

# 学 位 論 文 要 旨

氏名 松屋 純人

題 目： アフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) における成長関連因子の解析および iPS 細胞の樹立

## 論文要旨：

地球上には、体重がわずか 30 g 程度のマウスから 150 t に及ぶクジラからまで、様々な大きさの哺乳動物が生息している。多くの哺乳動物において、体の大きさは種ごとに一定であり、体の大きさの調節および維持のメカニズムは世代交代を経ても厳密に維持されている。しかしながら、哺乳動物において体の大きさを一定に調節し、維持している普遍的なメカニズムは明らかになっていない。

哺乳動物の中でも、齧歯目の下位分類群のひとつである *Mus* 属は 30 種以上の動物で構成され、体の大きさも多様である。アフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) は最小の哺乳動物のひとつとして知られ、近年は愛玩動物として注目されている。*M. minutoides* は体重 3 g ほどであり極めて矮小であるが、寿命や妊娠期間などの生物学的特性は実験動物として用いられるマウス (*Mus musculus*) と同等である。しかし、*M. minutoides* において、極めてユニークな特徴である矮小な体躯について着目して行われた研究はこれまでにない。そこで、本研究では、*M. minutoides* について分子レベル、細胞レベルでの多面的な解析を行うことによって、齧歯類における体の大きさを調節しているメカニズムの一端の解明を目的とした。

まず、体の大きさの調節に関して重要な成長ホルモン (Growth hormone: Gh) -インスリン様成長因子 1 (Insulin-like growth factor 1: Igf1) 軸 (Gh-Igf1 axis) の関連因子について、*M. minutoides* における分子生物学的な特徴を明らかにするための基礎的な解析を行った。その結果、*M. minutoides* における *Gh* 遺伝子および *Prop1* 遺伝子のゲノム領域の塩基配列を決定した。さらに、塩基配列から推定されるアミノ酸配列を、*Mus* 属の中でも網羅的な解析が進んでいる *M. musculus* と比較したところ、一部が異なっており、Gh タンパクの細胞内局在や受容体への結合能および *Prop1* タンパクの転写因子としての働きに影響している可能性が考えられた。また、*M. minutoides* の下垂体における *Gh* 遺伝子の発現解析を行ったところ、*M. musculus* よりも高い傾向があった。これらの結果から、*M. minutoides* における *Gh* 遺伝子が配列だけでなく発現動態においても独自の特徴を有し、矮小性に関与している可能性が示唆された。

次に、Gh の受容体であり Gh-Igf1 axis の中心的な構成要素である成長ホルモン受容体 (Growth hormone receptor: *Ghr*) 遺伝子に着目して解析を行った。その結果として、*Ghr* 遺伝子の coding sequence を決定した。*M. minutoides* の *Ghr* は、*M. musculus* と比較して異なるアミノ酸残基が Gh や *Prop1* よりも多く認められ、特に P469L (469 番目のプロリンがロ

イシンに変化)が情報生物学的に有害な残基である可能性が示唆された。また、*M. minutoides* の線維芽細胞や肝臓などの組織における *Ghr* 遺伝子および *Igf1* 遺伝子の発現を調べると、*M. musculus* よりも有意に低かった。矮小な体躯を持つ *M. minutoides* において *Gh* 遺伝子発現が増加し、*Ghr* 遺伝子、*Igf1* 遺伝子発現が低下していることは、ヒトの小人症であるラロン症候群における病態と極めて類似しており、*M. minutoides* の矮小性の原因がラロン症候群様の生理状態を呈していることにある可能性が考えられた。また、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子の 5'-非翻訳領域において、*M. musculus* には認められない特徴的な配列 (dwarf 配列と命名) を発見した。培養細胞を用いて dwarf 配列の解析を行ったところ、*M. minutoides* 特有の dwarf 配列が *Ghr* 遺伝子の発現を抑制している可能性を見出した。

*M. minutoides* の矮小性に関して *in vivo* における解析を行うためのツールの確立を目的として、最後に *M. minutoides* 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) の樹立を試みた。*M. minutoides* 線維芽細胞をリプログラミングすることによって、naïve 型と考えられるドーム状のコロニーを形成する *M. minutoides* iPS 細胞を作出した。樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は複数の多分化能マーカーを発現し、三胚葉全ての特徴を示す胚様体やテラトーマを形成した。さらに、*M. minutoides* iPS 細胞を *M. musculus* の胚盤胞期胚に注入するとキメラ動物が誕生し、被毛の色から *M. minutoides* iPS 細胞が個体発生に寄与したことが確認された。従って、本研究において樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は胚盤胞補完法をはじめとする発生工学的手法への応用が期待できた。

以上、本研究において、分子生物学的手法を用いて *M. minutoides* の成長関連因子を解析することによって *M. musculus* との差異を明らかにし、体の大きさの調節メカニズムとの関連を示した。さらに、発生工学的手法への応用が期待できる *M. minutoides* iPS 細胞の樹立に初めて成功した。これらの組み合わせにより、*M. minutoides* の矮小性および *M. musculus* との体の大きさの違いを決めているメカニズムに関して、より発展的な解析を行うことができると考える。

## 学位論文審査の結果の要旨

|         |  |
|---------|--|
| 氏 名     | 松 屋 純 人  |
| 審 査 委 員 | 主 査： 山口大学 教授 加 納 聖   |
|         | 副 査： 山口大学 教授 日 下 部 健   |
|         | 副 査： 山口大学 教授 佐 藤 晃 一   |
|         | 副 査： 山口大学 教授 高 木 光 博   |
|         | 副 査： 鹿児島大学 教授 白 石 光 也  |
| 題 目     | アフリカチビネズミ ( <i>Mus minutoides</i> ) における成長関連因子の解析および iPS 細胞の樹立 |

### 審査結果の要旨：

多くの哺乳動物において、体の大きさは種ごとに一定であり、体の大きさの調節および維持のメカニズムは世代交代を経ても厳密に維持されている。しかしながら、哺乳動物において体の大きさを一定に調節し、維持している普遍的なメカニズムは明らかになっていない。

哺乳動物の中でも、アフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) は最小の哺乳動物のひとつとして知られ、近年は愛玩動物として注目されているが、極めてユニークな特徴である矮小な体躯について着目して行われた研究はこれまでにない。そこで、本研究では、*M. minutoides* について分子レベル、細胞レベルでの多面的な解析を行うことによって、齧歯類における体の大きさを調節しているメカニズムの一端の解明を目的とした。

そこで、体の大きさの調節に関して重要な成長ホルモン (Growth hormone: Gh) -インスリン様成長因子 1 (Insulin-like growth factor 1: Igf1) 軸 (Gh-Igf1 axis) の関連因子について、*M. minutoides* における分子生物学的な特徴を明らかにするための解析を行った。

まず、Gh の受容体であり Gh-Igf1 axis の中心的な構成要素である成長ホルモン受容体 (*Growth hormone receptor: Ghr*) 遺伝子に着目して解析を行った。その結果として、*Ghr* 遺伝子の coding sequence を決定した。*M. minutoides* の *Ghr* は、*M. musculus* と比較して異なるアミノ酸残基が Gh や Prop1 よりも多く認められ、特に P469L (469 番目のプロリンがロイシンに変化) が情報生物学的に有害な残基である可能性が示唆された。また、*M. minutoides* の線維芽細胞や肝臓などの組織における *Ghr* 遺伝子および *Igf1* 遺伝子の発現を調べると、*M. musculus* よりも有意に低かった。矮小な体躯を持つ *M. minutoides* において *Gh* 遺伝子発現が増加し、*Ghr* 遺伝子、*Igf1* 遺伝子発現が低下していることは、ヒトの小人症であるラロン症候群における病態と極めて類似しており、*M. minutoides* の矮小性の

原因がラロン症候群様の生理状態を呈していることにある可能性が考えられた。また、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子の 5' -非翻訳領域において、*M. musculus* には認められない特徴的な配列 (dwarf 配列と命名) を発見した。培養細胞を用いて dwarf 配列の解析を行ったところ、*M. minutoides* 特有の dwarf 配列が *Ghr* 遺伝子の発現を抑制している可能性を見出した。

次に、*M. minutoides* の矮小性に関して *in vivo* における解析を行うためのツールの確立を目的として、*M. minutoides* 人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) の樹立を試みた。*M. minutoides* 線維芽細胞をリプログラミングすることによって、naïve 型と考えられるドーム状のコロニーを形成する *M. minutoides* iPS 細胞を作出した。樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は複数の多分化能マーカーを発現し、三胚葉全ての特徴を示す胚様体やテラトーマを形成した。さらに、*M. minutoides* iPS 細胞を *M. musculus* の胚盤胞期胚に注入するとキメラ動物が誕生し、被毛の色から *M. minutoides* iPS 細胞が個体発生に寄与したことが確認された。従って、本研究において樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は胚盤胞補完法をはじめとする発生工学的手法への応用が期待できた。

以上、本研究においては、分子生物学的手法を用いて *M. minutoides* の成長関連因子を解析することによって *M. musculus* との差異を明らかにし、体の大きさの調節メカニズムとの関連を示した。さらに、発生工学的手法への応用が期待できる *M. minutoides* iPS 細胞の樹立に初めて成功した。これらの組み合わせにより、*M. minutoides* の矮小性および *M. musculus* との体の大きさの違いを決めているメカニズムに関して、今後より発展的な解析が今後期待できる。

以上により、審査員一同は、本論文は博士 (獣医学) の学位を与えるに十分な内容を有するものと判断した。