

## 審査の結果の要旨

氏名 王 宇慧

本研究は慢性関節炎患者の関節軟骨の破壊において重要な分解酵素であると考えられる ADAMTS4 (a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type 1 motifs) の生理学的意義、特に発生に対しての役割を明らかにするため、遺伝子欠損マウスを作成し、解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. マウスの発生において ADAMTS4 の発現を調べた結果、ADAMTS4 は 8.5 日胎児で脳や心臓に強く発現していることが示された。脳と心臓の各発生段階について ADAMTS4 発現レベルを Northern-blot で分析した結果、ADAMTS4 が発生の早い段階ほどより多く発現されていることが示された。
2. ADAMTS4 cDNA プロブを用いて 129svj マウスゲノム library からマウス ADAMTS4 フェージ DNA を得、エクソンとイントロン構造、open reading frame 及びドメイン構造を明らかにした。
3. エクソン 3 に存在するメタロプロテアーゼドメインをターゲットにして、エクソン 3 からエクソン 4 までの DNA 領域を neo 耐性遺伝子で取り換えてターゲティングベクタを構築した。ターゲティングベクタを ES 細胞に導入し、相同組換えの起こった ES 細胞を受精卵に導入したことにより、キメラマウスを得、さらにキメラマウスと野生型マウスの交配によりヘテロ接合体を得た。
4. ADAMTS4 のヘテロ接合体は外見で異常がなく生殖も正常だったが、ヘテロ同士を交配し Southern-blot で解析した結果、187 匹の子供のうちホモ接合体が見られなかった。ホモ接合体の致死時期を各妊娠段階で調べた結果、妊娠 8.5 日目の段階でも胚子の存在がなく、子宮には吸収された残留物もないことが分かった。I-PEP-PCR の技術で 8 細胞期や 2 細胞期でホモ接合体を見つけた。しかし、胚子の形態が異常で未分裂

や断片化を呈していたことが認められた。したがって、ADAMTS4 蛋白の欠損により初期発生において致命的の影響をもたらしていると考えられる。

5. 受精に関わる他の細胞も調べた所、ADAMTS4 が受精卵と続発する発育段階の胚子に特異的に発現していることが認められた。受精卵で ADAMTS4 発現の局在を蛍光免疫染色で明らかにした。
6. In vitro の実験系では受精卵の発生が抗 ADAMTS4 抗体によって用量依存的に阻害され、発育阻害された卵子は未分裂や断片化を呈し、形態上は ADAMTS4 ホモ接合体の表現と一致していた。その結果は受精卵の発生において、ADAMTS4 が細胞外で働くと考えられた。

以上、本論文はマウスの初期発生において、ジーンターゲティングの発生工学を用いて ADAMTS4 遺伝子欠損マウスを作成し、ホモ接合体の解析から、ADAMTS4 が初期発生で決定的な役割を果たしていること明らかにした。本研究は細胞外基質を構成するプロテオグリカンの分解酵素がマウスの初期発生においての重要性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。