

審査の結果の要旨

氏名 布施俊光

本研究は、アクチン細胞骨格再構成を制御することでさまざまな生命現象で重要な役割を演じていると考えられている低分子量 G タンパク質 RhoA のマウス生体内での機能を明らかにするために、Cre/loxP 遺伝子組換えシステムを用いて恒常活性化型 RhoA (caRhoA)をマウス初期胚で発現させ、とくに初期発生に焦点をあてて RhoA 情報伝達の役割の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 大腸菌 P1 ファージ由来の Cre/loxP 遺伝子組換えシステムを応用し、Cre 組換え酵素活性依存的に caRhoA を発現する組換え遺伝子コンストラクト CAG-Z-caRhoA を作成し、これを持つ遺伝子組換えマウス Rho36 を得た。この Rho36 マウスに導入された組換え遺伝子のプロモーター活性を、レポーター遺伝子として接続された lacZ 遺伝子発現により調べた。脳切片、および胚の X-gal 染色の結果、胚盤胞においてすでにプロモーターは活性化しており、初期胚において Cre 組換え活性依存的な caRhoA 発現が期待されることが示された。
2. テレンセファリン遺伝子の翻訳開始コドン直下に Cre 遺伝子を遺伝子相同組換えにより導入した TLCN-Cre ‘ノックイン’ マウスの Cre 組換え酵素活性の部位・時期特性を解析した。TLCN-Cre マウスを、loxP 配列間の組換えにより β -galactosidase を発現するレポーターマウス(CAG-CAT-Z)と交配し、その F1 マウスの脳薄切切片を X-gal 染色することで、TLCN-Cre マウスにおける loxP 間欠失は、生後終脳特異的に発現するテレンセファリン遺伝子の発現パターンとは一致せず、脳全域に分布することが示された。
3. TLCN-Cre マウスにおける loxP 間組換え効率の組織特異性を、新生仔マウス全身の 11 の組織よりゲノム DNA を抽出してサザンハイブリダイゼーションにより解析したところ、すでにそれらすべての臓器で組換えがおこっていることが示された。マウス胚を摘出して X-gal 染色をおこない、3.5 日胚の胚盤胞では組換えはおこっておらず、着床後の 5.5 日胚において組換えがおこることが示された。この解析により、TLCN-Cre マウスは

着床後胚における時期特異的な Cre マウスとして用いることができることが示された。

4. Rho36 マウスと TLCN-Cre マウスを交配することで、着床後胚における caRhoA 発現のマウス初期発生への影響の解析がなされた。これら両者の遺伝子を持つマウス胚は胚性致死であり、生誕しないことが新生仔マウスの遺伝型判定により示された。7.5–9.5 日胚を摘出して形態学的な解析をおこない、8.5 日胚ですでに発生が停止していることが示された。
5. 7.0 – 8.5 日胚の組織切片を作成することで発生障害の詳細を形態学的に解析し、7.5 日胚における羊膜腔に原外胚葉の異常な細胞塊が存在することが示された。原始線条形成、および他の組織の構造は比較的正常であり、発生障害は原外胚葉においてまず細胞の異常増殖としてまず顕著にあらわれることが示された。
6. 以上の解析結果から、マウス胚において恒常活性化型 RhoA を発現することは、特に活発に増殖している原外胚葉細胞において、選択的に増殖能をより亢進することが示された。

以上、本論文はマウス生体内で RhoA 情報伝達の解析をおこなう実験系の開発をおこない、Cre 組換え酵素依存的に恒常活性化型 RhoA を発現するマウスを作成した。さらに、着床後の初期胚において Cre 遺伝子を発現する TLCN-Cre マウスと交配することで、caRhoA が原外胚葉細胞の増殖を亢進する事を示した。本研究はほとんど解析がおこなわれていないマウス生体内での RhoA 情報伝達の役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。