかの実験を行なう必要がある。その為、ヌード表現形が実際に *Hfh 11* 遺伝子の変異によることを生物学的な手法で直接確かめる目的で、野生型 *Hfh 11* 遺伝子をヌードマウスに導入し(上述の 2 の方法)表現型の回復についての検証とその解析を行なった。

野生型 *Hfh 11* トランスジェニックヌードマウスの作製にあたって、トランスジーンとして *Hfh 11* 遺伝子に特有な調節領域をカバーしていることが予想されるコスミド DNA を用いた。まず、*Hfh 11* ジェノミックローカスに由来する YAC (yeast artificial chromosome) からコスミド・ライブラリーを構築し、*Hfh 11* 遺伝子の coding 配列をすべて含むことを指標としてスクリーニングを行なった。そして *Hfh 11* 遺伝子の coding 配列以外に数 kb ずつ 5' 側、3' 側の flanking 配列を持つコスミド・クローンを、ヌードマウスから採取した受精卵に直接注入し、それぞれ約 7, 30 コピーのトランスジーンが染色体に組込まれているファウンダーマウスを計 2 系統得た。いずれのトランスジェニックマウスにおいても不完全ながら体毛の回復がみられたが、回復の程度はファウンダー間で異なっていた。組み込まれたコピー数の少ない方のファウンダーでは、体表の約 5 割程度の回復しか見られなかったのに対し、コピー数の多い方のファ

ウンダーでは野生型とほぼ同じくらいまでの回復が認められた。体毛の長さに関しては、いずれも野生型と比べて大きな違いはみられなかった。

次にこれらのトランスジェニックマウスにおいて胸腺が回復しているかどうかを検討した。まずそれぞれのトランスジェニックマウスを開腹し、形態的に胸腺と認められるような臓器があるかどうか調べた。いずれのトランスジェニックマウスにおいても胸腺、或いはその痕跡のようなものを見つけることはできなかった。また、T細胞特異的表面抗原に対する抗体を用いてFACS解析を行なったが、ヌードマウスと比較して有意な差は認められなかった。このことは *Hfh 11* 遺伝子の変異が、ヌードマウスにおいて体毛ができない原因であることの直接的な証明となるものであるが、これまでの遺伝的解析の結果と考えあわせると胸腺が回復しなかったことについては、もう1つ別の原因遺伝子があるというより、*Hfh 11* 遺伝子の組織特異的な制御を反映しているということが考えられる。1つの可能性としては、2つの組織においてそれぞれに特有なプロモーター、或いはエンハンサー領域が存在し、使用したトランスジーンには、胸腺特異的なものが欠失していることが考えられる。もしくは、トランスジーンが染色体に組込まれる際の位置の影響を受けて、胸腺における発現に影響を及ぼしたということも考えられる。このトランスジェニックマウスは、*Hfh 11* 遺伝子がヌード表現形を引き起こす原因遺伝子であることを生物学的な手法で直接証明しただけでなく、*Hfh 11* 遺伝子の2つの組織における複雑な制御機構を解明する手段として、非常に有用なものであることが期待される。

論文審査の結果の要旨

本論文は、ヌードマウスが呈する無毛症と無胸腺という2つのヌード表現形は、winged-helix familyに属する転写因子 *Hfh 11(whn)* 遺伝子の変異により生じるであろうという報告に着目し、*Hfh 11(whn)* 遺伝子の正常型タイプをヌードマウスの受精卵に直接導入し、表現形が野性型に戻るかどうかの検証を行ったものである。

その結果、不完全ではあるが無毛症が回復したのに対し、胸腺の形成は認められず、更に、胸腺から産生されるTリンパ球も検出されなかった。このことは、ヌード表現形のうち無毛症は *Hfh 11(whn)* 遺伝子の変異に起因すると結論することができ、無胸腺の方に関しては、原因遺伝子が2つ以上ある可能性が低いことから、胸腺における *Hfh 11(whn)* 遺伝子の発現に必須な制御領域が、導入したDNAには含まれていないことが推測された。

本論文は、*Hfh 11(whn)* 遺伝子の変異がヌード表現形をひき起こすことを、生物学的な手法を用いて機能的に証明するとともに、異なる組織においての、*Hfh 11(whn)* 遺伝子の複雑な発現制御機構を解明する手がかりとなるものである。

以上の研究は、マウス遺伝病（ヌードマウス）の原因遺伝子の解明に貢献し、将来的に、ヒト遺伝子治療にも応用できる可能性を示唆するものである。

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10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。