

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

山口大学大学院 共同獣医学研究科

松屋 純人

2024 年 3 月

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。

目次

目次	1
<hr/>	
序論	3
<hr/>	
第 1 章 <i>Mus minutoides</i> の成長関連因子の特性に関する基礎的解析	7
<hr/>	
緒言	8
材料と方法	11
結果	16
考察	19
図表	24
<hr/>	
第 2 章 <i>Mus minutoides</i> の成長ホルモン受容体の分子生物学的解析	33
<hr/>	
緒言	34
材料と方法	37
結果	43
考察	47

図表	54
<u>第3章 <i>Mus minutoides</i> iPS 細胞の樹立と性状解析</u>	<u>72</u>
緒言	73
材料と方法	77
結果	91
考察	97
図表	108
<u>総合考察</u>	<u>130</u>
<u>参考文献</u>	<u>137</u>
<u>謝辞</u>	<u>151</u>

序論

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る。イヌにおいては人為的に育種および選択された結果、グレートデーンとチワワでは体重に 40 倍もの差が存在するが、それぞれの品種ごとに一定の大きさを維持している。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はたつき、体の大きさは特定の範囲内に収まる。しかしながら、哺乳動物において体の大きさを一定に保つ調節に関する普遍的なメカニズムは全く明らかになっていない。

突然変異的に変化した哺乳動物の大きさに関する研究は数多く存在し、遺伝子変異に基づく内分泌異常や発生異常による矮小化および巨大化が生じた動物個体に関するものがある。ウサギでは、*High mobility group AT-hook 2 (HMGA2)* 遺伝子における 12.1 kb の大規模な欠失によって健常個体の 2/3 ほどまでしか成長しない矮小個体となり (Carneiro *et al.*, 2017)、ブタにおいても同様に、*HMGA2* 遺伝子のノックアウトによって通常の 1/2~3/4 ほどの体重の矮小個体の作出が報告されている (Chung *et al.*, 2018)。イヌにおいては、*Phosphate cytidyltransferase 1A, choline (PCYT1A)* 遺伝子の一塩基変異に起因するミスセンス変異 (Ludwig-Peisker *et al.*, 2022) や *LIM homeobox 3 (LHX3)*

遺伝子のイントロン内の繰り返し配列のリピート数減少に伴うスプライシング不良 (Voorbij *et al.*, 2011) による矮小化が報告されている。矮小動物の研究が多く行われているのに対して、巨大化した哺乳動物に関する研究は少ないが、ウシにおいて有名なダブルマッスル個体は、*Myostatin* 遺伝子の変異による機能的なタンパクの産生不全に起因するものであることが明らかにされている (McPherron and Lee, 1997)。しかしながら、これらの研究の多くは単一動物種における遺伝子変異と表現型の解析にとどまり、哺乳動物における普遍的な体の大きさの制御メカニズムについては考察されていない。

動物種間の比較およびその解釈が容易となれば、さらに他の動物に対する展開も可能となり、哺乳動物全体において体の大きさを制御するメカニズム全般に関する議論が進展すると考える。これまでに、体の大きさに着目して近縁な哺乳動物同士を比較した研究として、Debao pony と Mongolian horse を用いたものがある (Fang *et al.*, 2021)。しかし、Debao pony および Mongolian horse は網羅的に解析されてきた実験動物と異なり、ゲノム情報や遺伝子の機能などのデータ量が十分でないため、研究結果の解釈が容易ではなく、Debao pony と Mongolian horse を比較した結果を他の動物種へ外挿することは困難である。

そこで本研究では、生命科学研究において広く利用されている齧歯目 (ネズミ目) の下位分類群のひとつである *Mus* 属に着目した。*Mus* 属は 30 種以上の動物で構成され、赤道を

中心として地球の広範囲に分布しており生物学特性も多様である。*Mus* 属の中でも最も分布域が広い種であると考えられるマウス (*Mus musculus*) は体重 30 g、体長 80 mm ほどの大きさであり、一般的な実験動物として用いられているため膨大な生物学的解析が実施されており、その中で体の大きさに関する研究も少なからず行われてきた。巨大化したマウスの報告例として、成長ホルモン (Growth hormone: Gh) が関与するシグナル伝達経路に対して抑制的に働く *Socs2* 遺伝子を欠損させたマウス (Li *et al.*, 2022) や G タンパク共役型受容体のひとつをコードする *Gpr101* 遺伝子を過剰発現させたマウス (Abboud *et al.*, 2020) に関するものがある。一方、矮小マウス系統としては、Gh 関連遺伝子のひとつである *Pit-1* 遺伝子の変異を原因とする Snell マウス (Snell, 1929) や *Prop1* 遺伝子の変異を原因とする Ames マウス (Schaible and Gowen, 1961) が知られている。その他にも、下垂体前葉ホルモンである甲状腺刺激ホルモン (Thyroid stimulating hormone: TSH) 卵胞刺激ホルモン (Follicle stimulating hormone: FSH) および黄体形成ホルモン (Luteinizing hormone: LH) に共通な α サブユニットの遺伝子破壊 (Kendall *et al.*, 1995) やグリコサミノグリカンの一種であるコンドロイチン硫酸の生合成に関与する酵素をコードする *Csgalnact1* 遺伝子の欠損 (Sato *et al.*, 2011) に起因するものをはじめとして、多数の矮小化の報告がある。しかしながら、これらの遺伝子変異が動物種間における体の大きさの違いを説明できるかについては明らかではない。

体の大きさにおいて多様性が認められる *Mus* 属の中でも、アフリカチビネズミ (African pygmy mouse: *Mus minutoides*) は世界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も注目されている。*M. minutoides* は本来 Sub-Saharan Africa 地域に生息し、体重は *M. musculus* の 1/10 程度の約 3 g、体長約 30 mm である。また、*M. minutoides* の性成熟は 8 週齢、妊娠期間は 20 日間、寿命は約 2 年であり、生物学的特性は *M. musculus* とほぼ同等である (Willan and Meester, 1978)。現在、*M. minutoides* は実験動物としては確立されておらず、研究には捕獲した野生の個体もしくは自家繁殖個体が用いられている。これまでの *M. minutoides* に関する研究は特徴的な性決定様式や染色体数および保有ウイルスについてもものがほとんどであり (Chevret *et al.*, 2014; Rahmoun *et al.*, 2014; Vučak *et al.*, 2022)、極めてユニークな *M. minutoides* の特徴である矮小体躯については全く研究されていない。そこで、膨大な解析が行われ豊富なデータが利用可能であり同じ属である *M. musculus* と *M. minutoides* を比較することによって、*M. minutoides* の生物学的な特徴を明らかにできる可能性が高いと考えた。

本研究では、体の大きさという視点から、*M. minutoides* における成長関連因子の分子レベルの特徴や成長に関連するシグナル伝達経路の解析を含めた多面的な解析を行うことによって、哺乳動物における体の大きさの調節メカニズムの一端を解明することを目的とした。

第1章

Mus minutoides の成長関連因子の 特性に関する基礎的解析

緒言

様々な哺乳動物において、体の大きさに強く影響するシグナル伝達経路や数多くの因子が報告されており (Carneiro *et al.*, 2017; Chung *et al.*, 2018)、有名な経路として成長ホルモン (Growth hormone: Gh) – インスリン様成長因子 (Insulin-like growth factor 1: Igf1) 軸 (Gh-Igf1 axis) (Vasques *et al.*, 2019) や Hippo-YAP/TAZ シグナル伝達経路 (Yu *et al.*, 2015) などが知られている。Gh-Igf1 axis は、下垂体前葉から分泌される Gh、主に肝臓において高発現している成長ホルモン受容体 (Growth hormone receptor: Ghr)、Ghr が受けた刺激によって肝臓から血中へ分泌される Igf1 を主要な因子とするシグナル伝達経路である。Gh-Igf1 axis は以前からその機能について研究されており、マウスやヒト以外にも、イヌやウシにおいても塩基配列の決定や遺伝子配列の変化を介した機能解析などが行われてきた (Godowski *et al.*, 1989; Chen *et al.*, 1991; Lupu *et al.*, 2001; Iio *et al.*, 2020)。特に GH は代表的な成長因子であり、ヒトにおいては GH による成長作用や代謝の促進、血糖のコントロールなどのホメオスタシスの調節メカニズムだけでなく、GH タンパクや GHR タンパクの構造および機能部位や結合部位の同定に関する分子生物学的研究が数多く行われている (Juarez-Aguilar *et al.*, 1999; Chikani and Ho, 2014; Kaabi, 2012; Domene and Fierro-Carrion, 2018)。ヒト以外の多くの動物種においても、Gh に関する研究が行われ、マウスだけでなくイヌ (Ascacio-Martínez and

Barrera-Saldaña, 1994) やネコ (Castro-Peralta and Barrera-Saldana, 1995)、パンダ (Liao, 2003) の *Gh* 遺伝子の塩基配列も明らかになっている。また、体の大きさに関しては、ラットにおいて *Gh* 欠損による矮小化が報告されており、*Gh* が体の大きさの調節に大きく関与していることが明らかになっている (Okuma, 1984)。*Gh* の分泌メカニズムについては、視床下部からの成長ホルモン放出ホルモンによる刺激だけでなく、胃で分泌されるグレリンや *Dlk1* など様々な因子による調節が報告されている (Tannenbaum *et al.*, 2003; Ansell *et al.*, 2007)。このような *Gh* 関連ペプチドによる *Gh* 分泌の制御や、*Gh* 産生細胞における異常が体の大きさの調節に影響すると考えられる。

Gh は下垂体前葉のソマトトロープから分泌される。マウスにおいてソマトトロープを含む下垂体前葉は、発生学的には 8.5 日齢の胚の口窩の外胚葉性の部分の陥入したラトケ嚢に由来する。ラトケ嚢の発生は *Pitx1* 遺伝子ならびに *Pitx2* 遺伝子を起点とした多くの調節因子の発現に依存している (Zhu *et al.*, 2007)。その中で、11.5 日齢において発現する *Prop1* 遺伝子は、下垂体前駆細胞においてソマトトロープ、ラクトロープ、チロトロープ、ゴナドトロープへの分化を促進する。その中でもソマトトロープ、ラクトロープ、チロトロープは *Prop1* によって活性化する *Pit-1* (POU1F1) によって分化が制御されている (Zhu *et al.*, 2007)。さらにこの *Pit-1* の発現には、*Lef-1* による *Prop1* の抑制を介した低下 (Olson *et al.*, 2006) や、*microRNA-26b* による *Lef-1* 発現の抑制を介した促進

(Zhang *et al.*, 2010) などが明らかになっており、ソマトトロープを含む下垂体細胞系の分化を促す Pit-1 の調節機構に関して非常に複雑な相互作用の経路が存在している。現在も、Prop1 や Pit-1 を含む多くの成長関連因子の機能や構造の解析が進められており (Pfaffle and Klammt, 2011; Correa *et al.*, 2019)、これらの異常によって Gh 欠損を含む複合型下垂体ホルモン欠損症を発症することも明らかになっている (Wu *et al.*, 1998)。

以上のように、哺乳動物において Gh をはじめとした成長関連因子は複雑な制御メカニズムの中で相互に作用しており、体の大きさの調節メカニズムの理解を図る上で、それぞれの成長関連因子の特性の解明は重要な課題である。しかしながら、世界最小級の体躯を有するアフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) において、これらの成長関連因子、特に Gh-Igf1 axis に着目した研究は全く行われていない。

本章では、*M. minutoides* の成長関連因子の分子生物学的解析を行い、*M. minutoides* における体の大きさの調節機構と Gh-Igf1 axis の因子の関連を調べることにした。

材料と方法

1. 実験動物

本研究で用いた *Mus minutoides* (Increase, Inc. および Pet shop YANOHASHI) は、購入後すぐに実験に供した。また、*Mus musculus* として C57BL6/JJmsSlc マウス (Japan SLC) を用い、山口大学先端実験動物学研究施設 (ARCLAS) にて明時間 12 時間、暗時間 12 時間で飼育し、購入後に 1 週間馴致させて各実験に用いた。全ての実験は山口大学実験動物委員会の承認 (No. 291) のもとに実施し、山口大学動物実験指針に従って実施した。

2. 試薬の調製

1M Tris-Cl (pH 8.0)

Tris 60.5 g を Milli-Q 水 400 mL に溶かし、塩酸によって pH 8.0 に調整後、Milli-Q 水を用いて全量を 500 mL とした。オートクレーブによって滅菌後、室温で保存した。

Tail buffer

1 M Tris-Cl (pH 8.0) 25 mL、0.5 M EDTA 100 mL および 10% SDS 50 mL を混合後、塩化ナトリウム (Wako) 2.5 g を溶かし、蒸留水を用いて全量を 500 mL として室温で保存した。

TE buffer

1 M Tris-Cl (pH 8.0) 5 mL および 0.5 M EDTA 1 mL を混合後、Milli-Q 水を用いて全量を 500 mL として室温で保存した。

3. 遺伝子配列の解析

M. minutoides 尾部からのゲノム DNA の抽出

M. minutoides の尾部 5 mm を採取して Tail buffer 250 μ L、proteinase K (10 mg/mL) 40 μ L を混合し、56°C で一晩静置した。尾部組織が完全に融解したのを確認した後、5 M 酢酸アンモニウム 200 μ L を加え、攪拌した。遠心分離 (15,000 rpm、4°C、20 分) し、上清を新しいチューブに移してイソプロパノール 500 μ L を加え、穏やかに混合した。DNA のペレットを確認した後、遠心分離 (15,000 rpm、21°C、10 分) を行い、上清を取り除いた。70%エタノール 500 μ L を加えて攪拌し、遠心分離 (15,000 rpm、4°C、5 分) を行い、上清を取り除いた。その後、風乾して TE buffer 100 μ L で溶解した。抽出したゲノムは、NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.) により濃度を測定して -20°C で保存した。

PCR 反応

Ensembl マウスデータベース (<https://asia.ensembl.org/index.html>) に登録されている *M. musculus* (Mouse (GRCm38.p6))、*Mus pahari*、*Mus spretus* の *Gh* 遺伝子および *Prop1* 遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを設計した。設計したプライマーを表 1-1 に示す。PCR 反応には、抽出した *M. minutoides* のゲノム DNA または cDNA を用い、94℃ 3 分、(94℃ 30 秒、64℃ 45 秒、72℃ 45 秒) x 35 cycle、72℃ 1 分の条件で行った。

電気泳動

PCR 産物は 1.5%または 2.0%アガロースゲル を用いて電気泳動 (100 V、25~30 分間) を行い、エチジウムブロマイドで 10 分間染色して洗浄後、観察した。

PCR 産物の精製

電気泳動を行ったアガロースゲルから目的のサイズのバンドを切り出し、FastGene Gel/PCR Extraction Kit (Nippon Genetics) を用いて、プロトコルに従って増幅した DNA 断片を抽出した。いくつかの DNA 断片については、PCR および精製をさらに 1~2 回行った。精製した PCR 産物は NanoDrop 2000 により濃度を測定し、-20℃で保存した。

塩基配列およびアミノ酸配列の解析

精製した DNA の塩基配列の決定は、山口大学遺伝子実験施設に委託した。得られた配列データは ApE を用いて解析し、*M. minutoides* の *Gh* 遺伝子および *Prop1* 遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列を決定した。さらに、これらの塩基配列から推測されるアミノ酸配列について CLUSTALW (<https://www.genome.jp/tools-bin/clustalw>) を用いて解析し、アラインメントを行った。

系統解析

決定した *M. minutoides* の塩基配列から推測されるアミノ酸配列および Ensembl マウスデータベース上の各種脊椎動物のアミノ酸配列をもとに、MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) を用いて近隣結合法 (Neighbor joining method) により行った。

4. 遺伝子発現解析

total RNA の抽出および逆転写反応

M. minutoides または *M. musculus* の組織 (最大 100 mg) を採取して 1 mL の ISOGEN II (NIPPON GENE) 中でホモジェナイズし、RNase free 水 400 μ L を加えて混合し、10 分間室温で静置した。遠心分離 (12,000 \times g、21 $^{\circ}$ C、15 分) を行い、上清を新しいチューブに移して p-Bromoanisole 5 μ L を加えて混合し、5 分間室温で静置した。遠心分離 (12,000 \times g、21 $^{\circ}$ C、10 分) を行い、上清を新しいチューブに移してイソプロパ

ノール 1 mL を加えて混合し、10 分間室温で静置した。RNA のペレットを確認した後、遠心分離 (12,000 x g、21°C、10 分) を行い、上清を除き、75%エタノール 500 μ L を加えて攪拌し、遠心分離 (8,000 x g、4°C、3 分) を行った。その後、RNase free 水 200 μ L で溶解した。抽出した total RNA は、NanoDrop 2000 により濃度を測定して-80°C で保存した。total RNA の逆転写は QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN) を用いて付属のプロコルに従って行った。

qRT-PCR

Gh 遺伝子について、決定した *M. minutoides* の塩基配列および Ensembl マウスデータベース上の *M. musculus* の塩基配列を参考にプライマーを設計した。設計したプライマーを表 1-2 に示す。合成した cDNA から KAPA SYBR Fast qPCR Kit (Nippon Genetics) を用いて、CFX96 Touch Deep Well リアルタイム PCR 解析システム (Biorad) を使用し、95°C 3 分、(95°C 3 秒、60°C 20 秒) x 40 cycle の温度条件で qRT-PCR を行った。*Gh* 遺伝子の発現量は *Gapdh* 遺伝子の発現量を用いて標準化し、相対 CT 法によって解析した。結果は平均値 \pm 標準偏差として示した。

5. 統計学的処理

値は t 検定によって有意差の検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありと判断した。

結果

1. 遺伝子配列の解析

M. minutoides の成長関連因子と体の大きさとの関連性を探るため、体の大きさの決定に強く影響すると考えられる *Gh* 遺伝子および *Prop1* 遺伝子を増幅するゲノム PCR を行うことにより、*M. minutoides* の塩基配列を決定し、*M. musculus* の塩基配列との比較および系統解析を行った。

Gh 遺伝子

Ensembl マウスデータベースにおいて、*M. musculus* の *Gh* 遺伝子は全長 1,595 bp の塩基からなり、その中には 5 つの exon が含まれる。塩基配列解析のために用いたプライマーは、*Gh* 遺伝子のゲノム領域を 3 つに分割して設計した。*M. minutoides* において *Gh* 遺伝子のゲノム領域と推定される部分の塩基配列と *M. musculus* の Ensembl マウスデータベースにおける配列を比較したところ、92.28%の塩基は一致していたが、exon を含めた領域全体にわたって塩基の置換、欠失、挿入が認められた (図 1-1A)。さらに、決定した *M. minutoides* の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、CLUSTALW を用いて *M. musculus* のアミノ酸配列と比較した。その結果、*M. musculus* のアミノ酸配列において 25 番目、37 番目はセリン (S) であるが、*M. minutoides* においてはそれぞれグリシン (G)、アラ

ニン (A) であり、計 2 ヶ所が異なっていた (図 1-1B)。この変異はタンパクの N 末端付近に認められ、それぞれ Gh タンパクの signal sequence および受容体に結合すると考えられる機能領域に存在していた。また、推定アミノ酸配列の残基数は *M. musculus* と同じ 216 個であった。次に、MEGA X を使用し、Gh 遺伝子のアミノ酸配列を用いた系統解析を行った (図 1-1C)。作成した系統樹において、*M. minutoides* や *M. musculus* などの *Mus* 属だけでなく、ラット (*Rattus norvegicus*) やゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) を含む齧歯類のクラスターが形成された。また、*M. minutoides* は *Mus* 属の中でも早期に分岐していた。

Prop1 遺伝子

Ensembl マウスデータベースにおいて、*M. musculus* の *Prop1* 遺伝子は全長 2,960 bp の塩基からなり、その中には 3 つの exon が含まれる。塩基配列解析のために用いたプライマーは、*Prop1* 遺伝子のゲノム領域を 7 つに分割して設計した。Gh 遺伝子と同様に、*M. minutoides* において *Prop1* 遺伝子のゲノム領域と推定される部分の塩基配列と Ensembl マウスデータベースにおける *M. musculus* の配列を比較したところ、88.78% の塩基は一致していたが、exon を含めた領域全体にわたって塩基の置換、欠失、挿入が認められた (図 1-2A)。推定されるアミノ酸配列においても種間の違いが認められた。推定されるアミノ酸残基数は *M. musculus* と同じ 223 個であったが、合計 10 ヶ所が異なっていた

(図 1-2B)。 *M. minutoides* と *M. musculus* のアミノ酸残基の違いは N 末端と C 末端付近に集中しており、Prop1 タンパクの転写活性化に関与する領域に存在していた。また、推定アミノ酸配列を用いた系統解析では、 *Gh* 遺伝子の系統樹と同様に *Mus* 属以外の齧歯類を含むクラスターが形成され、 *M. minutoides* は *Mus* 属の中で早期に分岐していた (図 1-2C)。

2. 遺伝子発現解析

次に、 *M. minutoides* の下垂体における *Gh* 遺伝子の発現量と体の大きさの関連を調べるため、qRT-PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。 *Gh* 遺伝子の発現量は *Gapdh* 遺伝子の発現量を用いて標準化し、その値を用いて *M. minutoides* と *M. musculus* の発現量を定量的に比較した。その結果、種間の *Gh* 遺伝子の発現量の有意差は認められなかったが、 *M. minutoides* における発現量が *M. musculus* の発現量よりも高い傾向にあった (図 1-3A)。qRT-PCR を行ったのち、増幅産物の電気泳動を行ったが、増幅産物のサイズに違いはなく、PCR 産物の増幅効率が異なっている可能性はなかった (図 1-3B)。

考察

本章では、哺乳動物の中でも最小級の大きさである *M. minutoides* の成長関連因子について、塩基配列を解析し、*M. musculus* と比較することによって、分子レベルにおける *M. minutoides* の特性を考察した。本研究で解析した成長関連因子として、哺乳動物の体の大きさに大きな影響を与えていると考えられる Gh-Igf1 axis の起点である Gh 遺伝子と下垂体前葉においてソマトトロープの分化を誘導する *Prop1* 遺伝子を解析対象とした。

M. minutoides の Gh 遺伝子の解析では、*M. musculus* の Gh 遺伝子の塩基配列と比較して多数の差異が認められ、さらに推定アミノ酸配列は、Gh タンパクのアミノ酸残基数は同じであったが、*M. musculus* の Gh タンパクのアミノ酸残基と比較して N 末端付近の 2 つに差異が認められた。過去の研究によると、*M. musculus* において 25 番目のアミノ酸のセリン (S) は合成された Gh の細胞内局在を決定し、細胞外への分泌に大きく関与する signal sequence の一部である (Li and Dixon, 1971)。*M. minutoides* の Gh タンパクにおける推定アミノ酸配列の 25 番目はグリシン (G) であったため、Gh タンパクの異常な細胞内局在や細胞内での輸送および細胞外への分泌の効率低下などの影響がある可能性が考えられる。また、*M. musculus* の Gh タンパクにおける 37 番目のアミノ酸のセリン (S) は、受容体に結合してシグナル伝達を行うホルモンとしての重要な機能を担う領域の

一部である。*M. minutoides* の Gh タンパクにおいて、推定アミノ酸配列の 37 番目はアラニン (A) であり、*M. musculus* とは Gh シグナル伝達の効率が異なっている可能性が考えられた。

Gh 遺伝子の複数の哺乳動物における系統解析では、属の異なる動物から構成された齧歯類のクラスターが形成され、さらにその内部に *Mus* 属のクラスターを形成していた。*M. minutoides* も *Mus* 属のクラスター内に位置していたが、特にその中でも早期に分岐していたことから、*M. minutoides* の Gh 遺伝子は *Mus* 属の中でも進化の早い段階で独自の変化が起こった可能性が考えられる。しかし、属を超えるほどの系統学的特徴を有していなかったことから、Gh のアミノ酸配列のみではなく、シグナル伝達経路を含む Gh の調節機構にも大きな機能的な違いが存在している可能性も考えられる。

M. minutoides の *Prop1* 遺伝子の解析では、Gh 遺伝子と同様に、*M. musculus* の *Prop1* 遺伝子の塩基配列と比較して多数の差異が認められた。*M. minutoides* の *Prop1* 遺伝子の推定アミノ酸配列においては、N および C 末端付近の合計 10 個のアミノ酸が *M. musculus* と異なっていた。*Prop1* 遺伝子は発生初期に下垂体前駆細胞において発現する下垂体特異的な転写因子である。タンパクの配列中には DNA 結合部位を持ち、結合した遺伝子は結合部位の下流に存在する転写促進ドメインによって転写が活性化される (Pfaffle *et al.*,

1999; Correa et al., 2019)。さらに、*Prop1* 遺伝子は、Gh を産生するソマトトロープだけでなくプロラクチンを産生するラクトロープおよび甲状腺刺激ホルモンを産生するチロトロープの分化を決定する *Pit-1* 遺伝子の発現を支配している (Pfaffle and Klammt, 2011)。*M. musculus* においては、アミノ酸配列 151 番目のプロリン (P)、155 番目のグリシン (G)、161 番目のアラニン (A)、169 番目のセリン (S)、171 番目のセリン (S)、179 番目のアラニン (A) は転写促進ドメイン内に存在している (Wu et al., 1998; Pfaffle and Klammt, 2011)。*M. minutoides* の推定アミノ酸配列において、151 番目がセリン (S)、155 番目がトレオニン (T)、161 番目がバリン (V)、169 番目がアスパラギン (N)、171 番目がアラニン (A)、179 番目がグリシン (G) であったことは、*M. minutoides* において *Pit-1* 遺伝子の発現ならびに機能が *M. musculus* とは異なっている可能性が考えられた。例えば、*Prop1* 遺伝子のホモ変異マウスでは、*Pit1* 遺伝子の発現に異常が生じ、その結果アポトーシスが生じるためソマトトロープを含む下垂体の形成不全が生じる。*M. minutoides* における *Prop1* 遺伝子の特性が、*M. minutoides* 下垂体における成長関連因子の分泌に影響を与えている可能性も考えられる。複数の哺乳動物における系統解析では、*Prop1* 遺伝子は *Gh* 遺伝子と同様に、齧歯類のクラスターおよび *Mus* 属のクラスターを形成し、さらに *M. minutoides* は *Mus* 属の中で早期に分岐していた。しかし、*Gh* 遺伝子と比較して、それぞれの動物種間での進化距離が大きいことから、*Prop1* 遺伝子においてはアミノ酸配列の多様性があり、*M. minutoides* の矮小性と直接的に関連していない可

能性が考えられた。

成長関連因子の中でも、体の大きさに強い影響を与える *Gh* 遺伝子および *Prop1* 遺伝子において、塩基配列のみならず推定アミノ酸配列においても *M. minutoides* の独自の配列が認められ、独自に進化した可能性が示された。しかしながら、*M. minutoides* における独自の塩基配列や推定アミノ酸配列が、遺伝子の機能に与える直接的な影響は現時点では不明である。今後は、まず動物培養細胞などを用いて、*M. minutoides* 独特の配列に置き換えた成長因子の遺伝子導入実験などによって、*M. minutoides* 特有の遺伝子の特性や機能を解析する必要がある。

下垂体における *Gh* 遺伝子の発現解析を行ったところ、*M. minutoides* において *M. musculus* よりも発現量が高い傾向が認められた。ヒトにおいては、成長ホルモン受容体 (*Growth hormone receptor: GHR*) 遺伝子の変異によって発症する小人症であるラロン症候群 (Laron *et al.*, 1966; Godowski *et al.*, 1989; Schaefer *et al.*, 1994) や、その病態モデルとして開発された *Ghr* 遺伝子のノックアウトマウス (Zhou *et al.*, 1997) やノックアウトブタ (Hinrichs *et al.*, 2018) においては、矮小個体となるとともに *Ghr* 遺伝子の発現量低下、さらには *Gh* 遺伝子の発現量増加を伴うことが報告されている。本研究において *M. minutoides* における *Gh* 遺伝子が高い発現を示した結果から、*M. minutoides* の矮小性はラロン症候群のヒトや動物と生理的な状態が類似している可能性も考えられる。

以上、本章においては、哺乳動物の中でも世界最小級の大きさである *M. minutoides* において、成長関連因子 *Gh* 遺伝子および *Prop1* 遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列の解析を行い、分子レベルでの特徴を明らかにするとともに、*M. minutoides* の矮小性には *Gh* 遺伝子が関与している可能性を示した。しかしながら、体の大きさの決定に関わる因子として *Gh* 遺伝子以外にも複数の成長関連因子が関与していると考えられるため、哺乳動物の体の大きさを制御するメカニズムの分子生物学的基盤をさらに詳しく解明するためには、*Ghr* 遺伝子やその下流に位置する *Igf1* 遺伝子、下垂体転写因子の調節機構として機能する Wnt シグナル伝達経路 (Zhang *et al.*, 2010) などについて、より詳細な解析が必要である。本章において、*M. minutoides* の *Gh* 遺伝子の発現など特徴的な実験結果が得られたので、続いて第2章では、Gh-Igf1 axis の主要な構成要素のひとつであり、Gh の受容体である *Ghr* に着目し、解析を行うこととした。

図1-1 *M. minutoides*におけるGh遺伝子の解析

- (A) Gh遺伝子のゲノム領域のアラインメント解析。上段に*M. musculus*、下段に*M. minutoides*の塩基配列を示す。*は塩基が一致している箇所を示す。
- (B) Ghタンパクのアラインメント解析。上段に*M. musculus*、下段に*M. minutoides*の推定アミノ酸配列を示す。*はアミノ酸残基が一致している箇所を示す。
- (C) 近隣結合法 (Neighbor joining method) によって作成した系統樹。各ノードにブートストラップ値を、左下に進化距離を示す。

A

```

Mus_musculus      TTGGGTCGAGGAAAAAGGTAGGGTATAAAAAGGACGCAAGGACCAAGTCCAGCATCTAGAGTCCAGATTCCAACTGCTCAGAGTCTGTGGACAGATCACTGTTGGCAATGG
Mus_minutoides    TTGGGTCGAGGAAAAAGGTAGGGTATAAAAAGGACGCAAGGACCAAGTCCAGCATCTAGAGTCCAGATTCCAACTGCTCAGAGTCTGTGGACAGATCACTGTTGGCAATGG
*****

Mus_musculus      CTACAGTAAGCATGCGCAATCCCGTGGGTGTGTTTGGGACCAAGGCCCCGGAAGTGGATCTGAGGCTTCTAATGTGAGTGCCTTCCAATCTGCCATGTTGGGAATACTCTGG
Mus_minutoides    CTACAGTAAGCATG-----GGTGTGTTTGGGACCAAGGCCCCGGAAGTGGATCTGAGGCTTCTAATGTGAGTGCCTTCCAATCTGCCATGTTGGGAATACTCTGG
*****

Mus_musculus      GTCCCTATGGGGATTGGGAGAGATCGCCATTGCTCCAGGTTTCTCCGCTCTCTGCTCTCTCT-----AGACTCTGGACTCTGGCTCTGACCGTCAGCTGCTCTGCTGCTC
Mus_minutoides    GTCCCTATGGGGATTGGGAGAGATCGCCATTGCTCCAGGTTTCTCCGCTCTCTGCTCTCTCTCTCTCTAGACTCTGGACTCTGGCTCTGACCGTCAGCTGCTCTGCTGCTC
*****

Mus_musculus      TGGCCTCAGGAGGCTAGTGTCTTTCCGCCATGCCCTGTGCAGTCTGTTTTCTAATGCTGTGCTCCAGCCAGCACCTGCACCAGTGGCTGCTGACACCTACAAGAGTTGTAAGT
Mus_minutoides    TGGCCTCAGGAGGCTAGTGTCTTTCCGCCATGCCCTGTGCAGTCTGTTTTCTAATGCTGTGCTCCAGCCAGCACCTGCACCAGTGGCTGCTGACACCTACAAGAGTTGTAAGT
*****

Mus_musculus      TCCCC-AGAGATGGGTGCCCGTGTGGAAGCAGGAAGGGGCGAGTCCACCCATACTCTGCCCCAGGAAGTCAATTGAGGGAACATGGGGTAGGGGAATCTTAGCAATGCTGTA
Mus_minutoides    TCCCC-AGAGATGGGTGCCCGTGTGGAAGCAGGAAGGGGCGAGTCCACCCATACTCTGCCCCAGGAAGTCAATTGAGGGAACATGGGGTAGGGGAATCTTAGCAATGCTGTA
*****

Mus_musculus      CCATAGTAATGATGGTGACGAGACAAGCTGGTCCCTCAGTGACCACCTCTTCCAGGAGCTGTCTACATCCCGAGGGACAGCGCTATTCCATTCAGAATGCCAGGCTGCTTTCT
Mus_minutoides    CCATAGTAATGATGGTGACGAGACAAGCTGGTCCCTCAGTGACCACCTCTTCCAGGAGCTGTCTACATCCCGAGGGACAGCGCTATTCCATTCAGAATGCCAGGCTGCTTTCT
*****

Mus_musculus      GCTTCTCAGAGACATCCCGGCCCCACAGGCAAGGAGGAGCCAGCAGAGAACCGTGAAGTGTCCAGGCTTGTCTGCACAAATCCTCGTTTCCCTCCATGACGCCCTAAGTCACT
Mus_minutoides    GCTTCTCAGAGACATCCCGGCCCCACAGGCAAGGAGGAGCCAGCAGAGAACCGTGAAGTGTCCAGGCTTGTCTGCACAAATCCTCGTTTCCCTCCATGACGCCCTAAGTCACT
*****

Mus_musculus      CAGGCCAGGGACAGCTCTCCCTGAAGCTGGGTAACTG66GAGTCCAGGACAGAGTCACTAGGAATACACTAACCAGCCCTTTTTTCCCTCAGGACATGGAATGCTTCC
Mus_minutoides    CAGGCCAGGGACAGCTCTCCCTGAAGCTGGGTAACTG66GAGTCCAGGACAGAGTCACTAGGAATACACTAACCAGCCCTTTTTTCCCTCAGGACATGGAATGCTTCC
*****

Mus_musculus      GCTTCTCGCTGCTCATCAGTCTGGTGGGCCGCTGCAGTTCTCAGCAGGATTTACCAACAGCCTGATGTTCCGCACCTCGGACCGTGTCTATGAGAACTGAAAGACCTGG
Mus_minutoides    GCTTCTCGCTGCTCATCAGTCTGGTGGGCCGCTGCAGTTCTCAGCAGGATTTACCAACAGCCTGATGTTCCGCACCTCGGACCGTGTCTATGAGAACTGAAAGACCTGG
*****

Mus_musculus      AAGAGGGCATCCAGGCTCTGATGCAGGTGAGGATGG-----TAGCTGGGGTTATGCCTGGAGCTAGTGGG-GCTCACTG-TTACCCTGTCAGCCCTTAGACC
Mus_minutoides    AAGAGGGCATCCAGGCTCTGATGCAGGTGAGGATGG-----TAGCTGGGGTTATGCCTGGAGCTAGTGGG-GCTCACTG-TTACCCTGTCAGCCCTTAGACC
*****

Mus_musculus      CTTGAGAAGGCTCTTCTTCTTCTTATGAACTTTCCTTATGAAGCTCCAGGCTTTCCTTGGTCTGGGGTGGAGGAGGACAGCTCCCGAGTCTCTGCCCTTCTTCCACAGGAGC
Mus_minutoides    CTTGAGAAGGCTCTTCTTCTTCTTATGAACTTTCCTTATGAAGCTCCAGGCTTTCCTTGGTCTGGGGTGGAGGAGGACAGCTCCCGAGTCTCTGCCCTTCTTCCACAGGAGC
*****

Mus_musculus      TGGAAAGTGGCAGCCCCGTTGGGAGATCTCAAGCAAACTATGACAAAGTTTACGCAACATGCGAGGACGAGCGCTGCTCAAAAATATGGGCTGCTCTGCTCTCAAGA
Mus_minutoides    TGGAAAGTGGCAGCCCCGTTGGGAGATCTCAAGCAAACTATGACAAAGTTTACGCAACATGCGAGGACGAGCGCTGCTCAAAAATATGGGCTGCTCTGCTCTCAAGA
*****

Mus_musculus      AGGACTGCAAAAGCGAGACTACTCTGGGTCATGAAGTGTGCGCTTTGTTGAAAGCAGCTGTGCTTCTAGCCACTACCAGTGTCTGCTGCACTCTCTGCTCTGCTG
Mus_minutoides    AGGACTGCAAAAGCGAGACTACTCTGGGTCATGAAGTGTGCGCTTTGTTGAAAGCAGCTGTGCTTCTAGCCACTACCAGTGTCTGCTGCACTCTCTGCTCTGCTG
*****

Mus_musculus      CCCCTGGCAACTGCCCGCTGCTTGTCTAATAAAAATAAGATGCATC
Mus_minutoides    CCCCTGGCAACTGCCCGCTGCTTGTCTAATAAAAATAAGATGCATC
*****

```


B

```

Mus_musculus      MATDSRTSWLLTVSLLCLLWPQEASAFAPAMPLSSLFSNAVLRAQHLHQLAADTYKEFERA
Mus_minutoides    MATDSRTSWLLTVSLLCLLWPQEAGAFAPAMPLSSLFSNAVLRAQHLHQLAADTYKEFERA
*****

Mus_musculus      YIPEGQRYSIQNAQA AFCSETIPAPTGKEEAQRTDMELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSR
Mus_minutoides    YIPEGQRYSIQNAQA AFCSETIPAPTGKEEAQRTDMELLRFSLLLIQSWLGPVQFLSR
*****

Mus_musculus      IFTNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRVGQILKQTYDKFDANMRSDDAL
Mus_minutoides    IFTNSLMFGTSDRVYEKLDLEEGIQALMQELEDGSPRVGQILKQTYDKFDANMRSDDAL
*****

Mus_musculus      LKNYGLLSCFKKDLHKAETYL RVMKCRRFVSSCAF
Mus_minutoides    LKNYGLLSCFKKDLHKAETYL RVMKCRRFVSSCAF
*****
    
```

C

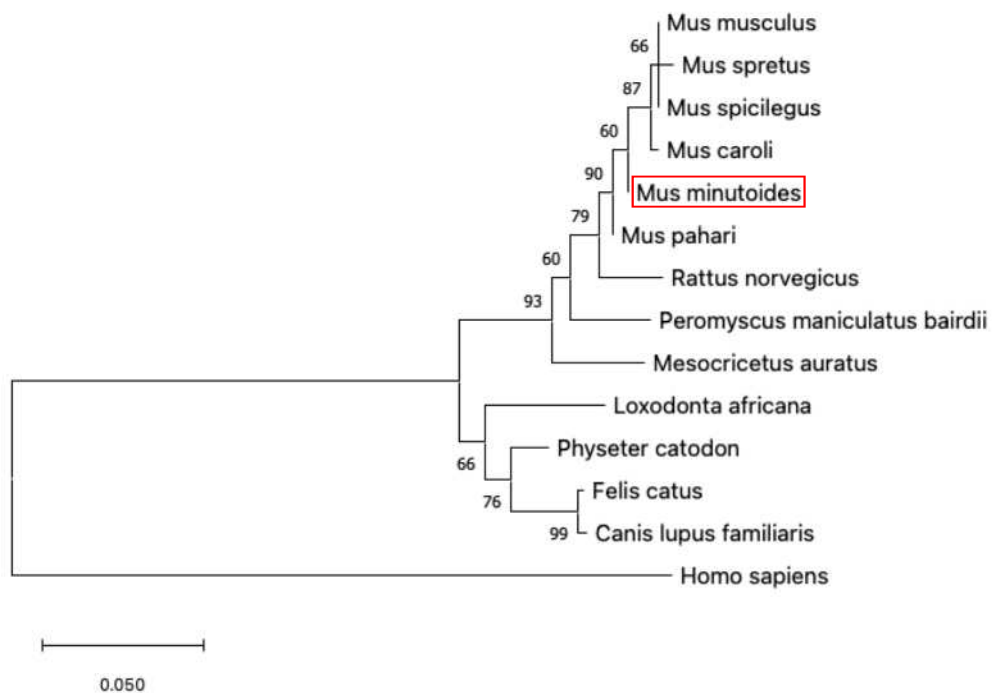


図1-2 *M. minutoides*におけるProp1遺伝子の解析

- (A) Prop1遺伝子のゲノム領域のアラインメント解析。上段に*M. musculus*、下段に*M. minutoides*の塩基配列を示す。*は塩基が一致している箇所を示す。
- (B) Prop1タンパクのアラインメント解析。上段に*M. musculus*、下段に*M. minutoides*の推定アミノ酸配列を示す。*はアミノ酸残基が一致している箇所を示す。
- (C) 近隣結合法 (Neighbor joining method) によって作成した系統樹。各ノードにブートストラップ値を、左下に進化距離を示す。

A

Mus_musculus	GTGAGAAGTAAAGAGAAAACAGAGCAGATCTGGAAAGTAGAGCAGAGAGAAAACCTGGGCAAAGCAGAGAGAGAGAAATGAGATGTCAATTCAGAGAAAGGATGACGGGTTAGG
Mus_minutoides	GTGAGAAGTAAAGAGAAAACAGAGCAGATCTGGAAAGTAGAGCAGAGAGAAAACCTGGGCAAAGCAGAGAGAGAGAAATGAGATGTCAATTCAGAGAAAGGATGACGGGTTAGG
Mus_musculus	AAAAGGGAAA--CTGTGAGAAAACAGGTATCTAGCTATATCTAGCTATACTACACACACACACACACACACACACAGAGCAAGGGACAGACTCAGAAAAGGTAGAAG
Mus_minutoides	AAAAGGGAAA--CTGTGAGAAAACAGGTATCTAGCTATATCTAGCTATACTACACACACACACACACACACACAGAGCAAGGGACAGACTCAGAAAAGGTAGAAG
Mus_musculus	GTAGAAACAGGGAGAGAAGACAAGAAACAAGACAAGATAGACAGAAAGCAGAGAGAGAACTTCAGGGAGTCACAGACTAGAGGCAGCAGGCTAGACCATCTTGTTGGTGGGTCAG
Mus_minutoides	GTAGAAACAGGGAGAGAAGACAAGAAACAAGATAGACAGAAAGCAGAGAGAGAACTTCAGGGAGTCACAGACTAGAGGCAGCAGGCTAGACCATCTTGTTGGTGGGTCAG
Mus_musculus	CAATGGAAGCTCAAGAAAGGAGCATCAGAAAAGCAAACGAAGGGTATGCCCTGTGGCGATCCTGCCCTGAGCCAGAGTGGCCTCTGGACCTCTGATCTCCACGGTAGGTGAGTAA
Mus_minutoides	CAATGGAAGCTCAAGAAAGGAGCATCAGAAAAGCAAACGAAGGGTATGCCCTGTGGCGATCCTGCCCTGAGCCAGAGTGGCCTCTGGACCTCTGATCTCCACGGTAGGTGAGTAA
Mus_musculus	TCCCAGGATGGGCTGGGTCCTCCGAGGGAGCAGCAGAGCTGGTCCGTGGGTCCGATTGCTTCAGAGAGTTGGTGTACTTCAGAGGTTGACAGGTTGAAAGCAGAATTGGAGCTT
Mus_minutoides	TCCCAGGATGGGCTGGGTCCTCCGAGGGAGCAGCAGAGCTGGTCCGTGGGTCCGATTGCTTCAGAGAGTTGGTGTACTTCAGAGGTTGACAGGTTGAAAGCAGAATTGGAGCTT
Mus_musculus	TGGGACCTTAGGAAGTGAACAGCAAGTCTTCGCTTACAGGTTGGAAGTGGGCCCTGGCTGAGGGAGTGGTGGAAAGCACCAGCTCAGCAGTGGGGCAGCAGCAAGCGGAA
Mus_minutoides	TGGGACCTTAGGAAGTGAACAGCAAGTCTTCGCTTACAGGTTGGAAGTGGGCCCTGGCTGAGGGAGTGGTGGAAAGCACCAGCTCAGCAGTGGGGCAGCAGCAAGCGGAA
Mus_musculus	GCCTTCGGTGGCCAGAGTCCTCTCTCCGAGGGAGCTGGAGGATAGGGTTTTCTCTCCAGAGGGCAGTCAGTGGCTGTCTGAAGACACTGGGTGCTTAGTTGGGGGGTGGGG
Mus_minutoides	GCCTTCGGTGGCCAGAGTCCTCTCTCCGAGGGAGCTGGAGGATAGGGTTTTCTCTCCAGAGGGCAGTCAGTGGCTGTCTGAAGACACTGGGTGCTTAGTTGGGGGGTGGGG
Mus_musculus	GAGCACACCGTTAGTTCCCTGGGGACAGGTGTCTACACGAGACCCTCCCTTCCTGGACCCACCTCCACAGGTTCTCTCTCTCTCTCTCT--GCCTGGTGGCT
Mus_minutoides	GAGCACACCGTTAGTTCCCTGGGGACAGGTGTCTACACGAGACCCTCCCTTCCTGGACCCACCTCCACAGGTTCTCTCTCTCTCTCTCT--GCCTGGTGGCT
Mus_musculus	CTTAGACTAAATATGTAGGGCTTAGGGAGCTTTGGGAAGAGAGGCAAGCCCTCCACGAGCTCAAGTCTTCGCGAGTGGTGGCAGGGCCAGGGCAGAGGTAAGATCAAGTCAA
Mus_minutoides	CTTAGACTAAATATGTAGGGCTTAGGGAGCTTTGGGAAGAGAGGCAAGCCCTCCACGAGCTCAAGTCTTCGCGAGTGGTGGCAGGGCCAGGGCAGAGGTAAGATCAAGTCAA
Mus_musculus	GAAGTTCACCCAGGGTGAAGAATGTGTTTGCATGAAGAGGGAAGGGGAACATCATCTTCGAGGGGGTGGGAGCAGGGGGCTGAGGAGAGAGAGCATATGAAAGGAGGTG
Mus_minutoides	GAAGTTCACCCAGGGTGAAGAATGTGTTTGCATGAAGAGGGAAGGGGAACATCATCTTCGAGGGGGTGGGAGCAGGGGGCTGAGGAGAGAGAGCATATGAAAGGAGGTG
Mus_musculus	CTTGGAAATGAAACTGCAGTGGCAGCAGAGAGCTGATGATAGACAGAAAGTACGCCCTCAAAGTGTCTCTGTGGTCAATGATGACAGGAAGTGACACAAAGCTGTG
Mus_minutoides	CTTGGAAATGAAACTGCAGTGGCAGCAGAGAGCTGATGATAGACAGAAAGTACGCCCTCAAAGTGTCTCTGTGGTCAATGATGACAGGAAGTGACACAAAGCTGTG
Mus_musculus	GGCTGCAGCAGAGCAGCGTAAGGCTGAAGGCAGGAGCTGTGATTGAAAGCTGACACAGTTCCTTGGGGGAGTCCACGGGAAAGCAAGCTCTCAGAACGAGCAGAACCGG
Mus_minutoides	GGCTGCAGCAGAGCAGCGTAAGGCTGAAGGCAGGAGCTGTGATTGAAAGCTGACACAGTTCCTTGGGGGAGTCCACGGGAAAGCAAGCTCTCAGAACGAGCAGAACCGG
Mus_musculus	GGAACCGCAACAGTGATGTGAGGATGGCTGGTGGTCCCATTAATAAGGGGCTCCCTCCGTTTTTCCCTCCTAGACAGGAGCTCTGAGGCTATAGGAGGCTCTCTGGTACAGA
Mus_minutoides	GGAACCGCAACAGTGATGTGAGGATGGCTGGTGGTCCCATTAATAAGGGGCTCCCTCCGTTTTTCCCTCCTAGACAGGAGCTCTGAGGCTATAGGAGGCTCTCTGGTACAGA
Mus_musculus	GCTGGGAGACTAAAGCTTTGCCACAGAGAGGCCGTCCCCTCCCTCCGCGGCCGCCACCACACTCAACCCAGCAGCAGCAGTGGAAACAGCTGGAGTCAGCTTTGGGAAGCAACGTA
Mus_minutoides	GCTGGGAGACTAAAGCTTTGCCACAGAGAGGCCGTCCCCTCCCTCCGCGGCCGCCACCACACTCAACCCAGCAGCAGCAGTGGAAACAGCTGGAGTCAGCTTTGGGAAGCAACGTA
Mus_musculus	TCCTGACATCTGGGCTCAGAGGGGGTTGCCAAGACACTGGCTCAGTGAAGCCAGAATCAGTGATGATGCCCTAAAGTCTCTGGGAAGAAACAAAGATCTCTCTGCTAGCTAGCTAGC
Mus_minutoides	TCCTGACATCTGGGCTCAGAGGGGGTTGCCAAGACACTGGCTCAGTGAAGCCAGAATCAGTGATGATGCCCTAAAGTCTCTGGGAAGAAACAAAGATCTCTCTGCTAGCTAGCTAGC
Mus_musculus	TGGGCTCAAAAATGGGACTTTAAACCTCATTTAAATATTCACAGTCAACACTACCTCAGTGCAGCTTAAGCTCAATCAGCTTAAAGTGGATATCAGATGTAGATCTAC
Mus_minutoides	TGGGCTCAAAAATGGGACTTTAAACCTCATTTAAATATTCACAGTCAACACTACCTCAGTGCAGCTTAAGCTCAATCAGCTTAAAGTGGATATCAGATGTAGATCTAC
Mus_musculus	AGAGGCATAGTTCAAGGGTAAGGCCCTACCTAGCCCATAAAGCCTTGCTGACTTTCAGCAGCTGACACAAACAAATAACAGTCAAGACCAGACTCAGCCCTTAAATATGGCA
Mus_minutoides	AGAGGCATAGTTCAAGGGTAAGGCCCTACCTAGCCCATAAAGCCTTGCTGACTTTCAGCAGCTGACACAAACAAATAACAGTCAAGACCAGACTCAGCCCTTAAATATGGCA
Mus_musculus	CAACTACAACAACAGCAGCAACCTAACTGTTCAACAGTGTAGCTATCTTGCTCTGACCAATCTTACATTTCTATAAACCTTACATTCGACGCTCAGCCCTAGAGTAGATGACTGA
Mus_minutoides	CAACTACAACAACAGCAGCAACCTAACTGTTCAACAGTGTAGCTATCTTGCTCTGACCAATCTTACATTTCTATAAACCTTACATTCGACGCTCAGCCCTAGAGTAGATGACTGA
Mus_musculus	ACTC--AACTCTTTTAAACCCAGCCTCCCTGTCTAAACAGTCTTCCTGGGCTTAGTCTCAGCACCCTTGAAGGAACTTCAACCTCTGGGGGAAGAAAATGGACTGGGT
Mus_minutoides	ACTC--AACTCTTTTAAACCCAGCCTCCCTGTCTAAACAGTCTTCCTGGGCTTAGTCTCAGCACCCTTGAAGGAACTTCAACCTCTGGGGGAAGAAAATGGACTGGGT
Mus_musculus	CTTATTGGAAGCTGCATTTCAGCTCAGGTTGTCAGAGCTGGGAGAGTGGCTGAGGTTGGAAGTAAGAGAGGTTTCTACTTCTCAGCAGCCTGACTCAGACAGCTCCTAGT
Mus_minutoides	CTTATTGGAAGCTGCATTTCAGCTCAGGTTGTCAGAGCTGGGAGAGTGGCTGAGGTTGGAAGTAAGAGAGGTTTCTACTTCTCAGCAGCCTGACTCAGACAGCTCCTAGT
Mus_musculus	GAGAGCAAGTACTCTTGTCCAGTGCACACAAGATGCTACTCTCTGCTGCTGGGGTATGAGACATTGGCACCTCAGCACAGGAGTGCATATGATGTGTCTCTCTCTCT
Mus_minutoides	GAGAGCAAGTACTCTTGTCCAGTGCACACAAGATGCTACTCTCTGCTGCTGGGGTATGAGACATTGGCACCTCAGCACAGGAGTGCATATGATGTGTCTCTCTCTCT
Mus_musculus	CTCCCAGGCTGGTTCCAGAACCCAGGGCTAAGCAACGGAAGCAAGAGCGGTCACTTCTCAGCGATAGCCATCTATCTACGGCCACTTCTGGTCTCTGCGAAGATCCTCTG
Mus_minutoides	CTCCCAGGCTGGTTCCAGAACCCAGGGCTAAGCAACGGAAGCAAGAGCGGTCACTTCTCAGCGATAGCCATCTATCTACGGCCACTTCTGGTCTCTGCGAAGATCCTCTG
Mus_musculus	CCTATCCCTACACTTATGGACACCACTCCACAGCGCCCTGTCTCCTATCCCTACAGCAGCTCTCCCTCCAGCCCTCTACGGTGCCTACTGCTCTCTCTCCAGCCTG
Mus_minutoides	CCTATCCCTACACTTATGGACACCACTCCACAGCGCCCTGTCTCCTATCCCTACAGCAGCTCTCCCTCCAGCCCTCTACGGTGCCTACTGCTCTCTCTCCAGCCTG
Mus_musculus	AGGACTGTACCCACTTTGCACCCAGCCCACTGGTCACTGGCTGCTCCCACTGCTCCCACTGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT
Mus_minutoides	AGGACTGTACCCACTTTGCACCCAGCCCACTGGTCACTGGCTGCTCCCACTGCTCCCACTGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCTGGCT
Mus_musculus	ACCCTCTCTCATAACTCTTGAACACAGAAAATGGGGCTCTCTTTCTCTCAAGGGTGAACCTAGAAACGGGGGTGGGG--
Mus_minutoides	ACCCTCTCTCATAACTCTTGAACACAGAAAATGGGGCTCTCTTTCTCTCAAGGGTGAACCTAGAAACGGGGGTGGGG--

B

```

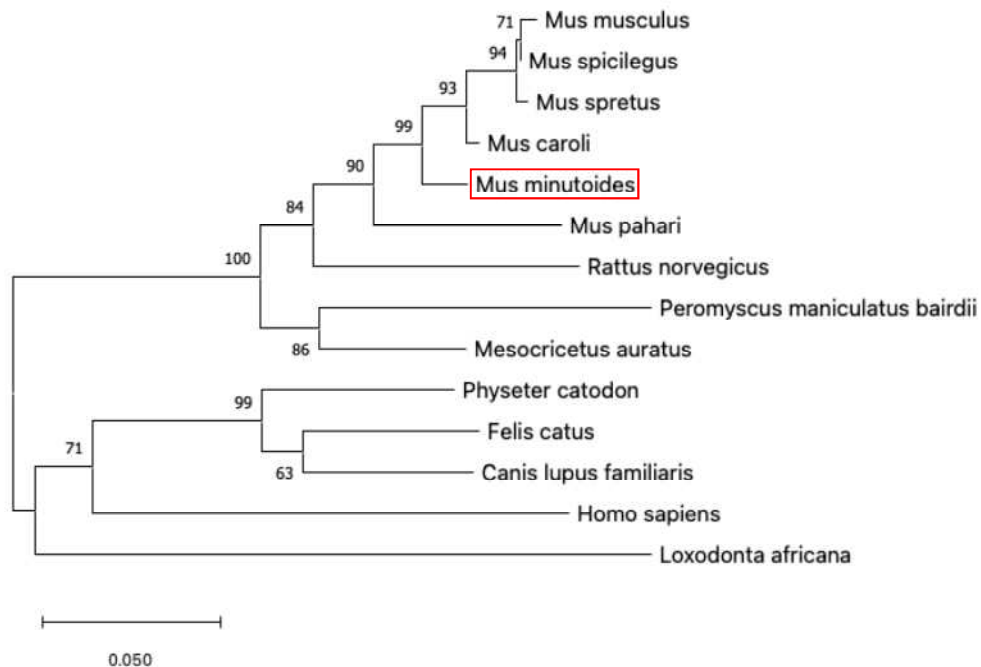
Mus_musculus      MEAQRRSHQEKQTKGHACGRSLPEPRVASGTLISTVDRSSEAYRRLSGTELGRPCLCPQR
Mus_minutoides    MEAQRRSHQEKQTKGHACGRSLPEPRVASGTLISTVDRSSEAYRRLSGTELGRPCLCPQR
*****  ***  *****

Mus_musculus      GRPHSRRRHRTTFNPAQLEQLESAGFRNQYPIWAREGLAQDTGLSEARIQVWFQNRRAK
Mus_minutoides    GRPHSRRRHRTTFNPAQLEQLESAGFRNQYPIWAREGLAQDTGLSEARIQVWFQNRRAK
*****

Mus_musculus      QRKQERSLLQPIAHLSTATFSGFLPESSAYPTYGTTPPPAPCFPHPYSHSLPSQPSTAA
Mus_minutoides    QRKQERSLLQPIAHLSTATFSGFLPESSAYSITYTTPPPVPCFPHPYNHSLPSQPSTGA
*****  ***  *****  *  *****  *

Mus_musculus      SLALPPQPEDWYPTLHPAPTGHLCPPPPPMFPLSLETPKSWN
Mus_minutoides    SLALPPQPEDWYPTLHPAPTGHLCPPPPPMFPLSLETPKSWN
*****
    
```

C



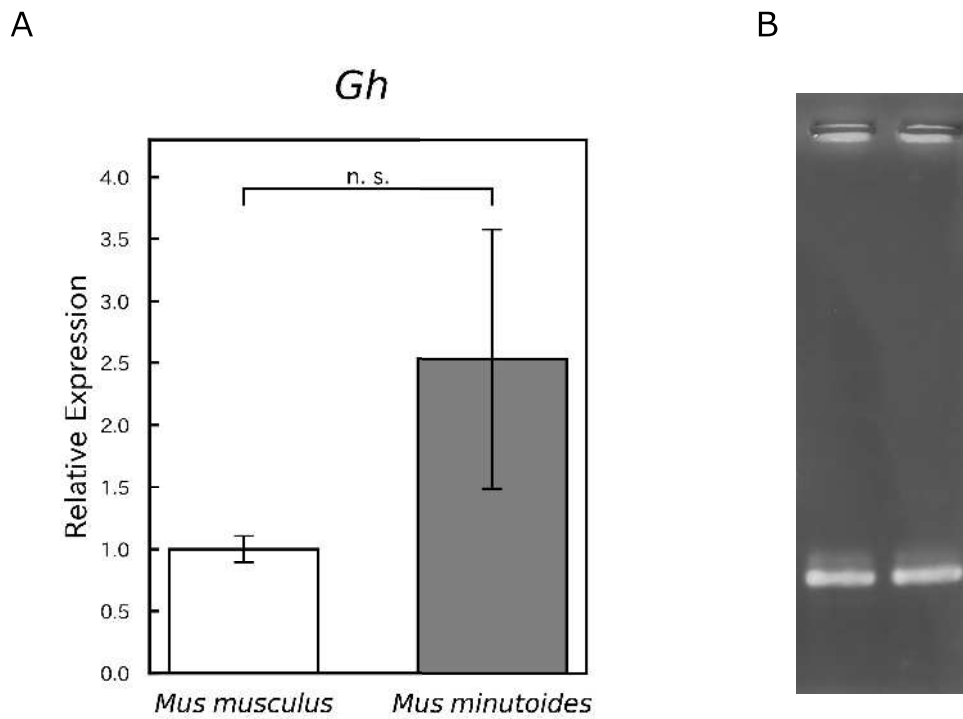


図1-3 下垂体における*Gh*遺伝子の発現解析

- (A) qRT-PCRを用いた*M. musculus*および*M. minutoides*の下垂体における*Gh*遺伝子の発現量の比較。
- (B) qRT-PCRによる増幅産物の電気泳動像を示す。

表1-1 ゲノムPCRに使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' → 3')
<i>Gh</i> 1	F TGTCAGTGGCCCCAGCCATG
	R GATTCCCCTACCCCATAGTCCCC
<i>Gh</i> 2	F GAGTTCGTAAGTTCCCCAGAGATGG
	R CTGGATGCCCTCTTCCAGGTCC
<i>Gh</i> 3	F GCTCATCCAGTCATGGCTGGG
	R TGACACAACCTGCTCCATCCCATAAC
<i>Prop1</i> 1	F GGGCCAGGAGGAGGTCTCTTC
	R CCAAAGCCAATGCGGACCCAC
<i>Prop1</i> 2	F AGGGTCATGCCTGTGGCCGATC
	R CCTGCAGGAACCTTGAGCTCGTG
<i>Prop1</i> 3	F CCCAGGTGTCTCCTCTTCCCTC
	R CCTATAAGCCTCAGAGCTCCTG
<i>Prop1</i> 4	F GGAACGAAGCAGAACACGGGG
	R GGCTTTACCCCTGAACTATGCCTC
<i>Prop1</i> 5	F TCCTGACATCTGGGCTCGAGAG
	R AAGTGTCTTCAAGTGGGGCTGAG
<i>Prop1</i> 6	F CGTG TAGCTATCTTGCCTCTGACC
	R GCTCTTGCTTCCGTTGCTTAGC
<i>Prop1</i> 7	F GCTCCAGTGACACAACAGATGCC
	R TTTCCAATCTTGAAGTGCACACCCC

表1-2 qRT-PCRに使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' → 3')
<i>Gh</i>	F CGAGGGACAGCGCTATTCCATTC
	R GCTTGAGGATCTGCCCAACACG
<i>Gapdh</i>	F GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	R CATACTTGGCAGGTTTCTCCAG

第 2 章

Mus minutoides の成長ホルモン受容体の 分子生物学的解析

緒言

哺乳動物の体の大きさを制御するシグナル因子や伝達経路は複数報告されているが、その中で最も古くから解析されている経路のひとつとして、成長ホルモン（Growth hormone: Gh）－インスリン様成長因子（Insulin-like growth factor 1: Igf1）軸（Gh-Igf1 axis）（Vasques *et al.*, 2019）が挙げられる。Gh-Igf1 axis は、下垂体前葉から分泌された Gh を、主に肝臓において高発現している成長ホルモン受容体（Growth hormone receptor: Ghr）が感知し、Janus kinase 2（Jak2）や Signal transducer and activator of transcription 5b（Stat5b）の活性化を介して Igf1 の発現を促し、Igf1 の血中濃度の上昇によって全身に多様な影響を与える経路である（Reh and Geffner, 2010; Vasques *et al.*, 2019）。

Gh-Igf1 axis の中でも、Ghr は特に重要な因子として位置付けられている。特にヒト（*Homo sapiens*）において、GHR タンパクの構造やシグナル伝達について解析されてきた。GHR タンパクは細胞外領域に3つのジスルフィド結合を持つが、そのうちの2つがタンパクのフォールディングおよびリガンド結合に重要であることが明らかになっている（van den Eijnden *et al.*, 2006）。また、GHR タンパクの細胞内領域には、プロリン（P）リッチな9つのアミノ酸残基で構成される JAK2 結合モチーフを有している。通常、GHR タンパクは2量体として存在し、それぞれに不活化状態の JAK2 分子が結合している

(Cunningham *et al.*, 1991; Argetsinger *et al.*, 1993)。1分子のGHタンパクの結合によってGHRタンパクの立体構造が変化することによって、JAK2タンパク同士的位置関係も変化し、JAK2が活性化する(Maharajan and Maharajan, 1993; Hackett *et al.*, 1995)。JAK2の活性化によってGHRの細胞内ドメインのチロシン残基がリン酸化され、STAT5aおよびSTAT5bなどSH2ドメインを持つタンパクの結合部位となるとともに、STATがリン酸化される(Hackett *et al.*, 1995; Hansen *et al.*, 1996)。最終的に、リン酸化されたSTATは核内に移行しIGF1などの標的遺伝子の発現を促進する(Mukherjee *et al.*, 2016)。

マウス (*Mus musculus*) の *Ghr* 遺伝子は15番染色体上に約270 kb にわたって存在する。*M. musculus* の *Ghr* タンパクは650個のアミノ酸残基で構成され、*H. sapiens* の GHR と同様にシグナルペプチド (1~24番目)、細胞外領域 (25~273番目)、膜貫通領域 (274~297番目)、細胞内領域 (298~650番目) のドメインに区分されている (Goujon *et al.*, 1994)。アミノ酸配列は *M. musculus* と *H. sapiens* の間で高度に保存されており、同様の JAK2 結合モチーフを有する。これまで *M. musculus* においても *Ghr* 遺伝子の機能の解析が進んでおり、特に *Ghr* 遺伝子のノックアウトの手法を用いた実験が多く行われてきた。*Ghr* 遺伝子が欠損した *M. musculus* は、矮小化および肥満といった外見上の特徴のみならず、糖尿病への関与、がんに対する抵抗性、寿命の延長などを示す (Coschigano *et*

al., 2003; List *et al.*, 2011)。さらに *Ghr* 遺伝子が欠損したブタ (*Sus scrofa*) においてもマウスと同様の表現型を示すことが明らかになっている (Cui *et al.*, 2015; Hinrichs *et al.*, 2018)。これらの表現型は、*H. sapiens* において *Ghr* 遺伝子の変異に起因する、小人症の一種であるラロン症候群の表現型に極めて類似しており、*Ghr* 遺伝子が欠損した *M. musculus* はラロン症候群の病態モデルとして用いられている (Zhou *et al.*, 1997)。このように、動物種を超えて類似した遺伝子機能を有することが予想されるため、*Ghr* 遺伝子は哺乳動物の体の大きさにおいて普遍的かつ重要な機能を有していると推測される。

以上、*Ghr* 遺伝子は哺乳動物の体の大きさを制御するメカニズムに密接に関連する重要な因子ではあるものの、最小級の哺乳動物であるアフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) において、*Ghr* 遺伝子に関する分子レベルでの研究はまったく行われていない。そこで本章では、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子の塩基配列やその発現特性について詳細な解析を行い、哺乳動物の体の大きさとの関連を考察した。

材料と方法

1. 実験動物

第1章 材料と方法に記載した条件で飼育し、実験を実施した。

2. 試薬の調製

0.2%ゼラチン溶液

ゼラチン (Sigma) 1.0 g を Milli-Q 水に溶かし、全量を 500 mL とした。オートクレーブによって滅菌し、4℃で保存した。

DMEM 培養液

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM、FUJIFILM Wako) 500 mL に、牛胎仔血清 (FBS) 55.55 mL、ペニシリン (180 U/mL)、ストレプトマイシン (100 µg/mL) を添加して DMEM 培養液とし、4℃で保存した。

PBS 溶液

Milli-Q 水に PBS tablet (Takara) 50 粒を溶かし、全量を 500 mL とした。オートクレーブによって滅菌し、10x PBS 溶液として室温で保存した。10x PSB 溶液を Milli-Q 水で

10 倍に希釈後、オートクレーブによって滅菌し、1x PBS 溶液として室温で保存した。

PET (PBS-EDTA-Trypsin) 溶液

1x PBS 溶液 500 mL に EDTA2Na (FUJIFILM Wako) 186 mg、トリプシン (Gibco)

1.25 g を溶かし、0.2 μm 径フィルターで濾過滅菌後、4°C または -20°C で保存した。

3. 遺伝子配列の解析

total RNA の抽出および逆転写反応

Mus minutoides または *Mus musculus* の線維芽細胞からの total RNA の抽出は、6 well プレート内で 90%コンフルエントになった細胞において、ReliaPrep RNA Cell Miniprep System (Prpmega) を用いて付属のプロトコルに従って行った。組織 (最大 100 mg) からの total RNA の抽出およびそれぞれの total RNA の逆転写は第 1 章 材料と方法に記載した方法で行った。

PCR 反応

Ensembl マウスデータベースに登録されている *M. musculus* (Mouse (GRCm38.p6))、*Mus pahari*、*Mus spretus* の *Ghr* 遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを設計した。設計したプライマーを表 2-1 に示す。PCR 反応は、第 1 章 材料と方法に記載した条件で行っ

た。

電気泳動

第1章 材料と方法に記載した方法で行った。

PCR産物の精製

第1章 材料と方法に記載した方法で行った。

塩基配列およびアミノ酸配列の解析

第1章 材料と方法に記載した方法で行った。

系統解析

第1章 材料と方法に記載した方法で行った。

タンパク質の機能予測および構造予測

決定した *M. minutoides* の塩基配列から推測されるアミノ酸配列を *M. musculus* のアミノ酸配列に変異が生じたものと仮定し、VaProS (<http://p4d-info.nig.ac.jp/vapros/>) を用いた4つのアルゴリズム (PolyPhen2、SIFT、PROVEAN、PANTHER) によってタン

パクの機能に与える影響を評価した。

また、決定した *M. minutoides* の塩基配列から推測されるアミノ酸配列によって形成される三次元構造を AlphaFold2 (Jumper *et al.*, 2021; Varadi *et al.*, 2022) によって予測した。

4. 初代線維芽細胞の樹立

安楽殺した *M. minutoides* ならびに *M. musculus* の背部から皮膚を採取し、0.2%ゼラチン溶液でコーティングした 24 well プレートに接着させ、DMEM 培養液内で 37℃、CO₂ 5%の条件下で培養した。培養液は1週間ごとに交換し、細胞の遊走を観察しながら適宜継代（遠心条件：300 x g、5分、室温）した。増殖した細胞は、CultureSure 凍結保存液（FUJIFILM Wako）に懸濁して-80℃または液体窒素内で保存した。

5. 遺伝子発現解析

qRT-PCR

Ghr 遺伝子および *Igf1* 遺伝子について、決定した *M. minutoides* の塩基配列および Ensembl マウスデータベース上の *M. musculus* の塩基配列を参考に、プライマーを設計した。設計したプライマーを表 2-2 に示す。PCR 反応および解析は、第1章 材料と方法に記載した方法で行った。

6. dwarf 配列の *in vitro* 機能解析

プラスミドの設計

Ghr 遺伝子の cDNA 配列をもとに *M. minutoides* および *M. musculus* の 5'-UTR (untranslated region: 非翻訳領域) に特異的なプライマーを設計して T4 Polynucleotide Kinase (Takara) によってリン酸基を付加後、KOD FX Neo (TOYOBO) を使用した PCR によって全長を増幅した。5'-UTR の増幅のために設計したプライマーを表 2-3 に示す。次に、それぞれの PCR 産物を pIRES2-EGFP プラスミド内の EGFP の上流に挿入した。さらに IRES 配列を除くため、プラスミド内の IRES 配列以外の全長を増幅するプライマーを設計して PCR を行い、末端を T4 DNA Ligase (Takara) で処理することによって、*M. musculus* の 5'-UTR を持つ pmus 5'-UTR-EGFP プラスミド (図 2-5A) ならびに *M. minutoides* の 5'-UTR を持つ pmin 5'-UTR-EGFP プラスミド (図 2-5B) を作製した。IRES 配列を除くために設計したプライマーを表 2-4 に示す。

レポーターアッセイ

プラスミドのトランスフェクション前日に、24 well プレートに 293T 細胞を 0.5×10^5 個/well の濃度で播種した。翌日、細胞が接着していることを確認してトランスフェクションを行った。Opti-MEM (Gibco) 100 μ L に pmus 5'-UTR-EGFP プラスミドま

たは pmin 5'-UTR-EGFP プラスミド 0.5 μg と PEI MAX 1.5 μL を加えて混和後、30 分間静置してトランスフェクション溶液とした。調整したトランスフェクション溶液の全量を 1 well の培養液中に添加した後、72 時間培養して EGFP の蛍光強度を GloMax Discover Microplate Reader (Promega) を用いて検出した。

7. 統計学的処理

値は t 検定によって有意差の検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありと判断した。

結果

1. *Ghr* 遺伝子における CDS の解析

体の大きさの調節に影響を与える *Ghr* 遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列について、*M. minutoides* ゲノムから増幅した CDS (coding sequence) の塩基配列を決定し、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子における特徴を調べるため、*M. musculus* の配列と比較および系統解析を行った。

Ensembl マウスデータベースにおいて、*M. musculus* の *Ghr* 遺伝子の cDNA 配列のうち、CDS は 1,953 bp の塩基配列であることがわかっている。*M. musculus* の *Ghr* 遺伝子増幅のために用いたプライマーは、*Ghr* 遺伝子の CDS を 4 つの領域に分割して設計した。*M. minutoides* において *Ghr* 遺伝子の CDS と推定される塩基配列と *M. musculus* の *Ghr* 遺伝子の CDS を比較したところ、塩基の置換、欠失、挿入に相当する、*M. musculus* とは異なる塩基対が全体にわたって認められた (図 2-1A)。次に、同定した *M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子の塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、CLUSTALW を用いて *M. musculus* のアミノ酸配列と比較した。その結果、*M. minutoides* において推定される *Ghr* タンパクの長さは *M. musculus* と同じ 650 アミノ酸残基であったが、*M. musculus* と異なるアミノ酸残基が 48 ヶ所見つかった (図 2-1B)。また、MEGA X を使用し、*Ghr* タンパクのアミノ酸配列の系統解析を行った結果、得られた系統樹において、*M. minutoides* や *M. musculus*

などの *Mus* 属だけでなく、ラット (*Rattus norvegicus*) やゴールデンハムスター (*Mesocricetus auratus*) を含む齧歯類のクラスターが形成された (図 2-1C)。また、*M. minutoides* は *Mus* 属の中でも進化的に早期に分岐していたことがわかった (図 2-1C)。

次に、*M. minutoides* の Ghr タンパクのアミノ酸配列において *M. musculus* と異なるアミノ酸残基がタンパクの機能に与える影響を調べるため、4つのアルゴリズムを用いた横断的予測を行うことができる VaProS による解析を行った (表 2-5)。VaProS はアミノ酸の置換の影響を評価するツールであるが、欠失や挿入は評価できないため、*M. musculus* と異なる 48 のアミノ酸残基のうち、46 のスコアを算出することとした。その結果、16 のアミノ酸残基の変化が Ghr タンパクの機能に影響している可能性が示され、その中でも 469 番目のプロリン (P) がロイシン (L) に置換している P469L は 4 つ全てのアルゴリズムにおいて有害な変異である可能性が高いと予測された。さらに、複数の脊椎動物の Ghr タンパクのアミノ酸配列を用いて、より詳細なアラインメント解析を行ったところ、比較を行った脊椎動物の中では 7 ヶ所のアミノ酸残基が *M. minutoides* でのみ異なっていた (図 2-1D)。続いて、AlphaFold2 を用いて *M. minutoides* と *M. musculus* において、Ghr タンパクの構造予測を行ったが、大きな違いは認められなかった (図 2-1E)。

2. 遺伝子発現解析

次に、*M. minutoides* の Ghr 遺伝子および *Igf1* 遺伝子の発現を調べるため、qRT-PCR

を用いて遺伝子発現解析を行った。第1章と同様に *Gapdh* 遺伝子を用いて標準化し、比較した。

M. minutoides 尾端片から樹立した線維芽細胞において、*Ghr* 遺伝子の発現量は *M. musculus* 線維芽細胞における発現量よりも有意に低かった (図 2-2A)。また、Gh-Igf1 axis において *Ghr* 遺伝子の下流に位置する *Igf1* 遺伝子の発現を調べたところ、*M. musculus* 線維芽細胞と比較して、*M. minutoides* 線維芽細胞での発現が有意に低かった (図 2-2B)。

続いて、生体の組織における *Ghr* 遺伝子の発現を調べた。*Ghr* 遺伝子を発現する主要な組織である肝臓をはじめ、心臓、肺、胃、筋肉における発現を解析したところ、今回調べた全ての組織において、*M. minutoides* における *Ghr* 遺伝子発現は *M. musculus* よりも有意に低く、特に肝臓においては *M. musculus* の約 10% の発現量であった (図 2-3A)。合わせて肝臓における *Igf1* 遺伝子の発現を調べたところ、線維芽細胞における *Igf1* 遺伝子の発現と同様に *M. minutoides* の発現が有意に低かった (図 2-3B)。

3. *Ghr* 遺伝子における 5'-UTR の解析

M. minutoides の *Ghr* 遺伝子の cDNA 配列解析において、PCR 産物の長さが *M. musculus* と異なっていたため、塩基配列を詳細に解析したところ、5'-UTR 内に *M. minutoides* に特異的な挿入配列 (本研究において「dwarf 配列」と命名) を発見した

(図 2-4A)。 *M. musculus* の 5'-UTR は exon 1 および exon 2 に位置し、長さは 240 bp であるが (図 2-4B)、 *M. minutoides* の 5'-UTR は 105 bp の dwarf 配列に加えて 2 塩基の欠失を含んでいたため 343 bp であった (図 2-4C)。 dwarf 配列について BLAST 解析 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を行ったところ、 *M. musculus* および *S. scrofa* の *Ghr* 遺伝子の intron 1 において類似配列が存在していた (data not shown)。

4. dwarf 配列の *in vitro* 機能解析

dwarf 配列が下流の遺伝子発現に与える影響を調べるため、 *M. minutoides* ならびに *M. musculus* の 5'-UTR の下流に EGFP が位置するプラスミド (図 2-5A、 B) を構築し、 293T 細胞へのトランスフェクションによって 5'-UTR の機能解析を行った。トランスフェクションの 72 時間後にそれぞれ細胞群の蛍光強度を比較したところ、 *M. minutoides* の 5'-UTR を持つプラスミドを導入した群 (minUTR-EGFP) は、 *M. musculus* の 5'-UTR を持つプラスミドを導入した群 (musUTR-EGFP) よりも蛍光強度が有意に低かった (図 2-5C、 D)。

考察

本章では、*M. minutoides* において、Gh-Igf1 axis を構成する成長関連因子の中でも中心的な因子である *Ghr* 遺伝子について塩基配列やその発現を中心に解析した結果、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子は特徴的な配列および発現動態を有していることが明らかになった。

M. musculus の *Ghr* 遺伝子のゲノム領域は約 270 kb であるが、*M. minutoides* においても同等の長さを有すると予想し、本研究においては cDNA を解析の対象とした。*M. minutoides* において、増幅がうまくいかなかったため 3'-UTR は配列を決定できなかったが、*Ghr* タンパクをコードする領域である CDS、ならびに翻訳調節に関与する 5'-UTR の配列を決定することができた。第1章で示した *Gh* 遺伝子および *Prop1* 遺伝子と同様に、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子の CDS 全長にわたって *M. musculus* と異なる塩基配列が認められた。*M. minutoides* の CDS から翻訳される *Ghr* タンパクのアミノ酸残基数は *M. musculus* と同じ 650 個であったが、48 のアミノ酸残基 (7.38%) が *M. musculus* と異なっており、*Gh* (0.93%) や *Prop1* (4.48%) よりも多かった。*Ghr* 遺伝子の系統解析では、*Gh* 遺伝子および *Prop1* 遺伝子と同様に齧歯類のクラスターおよび *Mus* 属のクラスターが形成され、*M. minutoides* は *Mus* 属の中で早期に分岐していたことから、*Ghr* 遺伝

子を含む *Gh* 遺伝子や *Prop1* 遺伝子などの *Gh* 関連遺伝子群は互いに類似した進化の方向性を持ち、一つの遺伝子集団としてのクラスターを徐々に形成された可能性も考えられた。

Ghr タンパクは膜結合型受容体であり、signal peptide、細胞外領域、膜貫通領域、細胞内領域に区分でき、細胞外領域は Gh 刺激の受容に、細胞内領域は受け取った刺激を細胞内で変換を介して遺伝子発現に調節に関与する (Smit *et al.*, 1996)。*M. musculus* と異なっていた *M. minutoides* の Ghr タンパクのアミノ酸残基のうち、16 アミノ酸残基が細胞外領域に、27 アミノ酸残基が細胞内領域に位置していた。46 アミノ酸残基について VaProS による解析を行ったところ、16 アミノ酸残基が cutoff 値を超え、Ghr タンパクの機能に影響を与える可能性が予測された。特に 469 番目のプロリン (P) がロイシン (L) に置換している P469L は VaProS 内の 4 つ全てのアルゴリズムにおいて、タンパクの機能に有害である変異であると判定された。この VaProS による予測結果から、これら 16 アミノ酸残基に着目し、*M. minutoides*、*M. musculus*、*R. norvegicus*、*S. scrofa*、*H sapiens* およびネッタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) の Ghr のアミノ酸配列を用いた詳細なアライメント解析を行ったところ、4ヶ所のアミノ酸残基 (Y204H、K213I、H479D、T642A (ex.: Y204H は、*M. musculus* において 204 番目のアミノ酸残基がチロシン (Y) であるが、*M. minutoides* においてはヒスチジン (H) であった)) は *M. minutoides* を除く哺乳動物で共通し、*M. minutoides* と他の脊椎動物種では *X. tropicalis* においてのみアミノ

酸残基が異なっていた。また、3ヶ所のアミノ酸残基（Y121H、P469L、S487N）は *M. minutoides* を除く5種の脊椎動物で共通していたが、*M. minutoides* でのみ異なっていた。以上の結果から、*M. minutoides* において脊椎動物の種を超えて高度に保存されている Ghr タンパクのアミノ酸残基が異なっており、*M. minutoides* の Ghr は独自の進化を遂げてきた可能性が示唆された。また、種分化の過程における *M. minutoides* の Ghr タンパクのアミノ酸配列の変化は、*M. minutoides* の Ghr タンパクのリガンド結合能やシグナル介在プロセスに変化や障害を生じ、Gh-Igf1 axis の体の大きさを調節する効率が他の *Mus* 属とは異なる可能性が考えられる。

AlphaFold2 による *M. minutoides* の Ghr タンパクの構造予測においては、*M. musculus* と大きな違いは認められなかった。*M. musculus* においては469番目、*H. sapiens* においては458番目にあたるプロリン（P）は、Ghr タンパクの細胞内ドメインに位置し、Gh 刺激を細胞内へ伝達するのに重要な役割を果たしていると考えられている（Goujon *et al.*, 1994; Lin *et al.*, 2018）。また、Ghr タンパクの391番目から569番目のアミノ酸配列が細胞内シグナル伝達に重要であるという報告もある（Rowland *et al.*, 2005）。*M. minutoides* において他の動物種と異なっていた469番目のプロリン（P）の重要性や情報生物学的予測、動物種間における保存度から、*M. minutoides* におけるP469Lは単体で、もしくはその他のアミノ酸残基の変化と協調してタンパクの機能低下に関与している可能性が考えられた。また、アミノ酸残基の変化は Ghr タンパクの機能に大きな影響を与

えない可能性も考えられるが、プロリン (P) はタンパクを構成するアミノ酸の中で唯一の二級アミノ酸であり他のアミノ酸に比べて側鎖の可動域が狭く、リガンド結合後の受容体細胞内領域の構造変化において重要であった可能性も考えられる。

次に、*M. minutoides* において *Ghr* 遺伝子および *Igf1* 遺伝子の発現解析を行った。Gh-Igf1 axis において、*Ghr* は主に肝臓で Gh の刺激を受け取り、Jak2 や Stat5b の活性化を介して *Igf1* 遺伝子の発現を促進する (Reh and Geffner, 2010; Vasques et al., 2019)。*M. musculus* と *M. minutoides* の線維芽細胞を用いて Gh-Igf1 axis の発現を比較したが、*Ghr* 遺伝子のみならず *Igf1* 遺伝子においても *M. minutoides* の発現が有意に低いことが明らかになった。また、肝臓を含む体の複数の組織における *Ghr* 遺伝子の発現でも同様に *M. minutoides* の発現が有意に低い結果が得られた。*H. sapiens* の小人症の一種であるラロン症候群およびその病態モデル動物においては、矮小個体となるとともに、*Ghr* 遺伝子および *Igf1* 遺伝子の発現量低下を伴うことが報告されている (Zhou et al., 1997; Cui et al., 2015; Hinrichs et al., 2018)。本章において示された結果は、第1章において言及した、*M. minutoides* の矮小性はラロン症候群患者と類似した生理状態を有していることが原因であるという仮説を支持するものである。さらに本章では、ラロン症候群患者の代表的な遺伝子発現異常である Gh 遺伝子の高発現は、*Ghr* 遺伝子低下に続く *Igf1* 遺伝子の低発現を原因とするフィードバックの結果である可能性を示唆しており、このことから

M. minutoides の矮小性はラロン症候群様の生理状態が関与している可能性を示したと考
える。

M. minutoides の cDNA の配列解析においては、CDS だけでなく 5'-UTR の塩基配列の
決定にも成功し、*M. minutoides* に特異的に存在する dwarf 配列を今回初めて発見した。

5'-UTR は mRNA の 5'末端側に位置し、DNA から転写されるがタンパクに翻訳されない領
域である。タンパク質の翻訳は、initiation (開始)、elongation (伸長)、termination (終
結)の3ステップで構成され、特に initiation は翻訳における律速段階となっている。5'-UTR
は翻訳の最初のステップである initiation に密接に関与しており (Aoyama *et al.*, 2016)、
mRNA の 5'末端の cap 構造の形成やリボソームの誘導効率などに影響を与える重要な領域
である (Vagner *et al.*, 2001; Sonenberg and Hinnebusch, 2009)。そこで、dwarf 配
列を有する *M. minutoides* の 5'-UTR が下流の遺伝子の翻訳調節に与える影響を解析する
ため、培養細胞 (293T 細胞) を用いたレポーターアッセイを行ったところ、*M. minutoides*
においては、dwarf 配列が 5'-UTR に存在することによって、翻訳調節が抑制的に制御され
ている可能性が示唆された。この結果が、dwarf 配列自体の機能であるのか、もしくは他の
動物種と比較した場合、dwarf 配列が挿入されたことによって 5'-UTR の配列が破壊された
結果であるのかは現時点では明らかではない。しかしながら、*M. minutoides* において、
M. musculus には認められない 5'-UTR における dwarf 配列の存在によって Ghr タンパク

の翻訳が抑制され、*M. musculus* よりも発現量が低い可能性は高いと考える。さらに、Gh-Igf1 axis のシグナルカスケードにおいて下流に位置する *Igf1* 遺伝子の発現低下は Ghr タンパクの発現低下の結果であると考えられ、この知見に矛盾しない。

dwarf 配列の塩基配列について、詳しく調べたところ、*M. musculus* の *Ghr* 遺伝子の intron 1 において、dwarf 配列に類似した配列が存在することが明らかになった。また、*S. scrofa* の *Ghr* 遺伝子の intron 1 においても類似配列が存在していた。計 3 種の哺乳動物において dwarf 配列（様配列）が認められたが、本研究においてそれぞれの配列がどのようにして獲得されてきたのかは明らかではない。現時点で、*M. musculus* や *S. scrofa* における dwarf 配列様配列の機能は不明であるが、これらの動物における類似配列は intron に存在しており、スプライシングによって除かれるため、*Ghr* 遺伝子の翻訳調節に対しては大きな影響を与えていないと考えられる。*M. minutoides* の祖先の動物において、遺伝子発現のスプライシングの過程で dwarf 配列が偶然 exon 内に挿入され、その結果 *M. minutoides* において *Ghr* 遺伝子の発現やタンパク発現に影響を及ぼすようになった可能性も考えられる。今後、dwarf 配列だけでなく dwarf 配列様配列の機能解析を行い、dwarf 配列の分子生物学的な役割を解明する必要がある。

以上、本章においては、Gh-Igf1 axis の中心的な構成因子である *Ghr* 遺伝子について分子レベルでの解析を行い、*M. minutoides* の成長関連因子の特性を明らかにするとともに、

矮小性に与える影響について考察した。その結果、*M. minutoides* においてラロン症候群様の遺伝子発現パターンがみられたことや、新たに発見した dwarf 配列が *M. minutoides* 特有の矮小性と関連している可能性を発見した。*M. minutoides* の矮小性の主な原因が Gh-Igf1 axis であると結論づけるためには、タンパクレベルでの *in vitro* 解析や血中ホルモン濃度の測定など生化学的解析と表現型との関連を詳細に解析する必要がある。第 2 章まで、哺乳動物の体の大きさに強く影響する Gh-Igf1 axis の構成因子に着目して解析を行ったが、続いての第 3 章においては、*M. minutoides* の矮小性についてより詳細な個体レベルでの解析を行うために、多能性幹細胞の樹立を目指した。

図2-1 *M. minutoides*におけるGhr遺伝子のCDSの解析

- (A) *Ghr*遺伝子のcDNAのアラインメント解析。上段に*M. musculus*、下段に*M. minutoides*のCDSの塩基配列を示す。*は塩基が一致している箇所を示す。
- (B) *Ghr*タンパクのアラインメント解析。上段に*M. musculus*、下段に*M. minutoides*の推定アミノ酸配列を示す。*はアミノ酸残基が一致している箇所を示す。
- (C) 近隣結合法 (Neighbor joining method) によって作成した系統樹。各ノードにブートストラップ値を、左下に進化距離を示す。
- (D) 複数の脊椎動物の*Ghr*タンパクの配列を用いたアラインメント解析。*M. minutoides*において特徴的なアミノ酸残基を赤で囲み、*M. minutoides*および*M. musculus*におけるアミノ酸番号を上部に示した。
- (E) AlphaFold2による*Ghr*タンパクの構造予測。(上) 構造予測をもとに作成した3Dモデル。(下) 各アミノ酸残基の予測信頼度を示すPAE (Predicted aligned error)。左に*M. minutoides*、右に*M. musculus*の結果を示す。

A

```

Mus_musculus ATGGATCTTTGTCAGGCTTCTTAACTTGGCACTGGCAGTCCACGACGACATTTCTGGAAGTGGGCTACACAGTACTCTTGGCAAAGCTCCCGGTTCTGCAAAAGATCAAT
Mus_minutoides ATGGATCTTTGTCAGGCTTCTTAACTTGGCACTGGCAGTCCACGACGACATTTCTGGAAGTGGGCTACACAGTACTCTTGGCAAAGCTCCCGGTTCTGCAAAAGATCAAT
*****

Mus_musculus CCAAGCTGGGACAAAGTTCTTGGAAAGCTCGATTCCAAAGTGTGTTCCCTGAACTGGAGACATTTTCATGCTACTGGACAGAAGGAGATAATCCTGATTTAAAGACCCAGGA
Mus_minutoides TTAAGCTGGGACAAAGCTTCTTGGAAAGCTCGATTCCAAAGTGTGTTCCCTGAACTGGAGACATTTTCATGCTACTGGACAGAAGGAGATAATCCTGATTTAAAGACCCAGGA
*****

Mus_musculus TCTATTGACTGTACTATGCTAAAAGGAAAGCAACGACAAGCTGCAAGAATTGCTCATGAATGGACCCAGGAATGGAAGAATGCTTCTGATTATGCTCTGCTGAAAAACAGCTGT
Mus_minutoides TCTATTGACTGTACTATGCTAAAAGGAAAGCAACGACAAGCTGCAAGAATTGCTCATGAATGGACCCAGGAATGGAAGAATGCTTCTGATTATGCTCTGCTGAAAAACAGCTGT
*****

Mus_musculus TACTTCAACTCATATACCTCCATTTGGATACCTTACTGTCATCAAGCTAACTACAAATGGTGTATTGCTGGACAAAAATGTTTCACTGTTGACGAAATAGTCAACTGATCCACCC
Mus_minutoides TACTTCAACTCATATACCTCCATTTGGATACCTTACTGTCATCAAGCTAACTACAAATGGTGTATTGCTGGACAAAAATGTTTCACTGTTGACGAAATAGTCAACTGATCCACCC
*****

Mus_musculus ATTTGGCTCACTGGACTTTACTAAACATTAGTTTGCCTGGGATTCTGGAGACATCAAGTGAAGTGGCAACCACCACCAATGACAGATGTTCTGAAGGGATGGATAATCTGGAGTAT
Mus_minutoides ATTTGGCTCACTGGACTTTACTAAACATTAGTTTGCCTGGGATTCTGGAGACATCAAGTGAAGTGGCAACCACCACCAATGACAGATGTTCTGAAGGGATGGATAATCTGGAGTAT
*****

Mus_musculus GAAATTCAGTCAAAAGTAAATGAATCAAAATGGAAGTGTGGCCCTATATGTTAACTACTGTCAGTGTACTCATTGAGAATGGATAAAGAACATGAAGTGGGGTGGATCC
Mus_minutoides GAAATTCAGTCAAAAGTAAATGAATCAAAATGGAAGTGTGGCCCTATATGTTAACTACTGTCAGTGTACTCATTGAGAATGGATAAAGAACATGAAGTGGGGTGGATCC
*****

Mus_musculus AGACAACGGAGCTTTGAAAAGTACAGCGAGTTCAGCGAAGTCTCCGCTGTAATTTCTCAGACGAACATATGGAAGCATGGAAGAAGATCCAGTTTCCATGGTCTTAATATT
Mus_minutoides AGACAACGGAGCTTTGAAAAGTACAGCGAGTTCAGCGAAGTCTCCGCTGTAATTTCTCAGACGAACATATGGAAGCATGGAAGAAGATCCAGTTTCCATGGTCTTAATATT
*****

Mus_musculus ATCTTTGGAATATTTGGAGTAGCAGTGATGCTATTTGTAGTTATATTTCAAAGCAGCAAAGGATTAAGATGCTGATTTTACCCAGTCCAGTTTCAAAGATTAAGGGATTGATCCA
Mus_minutoides ATCTTTGGAATATTTGGAGTAGCAGTGATGCTATTTGTAGTTATATTTCAAAGCAGCAAAGGATTAAGATGCTGATTTTACCCAGTCCAGTTTCAAAGATTAAGGGATTGATCCA
*****

Mus_musculus GATCTTCTCAAGGAAGGAAAGTTGGAGGAGTGAACACCATCTTAGCATTTCATGATAACTACAAACCAGACTTCTACAATGATGATCTCGGGTCAAGTCTATTGAGTACAGATTTGAT
Mus_minutoides GATCTTCTCAAGGAAGGAAAGTTGGAGGAGTGAACACCATCTTAGCATTTCATGATAACTACAAACCAGACTTCTACAATGATGATCTCGGGTCAAGTCTATTGAGTACAGATTTGAT
*****

Mus_musculus GAAGCAGATGTTGATGAGAAGACTGAAGGGTCTGACACAGACAGACTTCAAGCAATGATCATGAGAAATCAGCTGGTATCCTGGAGCAAAGGATGATGATTTGGGCTACCAGCTGT
Mus_minutoides GAAGCAGATGTTGATGAGAAGACTGAAGGGTCTGACACAGACAGACTTCAAGCAATGATCATGAGAAATCAGCTGGTATCCTGGAGCAAAGGATGATGATTTGGGCTACCAGCTGT
*****

Mus_musculus TACGACCTGACATTTGGATACTGATTTCCATACCAGTGACATGTGTGATGTTACCTTGAAGTTTGTCTCAGTACACAGAAGTAAATATGGAAGTGTACTCTTGTGCTTGCATCAGAAG
Mus_minutoides TACGACCTGACATTTGGATACTGATTTCCATACCAGTGACATGTGTGATGTTACCTTGAAGTTTGTCTCAGTACACAGAAGTAAACACGGAAGTGTACTCTTGTGCTTGCATCAGAAG
*****

Mus_musculus AATCTGAAGAATCTGCCTTATGATGCT—TCCCTTGGCTCTCTGATCCCTCATTACCAGACAGTGAAGAACAAGCCACAGCCACTTTGAGCAGCGAACTGAGGCAACCCAC
Mus_minutoides AATCTGAAGAATCTGCCTTATGATGCT—TCCCTTGGCTCTCTGATCCCTCATTACCAGACAGTGAAGAACAAGCCACAGCCACTTTGAGCAGCGAACTGAGGCAACCCAC
*****

Mus_musculus CAACTCGCTCTACACCGATGATTAATCCACATCACTGGCAAACTGACTTTTATGCCAAGTAAAGGACATTACACAGCAGGTTGGTGTAGTCTTTCCAGGCCAAAAGATTAAG
Mus_minutoides CAACTCGCTCTACACCGATGATTAATCCACATCACTGGCAAACTGACTTTTATGCCAAGTAAAGGACATTACACAGCAGGTTGGTGTAGTCTTTCCAGGCCAAAAGATTAAG
*****

Mus_musculus GCAGGGATAGCCAAAGCAATACCAGCGGGAGGTGGCCAGCCCTGCAAGAAAATTACAGCATGAACAGTGCCTACTTTTGTGAGTCAGATGCCAAAAGTGCATCGCTGTGGCCCT
Mus_minutoides GCAGGGATAGCCAAAGCAATACCAGCGGGAGGTGGCCAGCCCTGCAAGAAAATTACAGCATGAACAGTGCCTACTTTTGTGAGTCAGATGCCAAAAGTGCATCGCTGTGGCCCT
*****

Mus_musculus CGCATGGAAGCCAGCTTTGTATAAAACCAAGCTTTAAACCAAGGACATTTACATCACACAGAAAAGCCTTACACTACTGCCAGATGCTGAGACAGCAGATGATGCTCAGATGCT
Mus_minutoides CGCATGGAAGCCAGCTTTGTATAAAACCAAGCTTTAAACCAAGGACATTTACATCACACAGAAAAGCCTTACACTACTGCCAGATGCTGAGACAGCAGATGATGCTCAGATGCT
*****

Mus_musculus GAGATGCTGTCCAGACTACACACGGTTCACACGTGCGAGTCTCAAGGGCCCTTACTCAACGCAACTGTTTGGCTTTGCTGCAAAAAGAAATTTCCCTCTCGTGTGGTTAT
Mus_minutoides GAGATGCTGTCCAGACTACACACGGTTCACACGTGCGAGTCTCAAGGGCCCTTACTCAACGCAACTGTTTGGCTTTGCTGCAAAAAGAAATTTCCCTCTCGTGTGGTTAT
*****

Mus_musculus GTGAGCACAGACCAACTGAACAAAATCATGCAGTAG
Mus_minutoides GTGAGCGACAGCAACTGAACAAAATCATGCAGTAG
*****
    
```

B

```

Mus_musculus MDLQVFLTLALAVTSSTFGSEATPATLKGASPVLRINPSLGTSSSGKPRFTKCRSPELETFSCYWTEGDNPKTPGSIQLYYAKRESQRQAARIAHEWTEQEWKECPDYVSAGKN5C
Mus_minutoides MDLQVFLTLALAVS0DTFGTEASPATLKGASPVLRINLSLGTSSSGKPRFTKCRSPELETFSCYWTEGDNPKTPGSIQLYYAKRENQRQAARNSHEWTEQEWKECPDYVSAGKN5C
** ***** * *** * ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus YFNSSYTSIWIPYCIKLTNGDLLDQKCFVDEIVQDPPPIGLNWTLLNISLTGIRGDIQVSWQPPNADVLKGIWILEYEQYKEVNESKWKVMGPIWLTYPVYSLRMDKEHEVRVRS
Mus_minutoides YFNSSYTSIWIPYCIKLTNGDLLDQKCFVDEIVQDPPPIGLNWTLLNISLTGIRGDIQVSWQPPNADVLKGIWILEYELQHKVNSKWIAMGPIWLTYPVYSLRMDKEHEVRVRS
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

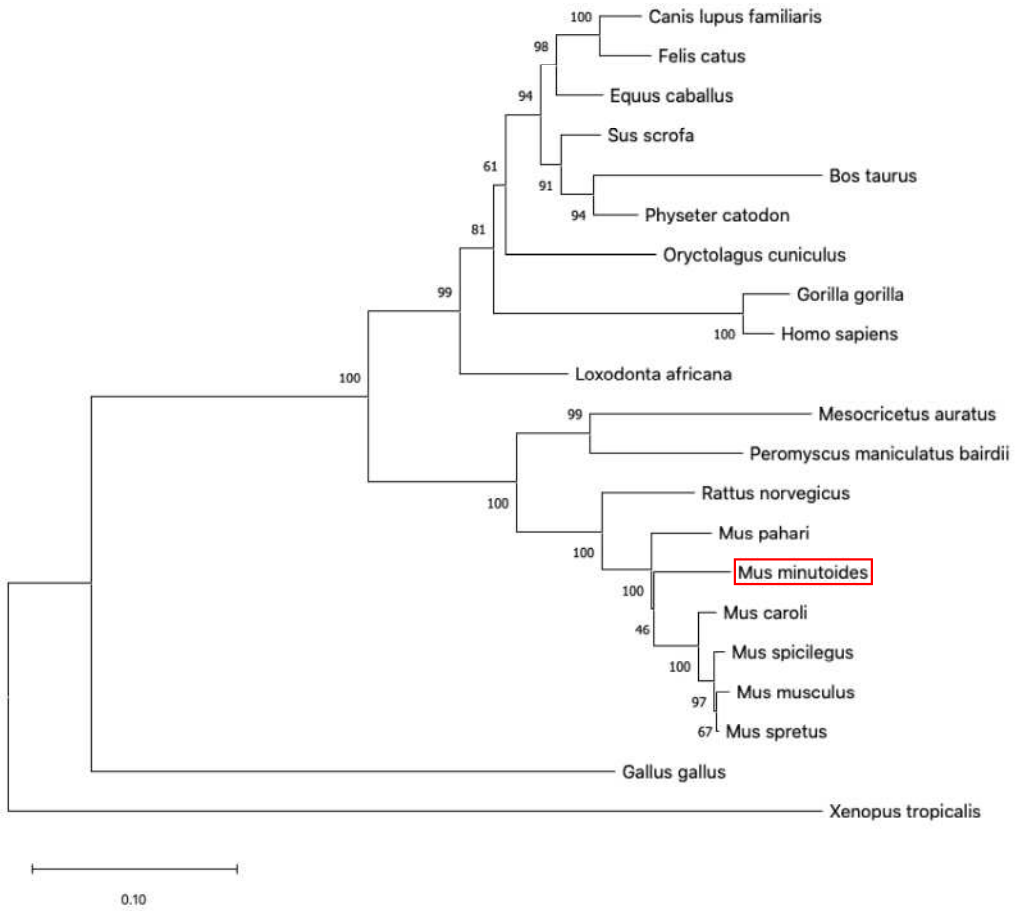
Mus_musculus RQRSFEKYSEFSEVLRVIFPQTNILEACEEDIQFPWFLIIIFGIFGVAVMLFVVVFSKQQRKIMLILPPVPVKIKGIDPDLKKEGKLEEVNITLGIHDNYKPDFYNDSSWVEFIELDID
Mus_minutoides RQRSFEKYSEFSEVLRVIFPQTNILEACEEDIRFPWFLIIIFGIFGVAVMLFVVVFSKQQRKIMLILPPVPVKIKGIDPDLKKEGKLEEVNITLGIHDNYKPDFYNDSSWVEFIELDID
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus EADVDEKTEGSDTRLLSNDHEKSAGILGAKDDDSGRSCYDPDILDITDFHTSDMCDGTLKFAQSQKLNMEADLLCLDQKLNKMLPYDASL--GSLHPSITQVEENKPOPILLSSETEATH
Mus_minutoides DADVEEKTEGSDTRLLSDDHEKSAGILGAKDDDSGRSCYDPDILDITDFHTSDMCDGTLKFAQSQKLNTEADLLCLDQKLNKNSPYDASLGLHPSITLVE--DKPOLLSSSETESD
** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus QLASTPMSNPTSLANIDFYAQVSDITPAGGVVLSPGQIKAGIAQNTQREVATPCQENYSMNSAYFCESDAKKCIAVAPRMEATSCIKPSFNQEDIYITTESLTTAQMSETADIAPDA
Mus_minutoides QLASTPLNPTSLANIDFYAQVSDITPAGGVVLSPGQIKAGIAQNTQREVATPCQENYSMNSAYFCESDAKKCISVAPRMEAA5CVKPSFNQEDIYITTESLTTARMSETADTAPDA
***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****

Mus_musculus EMSVPDYTTVHTVQSPRGLILNATALPLPDKKNFSSCGYVSDQLNKIMQ
Mus_minutoides EMPVPDYTTVHTVQSPRGLILNATALPLPDKKFLSSCGYVSADQLNKIMQ
** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** *****
    
```

C

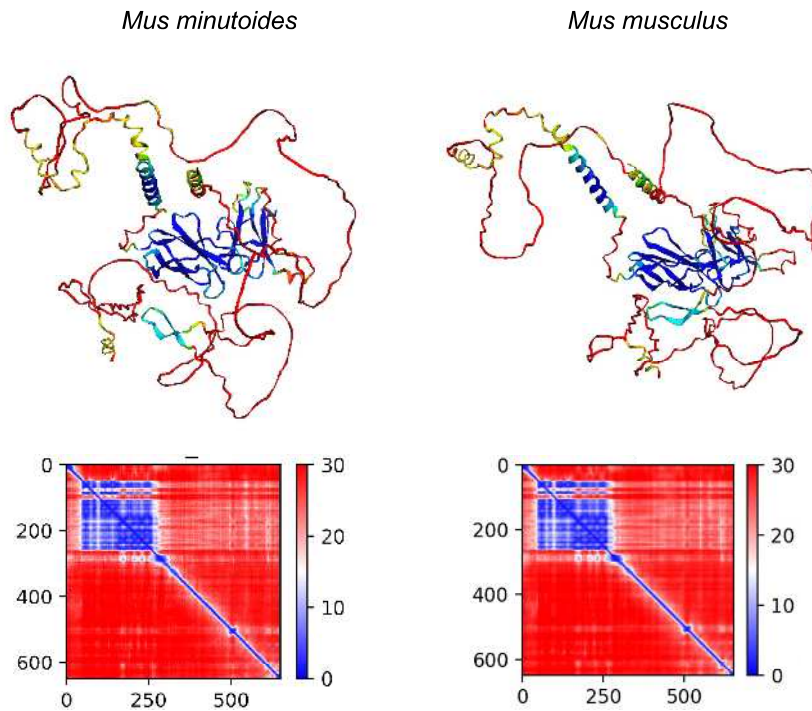


D

		121			204		213		
Mus_minutoides	119	SCHFNSSYTS	128	199	EYELQHKKEVN	ASKW	IAMGPI	218	
Mus_musculus	119	SCYFNSSYTS	128	199	EYEIQYKEVN	ESKWK	VMGPI	218	
Rattus_norvegicus	111	SCYFNSSYTS	121	...	191	EYEIQYKEVN	ETKWK	TMSPI	210
Sus_scrofa	111	SCYFNSSYTS	121	...	191	EYELQYKEVN	ETQWK	MMDPV	210
Homo_sapiens	111	SCYFNSSSFTS	121	...	191	EYELQYKEVN	ETKWK	MMDPI	210
Xenopus_tropicalis	103	SCYFSKTYTS	113	...	183	EYEVHKKEAN	ESQW	TVLDKV	202

		469	479	487		642		
Mus_minutoides	468	QLLSSETES	TDQLASTPLN	487	638	GYVSADQLNK	647	
Mus_musculus	468	QPLLSSETEA	THQLASTPMS	487	638	GYVSTDQLNK	647	
Rattus_norvegicus	457	QPLLGSETES	THQLPSTPMS	476	...	626	GYVSTDQLNK	635
Sus_scrofa	457	RPLIISGTDS	THQTAHTQLS	476	...	626	GYVSTDQLNK	635
Homo_sapiens	457	QPLPTEGAES	THQAAHIQLS	476	...	626	GYVSTDQLNK	635
Xenopus_tropicalis	446	WPVAVSENQP	TSLPVPITLS	465	...	609	GYMTPDQVNK	618

E



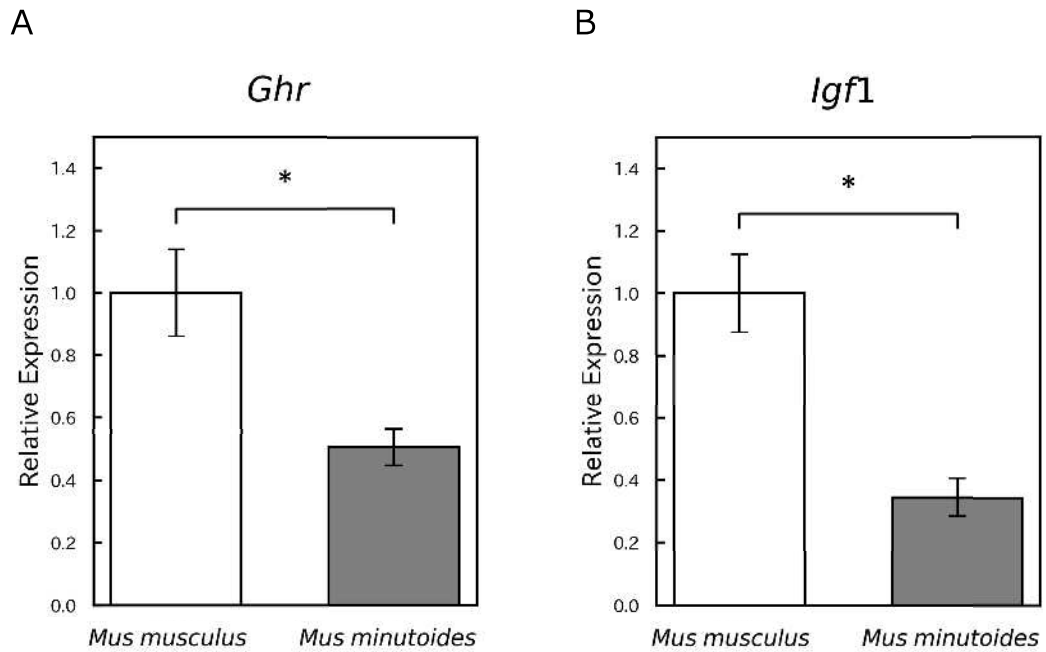


図2-2 線維芽細胞における遺伝子発現解析

- (A) qRT-PCRを用いた*M. musculus*および*M. minutoides*の線維芽細胞における *Ghr*遺伝子の発現量の比較。*: $p < 0.05$
- (B) qRT-PCRを用いた*M. musculus*および*M. minutoides*の線維芽細胞における *Igf1*遺伝子の発現量の比較。*: $p < 0.05$

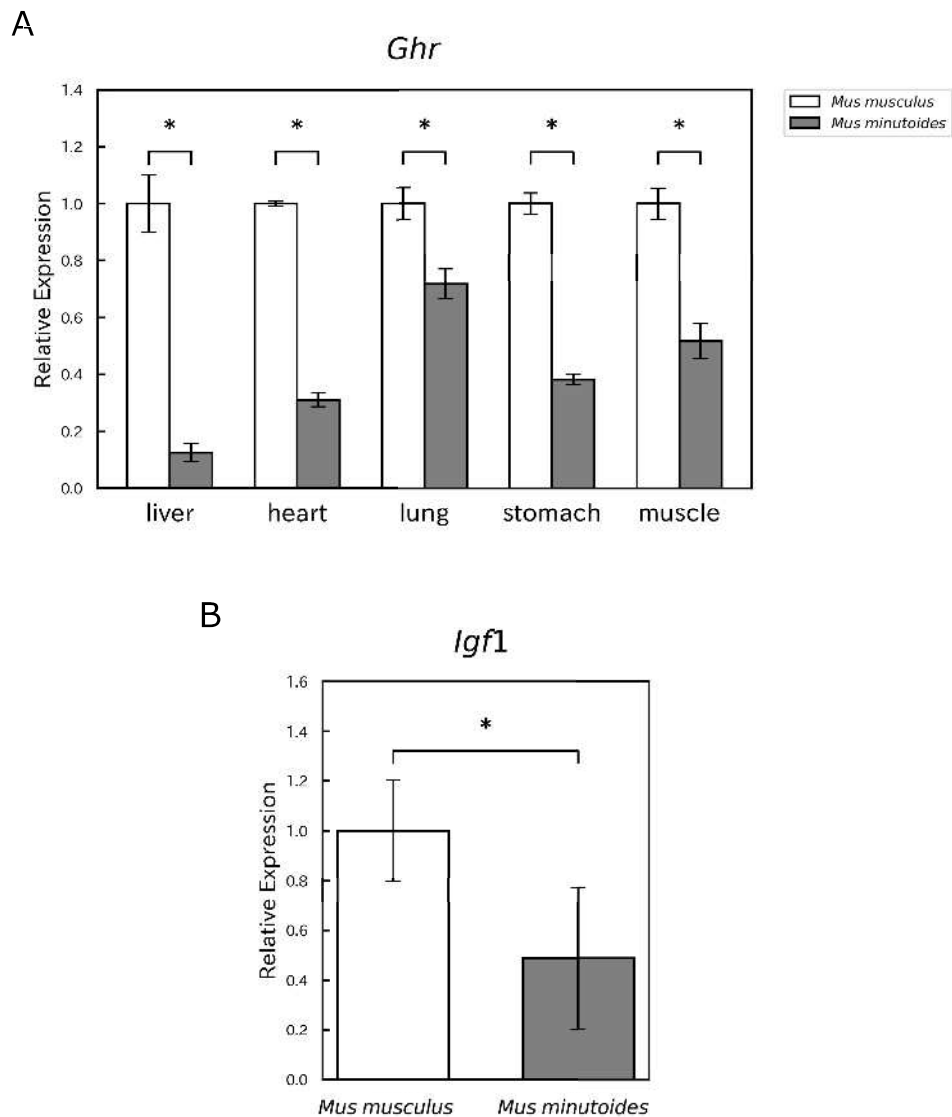


図2-3 組織における遺伝子発現解析

- (A) qRT-PCRを用いた*M. musculus*および*M. minutoides*の各組織における*Ghr*遺伝子の発現量の比較。*: $p < 0.05$
- (B) qRT-PCRを用いた*M. musculus*および*M. minutoides*の肝臓における*Igf1*遺伝子の発現量の比較。*: $p < 0.05$

図2-4 Ghr遺伝子のcDNAにおける5'-UTRの配列解析

- (A) *Ghr*遺伝子の5'-UTRのアラインメント解析。上段に*M. musculus*、下段に*M. minutoides*の塩基配列を示す。*は塩基が一致している箇所を示し、dwarf配列を赤で示す。
- (B) *M. musculus*の5'末端の模式図。exon 1および2にまたがる5'-UTRを灰色で示す。
- (C) *M. minutoides*の5'末端の模式図。exon 1および2にまたがる5'-UTRを灰色で、dwarf配列 (dw seq.) を黒で示す。

A

```

Mus_musculus      GACAACCCACGAGCTGCCAAGCAGGGCGCAGCCATGGGAAGAGGAGGCGGTCTAGGGAGC
Mus_minutoides    GACAACCCACGAGCTGCCAAGCAGGGCGCAGCCATGGGAAGAGGAGGAGGTCTAGGGAGC
*****

Mus_musculus      GCGGCACTGGCAGAGGCGGCTGCTACAGCGGCGGTGGCGGCACGGCTGTTACTGAACC
Mus_minutoides    GCGGCACTGGCAAAGGCGGCTGCTACAGCGGCGGTGGCGGCACGGCTGTTGCTGAACC
*****

Mus_musculus      CCGGCAGCCGCGGGGATCCCGGGCTGGGTCCACGCGGGCTGAGGCCTCGGCTCCAGCAG
Mus_minutoides    CCGGCAGTCGCGGGGACCCCGGGCTGGGGCCACCGGCTGAGGCCTCGGCTCCAGCAG
*****

Mus_musculus      CCCCCAAGCGGACACGAACCCGCGTTCTGTCTCCGAGGCGAAACTCCGAG-----
Mus_minutoides    CCCCCAAGCGGACGCGAACCCGCG--CTGTCTCCGAGGCGAAACTCCGAGGAGATGTCT
*****

Mus_musculus      -----
Mus_minutoides    GTCTGTCTATGATGAGAGACCCTCCCTAAGCAAGGGGATGCTTTCGGAAAGTTAAGGGAT

Mus_musculus      -----GTCTCAGGT
Mus_minutoides    GATTGAAAGTTGACCAGTGAATGGTGATGGTTATGGTCTCAGGT
*****
    
```

B



C

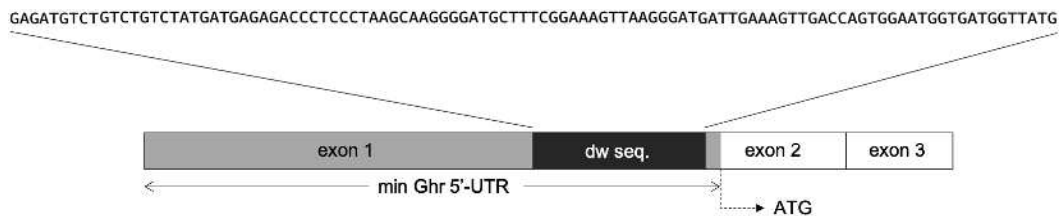
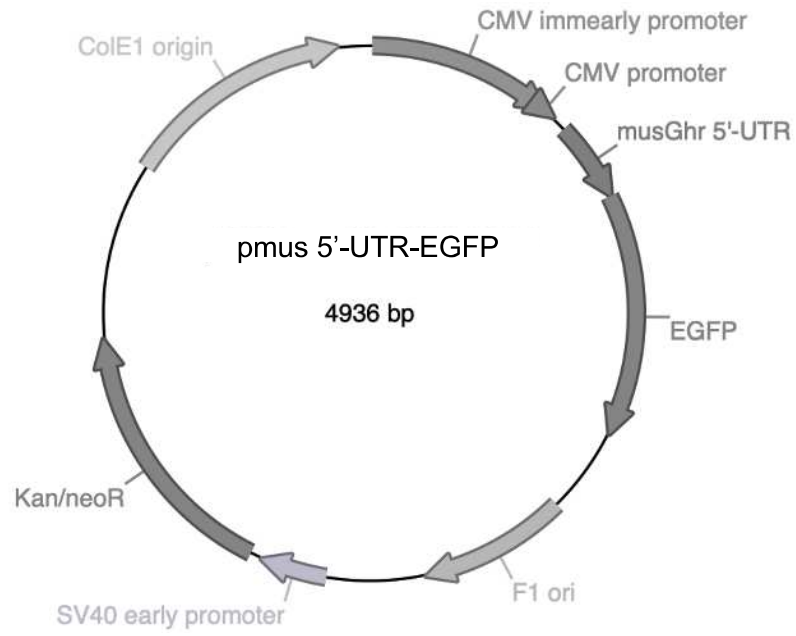


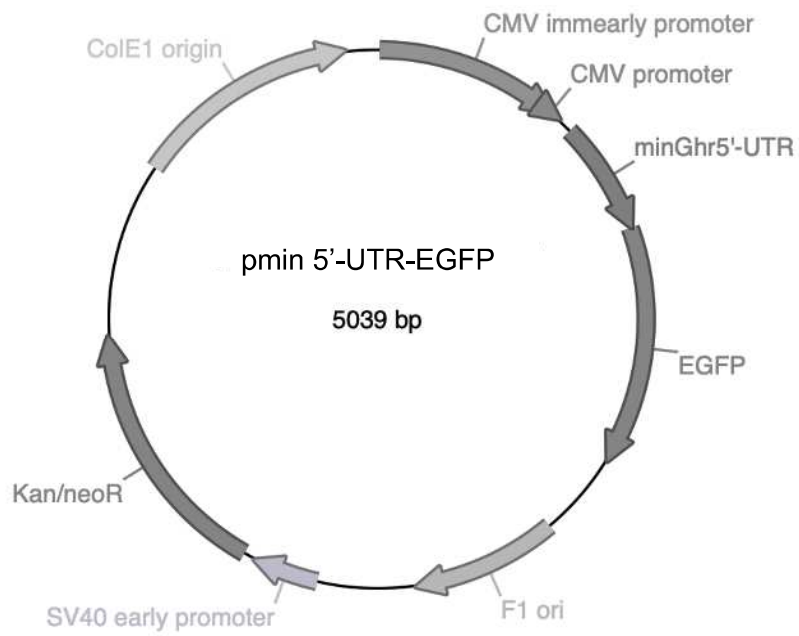
図2-5 *Ghr*遺伝子における5'-UTRのレポーター解析

- (A) レポーター解析に使用したプラスミドの設計図。*M. musculus*の5'-UTRの下流にEGFPが位置する。
- (B) レポーター解析に使用したプラスミドの設計図。dwarf配列を有する*M. minutoides*の5'-UTRの下流にEGFPが位置する。
- (C) 各プラスミドを導入した293T培養細胞の蛍光顕微鏡像。上段に*M. musculus*の5'-UTRを含むプラスミドの導入群（musUTR-EGFP）、下段に*M. minutoides*の5'-UTRを含むプラスミドの導入群（minUTR-EGFP）を示す。bar = 100 μ m
- (D) 蛍光顕微鏡像の定量評価。Negativeはプラスミドを導入していない群を示す。
*: $p < 0.05$

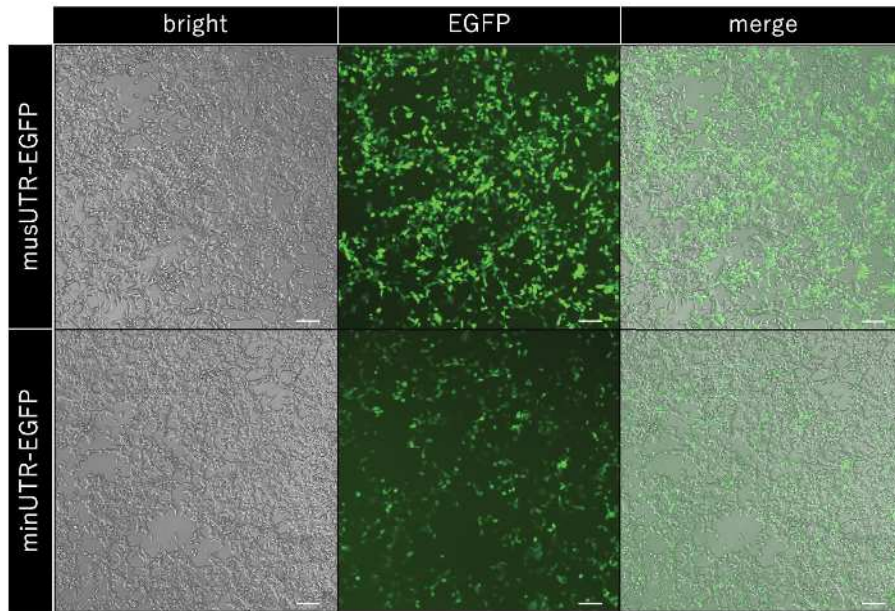
A



B



C



D

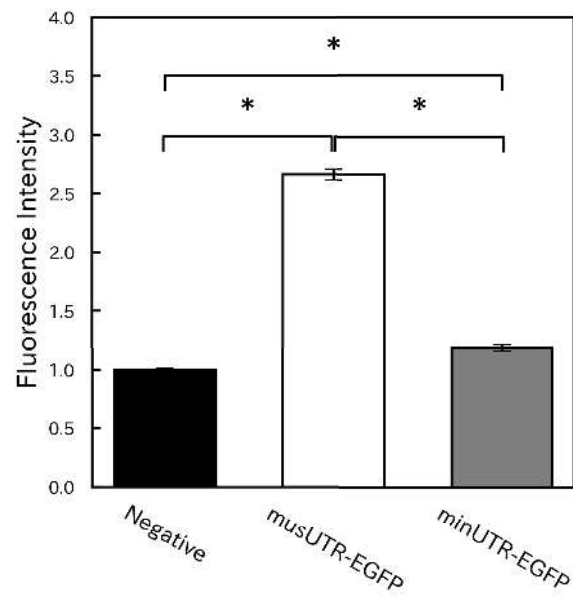


表2-1 RT-PCR (CDS) に使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' → 3')
<i>Ghr 1</i>	F CAGGTCTTCTTAACCTTGCACTGG
	R CAGTTGGTCTGTGCTCACATAACCAC
<i>Ghr 2</i>	F GCCTCGATTACCAAGTGTCGTTT
	R ACCACCTGCTGGTGAATGTCGC
<i>Ghr 3</i>	F ACTGGCAAAGGCGGCTGCTAC
	R GGAACGACACTTGGTGAATCGAGGC
<i>Ghr 4</i>	F TCACACCGTGCAGTCTCCAAG
	R GGCCACGCCTCGACTAGTAC

表2-2 qRT-PCRに使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' → 3')
<i>Ghr</i>	F ACACCTCTTCTACCTGGCGCTC
	R ACTTCTGAGTCTTGGGCATGTCAG
<i>Igf1</i>	F ATGCCCTGATTATGTCTCTGCTGG
	R GAACATCTGCATTGGGTGGTGGTTG
<i>Gapdh</i>	F GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	R CATACTTGGCAGGTTTCTCCAG

表2-3 RT-PCR (5'-UTR) に使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' → 3')	備考
	F GACAACCCACGAGCTGCCAAG	共通
<i>Ghr</i> 5'-UTR	R ACCTGAGACCTCGGAGTTTCGC	<i>Mus musculus</i> 専用
	R ACCTGAGACCATAACCATCACCATTCC	<i>Mus minutoides</i> 専用

表2-4 IRES除去のPCRに使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' → 3')	備考
<i>Ghr</i> 5'-UTR-EGFP	F ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG	共通
	R ACCTGAGACCTCGGAGTTTCGC	<i>Mus musculus</i> 専用
	R ACCTGAGACCATAACCATCACCATTCC	<i>Mus minutoides</i> 専用

表2-5 *Mus minutoides* のGhrに認められたアミノ酸残基の変化とVaProSiによる予測結果

cDNA	Amino acid	Position within gene	Region within protein	Prediction (Score) *				DELETTERIOUS ratio
				PolyPhen2	SIFT	PROVEAN	PANTHER	
c.12T>G	C4W	exon 2	signal peptide	benign (0.074)	TOLERATED (1.00)	neutral (0.946)	NA	0%
c.43A>T	T15S	exon 2	signal peptide	benign (0.005)	TOLERATED (1.00)	neutral (0.281)	NA	0%
c.49_50delinsGA	S17D	exon 2	signal peptide	benign (0.005)	TOLERATED (1.00)	neutral (0.404)	NA	0%
c.65G>C	S22T	exon 2	signal peptide	benign (0.001)	TOLERATED (0.09)	neutral (-0.105)	NA	0%
c.73A>T	T25S	exon 3	extracellular	benign (0.000)	TOLERATED (0.14)	neutral (0.017)	NA	0%
c.121_122delinsTT	P41L	exon 3	extracellular	benign (0.001)	TOLERATED (1.00)	neutral (-0.583)	neutral (-2.33763)	0%
c.272G>A	S91N	exon 4	extracellular	benign (0.002)	TOLERATED (0.19)	neutral (0.312)	neutral (-0.70047)	0%
c.293T>A	I98N	exon 5	extracellular	possibly damaging (0.900)	DELETTERIOUS (0.00)	neutral (0.126)	NA	50%
c.295G>T	A99S	exon 6	extracellular	possibly damaging (0.574)	TOLERATED (0.29)	neutral (0.014)	NA	25%
c.361T>C	Y121H	exon 6	extracellular	probably damaging (0.994)	TOLERATED (0.15)	neutral (-2.335)	Deleterious (-3.73982)	50%
c.449C>G	T150S	exon 6	extracellular	benign (0.051)	TOLERATED (0.74)	neutral (0.184)	neutral (-1.26454)	0%
c.604A>C	I202L	exon 7	extracellular	benign (0.000)	TOLERATED (1.00)	neutral (0.245)	neutral (-0.83150)	0%
c.600T>C	Y204H	exon 7	extracellular	probably damaging (0.999)	DELETTERIOUS (0.01)	neutral (-2.199)	Deleterious (-3.31201)	75%
c.626A>C	E209A	exon 7	extracellular	possibly damaging (0.768)	TOLERATED (1.00)	neutral (-1.669)	Deleterious (-3.39612)	50%
c.638A>T	K213I	exon 7	extracellular	possibly damaging (0.922)	DELETTERIOUS (0.01)	neutral (-2.141)	Deleterious (-3.23951)	75%

c.641T>C	V214A	exon 7	extracellular	benign (0.000)	TOLERATED (0.44)	neutral (-0.137)	neutral (-1.24653)	0%
c.658_659delinsAC	L220T	exon 8	extracellular	benign (0.000)	TOLERATED (1.00)	neutral (0.969)	neutral (-0.57537)	0%
c.665A>C	Y222S	exon 8	extracellular	benign (0.000)	TOLERATED (0.74)	neutral (-0.160)	neutral (-0.74611)	0%
c.668G>T	C223F	exon 8	extracellular	benign (0.001)	TOLERATED (1.00)	neutral (0.150)	neutral (-1.40872)	0%
c.818A>G	Q273R	exon 9	extracellular	benign (0.000)	TOLERATED (0.95)	neutral (-0.501)	NA	0%
c.883A>G	I295V	exon 9	transmembrane	benign (0.051)	TOLERATED (0.69)	neutral (-0.171)	neutral (-0.79922)	0%
c.1083A>G	E361D	exon 11	cytoplasmic	benign (0.032)	TOLERATED (0.07)	neutral (0.892)	neutral (-1.11631)	0%
c.1095T>G	D365E	exon 11	cytoplasmic	possibly damaging (0.845)	TOLERATED (0.37)	neutral (-1.394)	NA	25%
c.1135A>G	N379D	exon 11	cytoplasmic	benign (0.011)	TOLERATED (0.75)	neutral (-0.191)	neutral (-0.78525)	0%
c.1261A>G	K421E	exon 11	cytoplasmic	benign (0.001)	TOLERATED (1.00)	neutral (2.724)	neutral (-1.27634)	0%
c.1289T>C	M430T	exon 11	cytoplasmic	benign (0.012)	TOLERATED (0.48)	neutral (0.701)	neutral (-0.54320)	0%
c.1234T>C	L445S	exon 11	cytoplasmic	benign (0.015)	TOLERATED (0.92)	neutral (2.123)	neutral (-1.51641)	0%
c.1347_1348insTCC	A449_S450insS	exon 11	cytoplasmic	-	-	-	-	-
c.1379A>T	Q460L	exon 11	cytoplasmic	benign (0.001)	TOLERATED (0.57)	neutral (2.183)	neutral (-0.69069)	0%
c.1392A>C	E464D	exon 11	cytoplasmic	probably damaging (0.991)	TOLERATED (0.12)	neutral (-0.217)	neutral (-1.72721)	25%
c.1393_1395del	N465del	exon 11	cytoplasmic	-	-	-	-	-
c.1406C>T	P469L	exon 11	cytoplasmic	probably damaging (0.995)	DELETERIOUS (0.00)	Deleterious (-4.098)	Deleterious (-4.35101)	100%

c.1429G>T	A477S	exon 11	cytoplasmic	benign (0.004)	TOLERATED (0.99)	neutral (1.955)	neutral (-1.23982)	0%
c.1435C>G	H479D	exon 11	cytoplasmic	benign (0.118)	TOLERATED (0.29)	Deleterious (-3.534)	neutral (-1.56375)	25%
c.1456A>C	M486L	exon 11	cytoplasmic	benign (0.006)	TOLERATED (1.00)	neutral (0.627)	neutral (-1.45825)	0%
c.1460_1461delinsAC	S487N	exon 11	cytoplasmic	possibly damaging (0.755)	TOLERATED (0.20)	neutral (-1.884)	Deleterious (-3.52144)	50%
c.1578T>A	N526K	exon 11	cytoplasmic	possibly damaging (0.480)	TOLERATED (0.28)	neutral (-1.240)	neutral (-1.95521)	25%
c.1586G>C	R529P	exon 11	cytoplasmic	benign (0.001)	TOLERATED (0.35)	neutral (3.745)	neutral (-0.73247)	0%
c.1666G>T, c.1668C>T	A556S	exon 11	cytoplasmic	possibly damaging (0.674)	TOLERATED (0.98)	neutral (-1.012)	neutral (-1.92520)	25%
c.1690A>G, c.1692G>A	T564A	exon 11	cytoplasmic	benign (0.185)	DELETERIOUS (0.04)	neutral (-0.530)	neutral (-1.07201)	25%
c.1699A>G	I567V	exon 11	cytoplasmic	benign (0.002)	TOLERATED (0.35)	neutral (0.636)	neutral (-0.52849)	0%
c.1756A>T	T586S	exon 11	cytoplasmic	possibly damaging (0.807)	TOLERATED (0.73)	neutral (-1.038)	neutral (-1.98993)	25%
c.1763A>G	Q588R	exon 11	cytoplasmic	benign (0.001)	TOLERATED (0.57)	neutral (0.055)	neutral (-0.71457)	0%
c.1784T>C	I595T	exon 11	cytoplasmic	benign (0.001)	TOLERATED (0.61)	neutral (0.638)	neutral (-0.49611)	0%
c.1804T>C	S602P	exon 11	cytoplasmic	benign (0.002)	TOLERATED (1.00)	neutral (4.671)	neutral (-1.49515)	0%
c.1896T>G	N632K	exon 11	cytoplasmic	benign (0.000)	TOLERATED (0.99)	neutral (0.057)	neutral (-0.61055)	0%
c.1901T>C	P634L	exon 11	cytoplasmic	benign (0.001)	TOLERATED (1.00)	neutral (0.958)	neutral (-1.77265)	0%
c.1924A>G	T642A	exon 11	cytoplasmic	benign (0.370)	DELETERIOUS (0.00)	neutral (-0.855)	neutral (-1.99391)	25%

* Prediction列は上段に予測結果、下段にアミノ酸置換のスコアを示す。

第 3 章

Mus minutoides iPS 細胞の樹立と性状解析

緒言

哺乳動物の体の大きさを調節する因子に関する研究において、遺伝子ノックアウト動物の作出は、分子間相互ネットワークにおける特定因子の機能にいたるまで解明できる優れた方法である。ノックアウト動物の作出には大きく分けて2種類の方法がある。1つは、相同組み換えによって標的遺伝子を破壊したES細胞を用いたキメラ動物を作出した後、そのキメラ動物と野生型を交配させてヘテロノックアウト個体を作成、さらにヘテロノックアウト個体同士からホモノックアウト個体を得る方法である (Takeda, 2007)。この方法は多くの実験過程を含むため煩雑であり、年単位の長い時間を要するという欠点がある。次の方法として、ヌクレアーゼを用いたゲノム編集ツールを受精卵に導入してノックアウト個体を得るという方法である (Kobayashi *et al.*, 2022; Sung *et al.*, 2012)。現在、ゲノム編集の主なツールとして CRISPR/Cas9 システムが活用されており、相同組み換えされたES細胞を用いた方法よりもはるかに簡便で、月単位の時間で作出できるという画期的な方法である。しかしながら、これらの方法はどちらも受精卵を使用するものであるため、実験動物として確立されていない動物への適用は容易ではない。そこで本研究では、多能性幹細胞のひとつである人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) に着目した。

多能性幹細胞は多分化能と自己複製能を持った、体細胞とは異なる細胞であるが、内部細胞塊から樹立される胚性幹細胞 (embryonic stem cell: ES 細胞) (Evans and Kaufman, 1981)、そして分化した体細胞のリプログラミングによって樹立される iPS 細胞などがある。iPS 細胞は 2006 年にマウス (*Mus musculus*) において初めて作出された (Takahashi and Yamanaka, 2006)。これまでに iPS 細胞は再生医療のための器官生成をはじめとして、拒絶反応が起こらない移植に必要不可欠である器官内血管の発生プロセスの解析やヒトの希少な遺伝子疾患における病態解明および治療法の検討など様々な研究に用いられてきた (Thoma *et al.*, 2016; Hamanaka *et al.*, 2018; Hirayama *et al.*, 2023)。近年では、iPS 細胞は希少な野生動物の保全においても注目されている (Katayama *et al.*, 2022; Hayashi *et al.*, 2022)。現在までに、*M. musculus* だけでなく、ラット (*Rattus norvegicus*) (Li *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2009)、ヒト (*Homo sapiens*) (Takahashi *et al.*, 2007)、ウシ (*Bos taurus*) (Han *et al.*, 2011; Kawaguchi *et al.*, 2015)、トビイロホオヒゲコウモリ (*Myotis lucifugus*) (Mo *et al.*, 2014)、スマトラオランウータン (*Pongo abelii*) (Ramaswamy *et al.*, 2015)、アメリカ平原ハタネズミ (*Microtus ochrogaster*) (Katayama *et al.*, 2016)、ハダカデバネズミ (*Heterocephalus glaber*) (Miyawaki *et al.*, 2016)、ブタ (*Sus scrofa*) (Ezashi *et al.*, 2009)、ヤギ (*Capra hircus*) (Chen *et al.*, 2017)、アマミトゲネズミ (*Tokudaia osimensis*) (Honda *et al.*, 2017)、ヒツジ (*Ovis aries*) (Bao *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2021)、フタコブラクダ (*Camelus bactrianus*) (Li

et al., 2023) など、多数の齧歯類を含む様々な哺乳動物の iPS 細胞が作出されてきた。しかしながら、アフリカチビネズミ (*Mus minutoides*) の iPS 細胞樹立の報告はこれまでにない。

体細胞のリプログラミングは、山中因子と呼ばれる 4 つのコア因子 (*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*c-Myc*) を導入して誘導する方法が一般的である。リプログラミングに必要な遺伝子を細胞へ導入する主な方法として、ウイルスベクターを用いる方法、PiggyBac (PB) に代表されるトランスポゾンと種々のトランスフェクション法を組み合わせる方法などがある。PB トランスポゾンは蛾に由来する DNA トランスポゾンで、ウイルスベクターと同様に遺伝子を染色体に組み込むことができるが、煩雑な操作が不要であり、導入後に外来遺伝子を取り除くこともできる (Ding *et al.*, 2005; Kim and Pyykko, 2011)。また、近年ではドキシサイクリンの添加によって標的遺伝子の発現を制御する Tet-on/off システムと組み合わせる方法も普及しており、この方法による iPS 細胞樹立も報告されている (Mo *et al.*, 2014; Honda *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2021)。

以上のように、*M. musculus* における発生工学技術の単純な応用が難しい *M. minutoides* において、iPS 細胞は分子レベルでの特定因子の特性を探索するための強力なツールとなりうる。

本章では、PB トランスポゾンシステムと Tet-on システムを組み合わせた方法によって *M. minutoides* iPS 細胞の樹立を目指し、その多分化能と分化能を解析することによって、*M. minutoides* における iPS 細胞の確立、ならびにその iPS 細胞を用いた解析への応用可能性を検討した。

材料と方法

1. 実験動物

第1章 材料と方法に記載した条件で飼育し、実験を実施した。

テラトーマ形成試験およびキメラ動物の作出実験は東京大学の実験動物委員会の承認

(P22-092)のもとに実施し、東京大学動物実験指針に従って行った。

2. 試薬の調製

0.2%ゼラチン溶液

第2章 材料と方法に記載した方法に従った。

DMEM 培養液

第2章 材料と方法に記載した方法に従った。

PBS 溶液

第2章 材料と方法に記載した方法に従った。

PET (PBS-EDTA-Trypsin) 溶液

第2章 材料と方法に記載した方法に従った。

マイトマイシン C 溶液

1x PBS 溶液 5mL にマイトマイシン C (FUJIFILM Wako) 2.5 mg を溶かし、
0.2 µm 径フィルターで濾過滅菌後、-20°Cで保存した。

iPS 細胞培養液

ESGRO Complete Basal Medium (Merck) 40 mL に ESGRO-2i Supplement Kit
(Merck) および KnockOut Serum Replacement (KSR) (Gibco) 10 mL を加え、ペニ
シリン (180 U/mL) およびストレプトマイシン (100 µg/mL) を添加して 4°Cもしくは
-20°Cで保存した。

ドキシサイクリン溶液 (DOX)

UltraPure Distilled Water (Thermo Fisher Scientific) 1 mL にドキシサイクリン
(Takara) 2 mg を溶解後、-20°Cで保存した。

TBS 溶液

Milli-Q 水に Tris (FUJIFILM Wako) 1.21 g、塩化ナトリウム (FUJIFILM Wako) 4.38 g

を溶かし、HCl (FUJIFILM Wako) を加えて pH 7.4 に調整後、全量を 500 mL とした。

オートクレーブによって滅菌し、室温で保存した。

0.05%TBS-T 溶液

1x TBS 溶液 10 mL に TRITON X-100 (Sigma) 5 μ L を溶解後、室温で保存した。

SFEB 培養液

KSR 5 mL、MEM Non-essential Amino Acid Solution (x100) (FUJIFILM Wako)

0.5 mL、StemSureR 10 mmol/L 2-メルカプトエタノール溶液 (x100) (FUJIFILM Wako)

0.5 mL を DMEM に加えて全量を 50 mL とした後、0.2 μ L 径フィルターを用いて濾過滅

菌し、4°Cで保存した。

EB 培養液

DMEM 40 mL に KSR 5 mL および FBS 5 mL を加え、ペニシリン (180 U/mL) およ

びストレプトマイシン (100 μ g/mL) を添加して 4°Cで保存した。

3. *M. minutoides* iPS 細胞の樹立

M. minutoides 初代線維芽細胞の樹立

第2章 材料と方法に記載した方法に従った。

フィーダー細胞の樹立と培養

妊娠 12.5 日の ICR マウスから胎子を摘出し、胎仔の頭部、四肢、内臓を除去し、1x PBS 溶液中で洗浄した。メスの刃を用いて胎子の皮膚を小さく刻んで PET 溶液中に懸濁し、37°C で 10 分間静置後、胎子懸濁液に DMEM 培養液を加えて 300 x g で 5 分間遠心した。上清を除いた後に DMEM 培養液に再懸濁し、0.2%ゼラチン溶液でコーティングした 10 cm dish 上へ播種し、マウス胎子線維芽細胞 (Mouse Embryonic Fibroblast: MEF) として 37°C、CO₂ 5%の条件下で培養した。

増殖した MEF をマイトマイシン C 溶液添加 DMEM 培養液中で 2 時間培養し、フィーダー細胞とした。作出した MEF およびフィーダー細胞は、CultureSure 凍結保存液 (FUJIFILM Wako) に懸濁して -80°C または液体窒素内で保存した。

iPS 細胞樹立用プラスミドの構築

Eurofins から購入したオリゴヌクレオチドを使用した overlap extension PCR 法によって PiggyBac inverted terminal repeat (ITR) アンプリコンを作成し、pUC19 プラスミドの AatII-AflIII 部位に挿入して pUC19-PB プラスミドとした。

PB-TRE-OCT3/4-2A-KLF4-2A-SOX2-2A-cMYC (PB-TRE-OKSM) および PB-TRE-

GLIS1-2A-NANOG-2A-LIN28a (PB-TRE-GNL) プラスミド構築のため、TRE-CMV minimal promoter および polyA フラグメントを既存のプラスミド (Yoshioka *et al.*, 2015) からクローニングした。OKSM フラグメントは pMaster3 (Addgene, #58526) (Wu *et al.*, 2014) からクローニングし、pUC19-PB プラスミドの ITR 間に挿入して PB-TRE-OKSM プラスミドとした。*GLIS1* 遺伝子の open reading frame (ORF) は C57BL/6 マウスの精巢由来 cDNA から、*NANOG-LIN28a* フラグメントは pMaster3 からクローニングし、pUC19-PB プラスミドの ITR 間に挿入して PB-TRE-GNL プラスミドとした。

次に、PB-CAG-rtTA-IRES-EGFP-PGK-NeoR プラスミド構築のため、CAG-rtTA および IRES-EGFP フラグメントを既存のプラスミド (Yoshioka *et al.*, 2015) からクローニングした。これらのフラグメントを PGKneobpA (Addgene, #13442) からクローニングした PGK-NeoR フラグメントとともに pUC19-PB プラスミドの ITR 間に挿入した。

最後に、pCAG-T3-hyPBase-pA プラスミド構築のため、pCMV-hyPBase (Wellcome Sanger Institute の Dr. A Bradley より分与) から hyPBase ORF をクローニングし、pCAG-T3-hCas9-pA (Addgene, #48625) の NotI-ClaI 部位に挿入した。

構築したベクターは全て sequencing kit および DNA sequencer (Applied Biosystems) を用いて付属のプロトコルに従って配列決定を行った。本章で用いたプラスミドの構造を図 3-1A に示す。

M. minutodes iPS 細胞の樹立

PET 溶液を用いて 10 cm dish 上の *M. minutoides* 線維芽細胞を剥離し、Opti-MEM (Gibco) で洗浄および懸濁した。細胞懸濁液を 4 mm gap のキュベット電極 (BEX, SE-204) に移し、iPS 細胞誘導用プラスミド (PB-TRE-OKSM、PB-TRE-GNL、PB-CAG-rtTA-ires-EGFP-PGK-NeoR、pCAG-T3-hyPBase-pA) をそれぞれ 2.5 µg/100 µL となるように加え、エレクトロポレーター (BEX, CUY21EDIT II) を用いて、ポレーションパルス 350 V (10 msec ON + 50 msec OFF) + ドライビングパルス 40 V (50 msec ON + 50 msec OFF) × 5 の条件でエレクトロポレーションを行った。細胞を回収してフィーダー細胞上に再播種し、iPS 細胞培養液中に DOX を最終濃度 2 µg/mL になるように加えて培養した。培養液は 2 日に 1 回の頻度で交換し、iPS 細胞様のコロニーが出現後、フィーダー細胞上に継代し、再びコロニーが現れるまで DOX を添加した状態で培養した。再度コロニーが現れた後は、DOX の添加を中止して培養した。DOX 添加を中止した 3 日後に形態が維持されているシングルコロニーを 1x PBS 溶液に浸して実体顕微鏡下でピックアップし、PET 溶液を用いてシングルセルにした後、96 well プレーットのフィーダー細胞上に播種した。新たなコロニーが認められたら継代およびスケールアップを行い、16 個のシングルコロニーに由来する *M. minutoides* iPS 細胞様細胞を樹立した。*M. minutoides* iPS 細胞様細胞樹立のタイムスケールを図 3-1B に示す。樹立した *M. minutoides* iPS 細胞様細胞は CultureSure 凍結保存液に懸濁して -80°C または液体窒素内で保存した。

PCR によるコロニーの由来の判定

NucleoSpin TriPrep (Takara) を用いてフィーダー細胞上の *M. minutoides* iPS 細胞様細胞および *M. musculus* ES 細胞からゲノム DNA を抽出し、-20℃で保存した。

M. minutoides の *Ghr* 遺伝子のプロモーター領域の配列を用いてプライマーを設計した。設計したプライマーの配列を表 3-1 に示す。PCR 反応は、抽出したゲノム DNA および BIOTAQ DNA polymerase (NIPPON Genetics) を使用して、第 1 章 材料と方法に記載した条件で行った。

電気泳動は第 1 章 材料と方法に記載した条件で行い、検出されるバンドの大きさによってコロニーの由来を判定した。

4. *M. minutoides* iPS 細胞様細胞における多分化能解析

アルカリホスファターゼ (ALP) 染色

M. minutoides iPS 細胞様細胞もしくは線維芽細胞の培養液を除去後、4%パラホルムアルデヒド溶液を加えて 2 分間静置して固定した。4%パラホルムアルデヒド溶液を除き、0.05%TBS-T 溶液で洗浄した。Alkaline Phosphatase Detection Kit (Merck) を用いて付属のプロトコルに従って調製した ALP 染色液を加え、室温で 15 分間遮光下で反応後、ALP 染色液を除き、0.05%TBS-T 溶液で洗浄後に 1x PBS 溶液を加えて観察した。

total RNA の抽出および逆転写反応

M. minutoides iPS 細胞様細胞および線維芽細胞、*M. musculus* ES 細胞および線維芽細胞からの total RNA の抽出は、6 well プレート内で 90%コンフルエントになった細胞において、NucleoSpin TriPrep を用いて付属のプロトコルに従って行った。それぞれの total RNA の逆転写は第 1 章 材料と方法に記載した方法で行った。

RT-PCR

Nanog、*Oct3/4*、*Sox2*、*Klf4*、*Eras* および *Fgf4* 遺伝子について、Ensembl マウスデータベースに登録されている *M. musculus* (Mouse (GRCm38.p6))、*Mus pahari*、*Mus spretus* の各遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを設計した。設計したプライマーを表 3-2 に示す。PCR 反応には BIOTAQ DNA polymerase を使用し、反応条件および電気泳動は第 1 章 材料と方法に記載した方法で行った。

PCR 産物の精製

第 1 章 材料と方法に記載した方法で行った。

塩基配列およびアミノ酸配列の解析

第 1 章 材料と方法に記載した方法で行った。

qRT-PCR

Nanog、*Oct3/4*、*Sox2*、*Eras* および *Fgf4* 遺伝子について、表 3-2 に示したプライマーを用いて第 1 章 材料と方法に記載した方法で行った。

細胞蛍光免疫染色

M. minutoides iPS 細胞様細胞もしくは線維芽細胞の培養液を除去後、4%パラホルムアルデヒド溶液を加えて 30 分静置して固定した。TBS 溶液で 3 回洗浄後、TBS-T 溶液で 20 分間透過処理を行った。TBS 溶液で 3 回洗浄後、5%ヤギ血清添加 TBS-T 溶液で 30 分間ブロッキング処理を行った。その後、5%ヤギ血清添加 TBS-T 溶液で希釈した一次抗体を 4°C で 17 時間反応させ、二次抗体として Alexa Fluor 594 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Abcam; ab150080、500 倍) を 45 分間反応させた。TBS 溶液で 3 回洗浄後、1 g/mL DAPI 添加 TBS 溶液を 15 分間遮光下で反応させ、対比染色を行った。

一次抗体として、ウサギ抗マウス *Nanog* 抗体 (Abcam; ab80892、200 倍) およびウサギ抗ヒト-マウス *Oct4* 抗体 (Cell Signaling Technology; C30A3C1、200 倍) を用いた。

RNA-seq 解析

Maxwell RSC RNA Cell Kit (Promega) を用いて 6 well プレート内で 90%コンフルエントになった *M. minutoides* iPS 細胞様細胞および線維芽細胞から total RNA を抽出し、NovaSeq 6000 (Illumina) を使用して RNA-seq 反応を行った。RNA 抽出および RNA-seq 反応は山口大学遺伝子実験施設に委託した。得られたリード数に対して TPM 正規化を行い、発現を解析した。また、*M. musculus* iPS 細胞および線維芽細胞の RNA-seq データ (GSE46104; GSM1123730、GSM1123731、GSM1123732、GSM1123733) は GREIN (<http://www.ilincs.org/apps/grein/?gse=>) を用いて GEO から入手し、解析に使用した。

5. *M. minutoides* iPS 細胞様細胞における *in vitro* 分化能解析

神経細胞への分化誘導

神経細胞へ分化させるため、フィーダー細胞上へ播種して 2 日後の *M. minutoides* iPS 細胞様細胞の培養液を Ndiff227 培養液 (Takara) へ交換し、ペニシリン (180 U/mL) およびストレプトマイシン (100 µg/mL) を添加して培養した。培養液は 2 日ごとに交換し、2 週間培養した。

細胞蛍光免疫染色

前述の方法で行った。

一次抗体としてラット抗マウス Nestin 抗体 (FUJIFILM Wako; 012-26843、200 倍) を使用し、二次抗体として Alexa Fluor 568 標識ヤギ抗ラット IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific; A-11077、500 倍) を用いた。

胚様体 (Embryoid body: EB) 形成および EB 遊走細胞の樹立

フィーダー細胞上で培養した *M. minutoides* iPS 細胞様細胞を剥離および回収し、遠心して上清を捨てた。細胞を SFEB 培養液に懸濁し、非接着性の 10 cm dish 上で 10 日間もしくは 20 日間の浮遊培養を行った。培養液は 2 日ごとに半量ずつ交換し、EB を形成させた。

5 日間の浮遊培養によって形成された EB を 0.2%ゼラチン溶液でコーティングしたプレートに静置し、EB 培養液内で接着培養を行った。培養液を 2 日ごとに交換しながら、遊走してくる細胞を観察した。

RT-PCR

Tuj1、*Nestin*、*T*、*Acta2*、*Tnnt2*、*Gata4*、*Afp* および *Cdx2* 遺伝子について、Ensembl マウスデータベースに登録されている *M. musculus* (Mouse (GRCm38.p6))、*M. pahari*、*M. spretus* の各遺伝子の塩基配列を参考にプライマーを設計した。設計したプライマーを

表 3-2 に示す。PCR 反応には BIOTAQ DNA polymerase を使用し、反応条件および電気泳動は第 1 章 材料と方法に記載した方法で行った。

6. *M. minutoides* iPS 細胞様細胞における *in vivo* 分化能解析

テラトーマ形成試験

培養した 2.0×10^5 個の *M. minutoides* iPS 細胞様細胞を Matrigel (Corning) に懸濁し、8 週齢の KSN マウスの皮下に注射した。注射から 2 週間後に形成されたテラトーマを摘出して 3.7%ホルムアルデヒドで固定後、70%エタノール中で保存した。

パラフィン包埋および薄切切片の作成

組織の固定後、脱水（70%エタノール、80%エタノール、90%エタノール、100%エタノール x 3、各 2 時間）および透徹（キシレン x 3、各 2 時間）を行い、パラフィンに浸漬（パラフィン x 3、各 1 時間、60℃）した。金属包埋プレートおよび包埋リングを用いてパラフィン中に包埋し、一晩静置した。

作成したパラフィブロックをマイクロトーム（Leica Biosystems）を用いて厚さ 4 μm に薄切して水上で皺を伸ばし、さらに 40℃の温水上で伸展させた後、スライドガラスに貼り付けて 37℃のホットプレート上で一晩以上乾燥させた。

ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

作成した薄切切片を脱パラフィン処理（キシレン x 3、100%エタノール x 2、90%エタノール、70%エタノール、各3分間の後、蒸留水1分間）した後、ヘマトキシリン溶液（Sigma）中に1分間浸漬し、流水中で15分間洗浄および色出しを行った。蒸留水で洗浄後、エオジン溶液（Sigma）に5分間浸漬し、再び蒸留水で洗浄した。次に脱水（70%エタノール、30秒間、90%エタノール、1分間、100%エタノール x 2、1および3分間、キシレン x3、各3分間）を行い、エンテランニュー（Merck）で封入し、観察した。

PCRによるテラトーマの由来の判定

NucleoSpin DNA FFPE XS kit (Takara) を用いてテラトーマの薄切切片からゲノム DNA を抽出し、-20℃で保存した。

表 3-1 に示したプライマーを用いて行い、PCR 反応および電気泳動は前述の条件で行い、検出されるバンドの大きさによってテラトーマの由来を判定した。

キメラ動物の作出

体外受精によって得られた ICR マウスの受精卵を KSOMaa-BSA 培地内で胚盤胞期胚になるまで培養した。マイクロインジェクションによって 4.0~4.5 日齢の胚の胚盤胞腔に *M. minutoides* iPS 細胞様細胞を注入し、偽妊娠状態を誘起した交配後 2.5 日の ICR 雌マ

ウスの子宮内へキメラ胚を移植し、自然分娩によってキメラ動物を得た。

7. 統計学的処理

値はt検定によって有意差の検定を行い、 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありと判断した。

結果

1. *M. minutodes* iPS 細胞様細胞の樹立

本研究では、まず *M. minutoides* 線維芽細胞を樹立し (図 3-1C)、エレクトロポレーション法を用いて *M. minutoides* iPS 細胞の樹立を行った。エレクトロポレーションを行って iPS 細胞誘導プラスミドを導入した日を day 0 とし、day 1 の細胞は線維芽細胞様の形態であったが、day 7 においては EGFP 陽性の細胞コロニーを形成し (図 3-1D)、継代後も naïve 型とみられる *M. musculus* ES 細胞様のドーム状コロニーを形成した。day 12 に DOX の添加を中止した後、コロニーの単離および継代を続けたが day 33 においてもドーム状のコロニーが形成された (図 3-1E)。コロニーの単離は day 14 に行い、最終的に 16 個のシングルコロニーから 16 ラインの *M. minutoides* iPS 細胞様細胞を得た。

次に、得られた細胞の由来を確認するため、少なくとも 10 回以上の継代を行った *M. minutoides* iPS 細胞様細胞の各ラインからゲノム DNA を抽出して PCR を行った。ゲノム DNA の判別には、*M. minutoides* と *M. musculus* における *Ghr* 遺伝子のプロモーター領域の長さの違いを利用した。PCR の結果、iPS 細胞様細胞の全てのラインが *M. minutoides* 由来であることが示された (図 3-1F)。

2. *M. minutodes* iPS 細胞様細胞の多分化能の解析

M. minutoides iPS 細胞様細胞が多分化能を有しているかを評価するため、まず幹細胞マーカーとして広く用いられる ALP 活性を調べたところ、ほぼ全てのコロニーが ALP 陽性を示した (図 3-2A)。次に、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞から total RNA を抽出し、多分化能マーカーの遺伝子発現解析を行った。その結果、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞において、エレクトロポレーションによって導入した *Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2* および *Klf4* 遺伝子だけでなく、今回導入していない *Eras* 遺伝子および *Fgf4* 遺伝子の発現も認められた (図 3-2B)。また、発現している遺伝子が *M. minutoides* 由来の遺伝子であるかどうかを確認するため、電気泳動を行った *Fgf4* 遺伝子のバンドを切り出して cDNA の塩基配列を決定した。RT-PCR における増幅産物は、*M. musculus* の *Fgf4* 遺伝子とは異なる塩基が数ヶ所みられたが (図 3-2C)、決定した塩基配列から推測されるアミノ酸配列は *M. musculus* と同一であった (図 3-2D)。

続いて、樹立した *M. minutoides* iPS 細胞様細胞の全てのラインにおいて、代表的な多分化能マーカーである *Nanog* 遺伝子の発現量を qRT-PCR 法を用いて定量的に解析したところ、多くのラインでは *M. musculus* ES 細胞と比較して有意に低いラインがほとんどであった (図 3-2E)。*Nanog* 遺伝子の発現量が *M. musculus* ES 細胞と比較して有意差がなかった *M. minutoides* iPS 細胞様細胞のライン (apm_iPSC-6 と apm_iPSC-10) において、他の多分化能マーカー遺伝子 (*Eras* 遺伝子、*Fgf4* 遺伝子) についても解析したところ、調べた 2 つの多分化能マーカー遺伝子両方において、*M. musculus* ES 細胞と比較して

M. minutoides iPS 細胞様細胞の発現量が高く、特に *Fgf4* 遺伝子において顕著であった (図 3-2F)。遺伝子発現について相関解析を行うと、多くの遺伝子間で強い正の相関を示したが、*Eras* 遺伝子のみ他の遺伝子との相関が弱かった (図 3-2G)。

M. minutoides iPS 細胞様細胞における多分化能マーカーのタンパク発現および局在を調べるため、*Nanog* および *Oct3/4* の細胞蛍光免疫染色を行ったところ、EGFP 陽性の *M. minutoides* iPS 細胞様細胞コロニーのみが多分化能マーカー陽性を示した (図 3-2H)。

さらに、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞の遺伝子発現を網羅的に調べるため、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞および線維芽細胞を用いて RNA-seq 解析を行った。検出された 29,437 個の遺伝子のうち、qRT-PCR で発現が認められた遺伝子 (*Nanog*、*Oct3/4*、*Sox2*、*Eras*、*Fgf4*) を含む 6,503 個の遺伝子が *M. minutoides* iPS 細胞様細胞において 2 倍以上多く発現していることが明らかになった (図 3-3A)。*M. minutoides* iPS 細胞様細胞において発現が増加していた遺伝子についてエンリッチメント解析を行ったところ、多分化能や細胞分化に関連した pathway や GO term がヒットした (図 3-3B)。エンリッチメント解析において最上位にあがった WP1763 に含まれる 292 個の遺伝子のうち、102 個の発現が解析を行った *M. minutoides* iPS 細胞様細胞において増加していた (図 3-3C)。

続いて、GEO データベースから取得した *M. musculus* iPS 細胞および線維芽細胞の RNA-seq データを加えて解析を行った。主成分分析を行ったところ、動物種ごと、細胞種

ごとに異なるクラスターを形成した (図 3-3D)。幹細胞マーカー (Naive 型、Primed 型) および線維芽細胞マーカーに注目してヒートマップを作成すると、iPS 細胞 (様細胞) と線維芽細胞の間で明確に遺伝子発現が異なることが視覚化され、細胞種ごとにクラスタリングされた (図 3-3E)。動物種ごとに iPS 細胞 (様細胞) と線維芽細胞の比較を行うと、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞、*M. musculus* iPS 細胞ともに共通して発現量増加を示していた遺伝子が 631 個存在した (図 3-3F)。それぞれもしくは両方の iPS 細胞 (様細胞) において発現していた多分化能マーカーの一部を表 3-3 に示す。両方の iPS 細胞 (様細胞) において共通して発現が増加していた 631 個の遺伝子についてエンリッチメント解析を行うと、多分化能や幹細胞の維持に関する term が複数ヒットした (図 3-3F)。一方、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞と *M. musculus* iPS 細胞の両方で線維芽細胞よりも発現量が減少していた遺伝子は 582 個存在し、この遺伝子群には線維芽細胞や結合組織の機能に関連する term が結び付けられる遺伝子が多数認められた (図 3-3G)。

3. *M. minutoides* iPS 細胞様細胞における *in vitro* 分化能解析

M. minutoides iPS 細胞様細胞の分化能を調べるため、神経細胞への分化誘導を行った。分化誘導の初期段階では多くの細胞死が生じたが、誘導開始 14 日目には神経細胞マーカー遺伝子 (*Tuj1* 遺伝子、*Nestin* 遺伝子) の発現が認められた (図 3-4A)。合わせて細胞蛍光免疫染色を行った結果、*Nestin* 陽性の神経細胞様突起の伸長が確認された (図 3-4B)。

次に、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞の浮遊培養による胚様体 (EB) の形成を行ったところ、培養 5 日目において、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞は EGFP 陽性の EB を多数形成した (図 3-4C、D)。培養 10 日目および 20 日目の EB において RT-PCR を用いた遺伝子発現解析を行ったところ、三胚葉 (外胚葉、中胚葉、内胚葉) のマーカー遺伝子だけでなく、将来的に胚体外組織に寄与する栄養外胚葉のマーカー遺伝子である *Cdx2* 遺伝子の発現も認められた (図 3-4E)。さらに、EB の接着培養によって得られた遊走細胞の培養を続けたところ、フィラメント状構造を有し、自律的に拍動する心筋細胞へ分化した細胞集団が複数得られた (図 3-4F)。この EB 遊走細胞の遺伝子発現解析において、*Tnnt2* 遺伝子の特に強い発現が認められた (図 3-4E)。

4. *M. minutoides* iPS 細胞様細胞における *in vivo* 分化能解析

M. minutoides iPS 細胞様細胞の *in vivo* における分化能を評価するため、テラトーマ形成試験を行った。免疫不全マウスの皮下に注射した *M. minutoides* iPS 細胞様細胞は 2 週間後にテラトーマを形成した (図 3-5A)。このテラトーマの組織学的解析を行ったところ、神経組織 (外胚葉)、筋肉 (中胚葉)、消化管上皮 (内胚葉) の特徴が認められる組織が形成されていた (図 3-5B)。さらに、このテラトーマの由来細胞を確かめるため、テラトーマから抽出したゲノム DNA を用いて PCR を行った結果、*M. minutoides* 由来のゲノム DNA が確認された (図 3-5C)。

最後に、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞が個体発生に寄与できるかどうかを調べるため、*M. musculus* の胚盤胞期胚に *M. minutoides* iPS 細胞様細胞を注入することによってキメラ動物の作出を行った。その結果、キメラ動物の作出に成功し、*M. minutoides* iPS 細胞様細胞は生体の発生に寄与することがわかった (図 3-5D)。誕生したキメラ動物は少なくとも 2 週齢に達した (図 3-5E)。

以上の結果から、*M. minutoides* 線維芽細胞のリプログラミングによって、多分化能を有し個体発生に寄与できる *M. minutoides* iPS 細胞の樹立に成功したと考えた。

考察

本章では、*M. minutoides* 線維芽細胞をリプログラミングすることによって、多分化能を有する *M. minutoides* iPS 細胞の樹立に成功した。樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は *in vitro* のみならず、*in vivo* においても *M. musculus* とのキメラ動物の個体発生にも寄与できる多分化能を有し、iPS 細胞としての性状を維持していることを示した。

本研究では、PiggyBac transposon system (Ding *et al.*, 2005; Kim and Pyykko, 2011) を用いて *M. minutoides* iPS 細胞の樹立を行った。リプログラミング因子として山中因子 (OCT3/4、SOX2、KLF4、c-MYC) (Takahashi and Yamanaka, 2006; Takahashi *et al.*, 2007) に加え、リプログラミング効率の向上が報告されている *GLIS1* 遺伝子、*NANOG* 遺伝子および *LIN28* 遺伝子 (Maekawa *et al.*, 2011; Yu *et al.*, 2007) を含めた 7 つの遺伝子を導入し、リプログラムを誘導した。*M. minutoides* においては、iPS 細胞樹立に必要なとされる因子について不明であり、かつこれらのリプログラミング因子の遺伝子の塩基配列は明らかにされていない。そのため、これまでの研究において *M. musculus* (C57BL/6N、C57BL/6J、ICR) および *R. norvegicus* (Wistar-Imamichi) の iPS 細胞作出を確認している (unpublished data) リプログラム誘導ベクターを用いて *M. minutoides* における iPS 細胞樹立を目指した。これらのリプログラム誘導ベクターに含まれているリプログラミン

グ因子の遺伝子配列は全て *H. sapiens* のものであるが、これまでに導入実績のある齧歯類と同様に *M. minutoides* 線維芽細胞をリプログラムすることに成功した。また、第1章および第2章において、*M. minutoides* は *M. musculus* との進化的な距離が近いことを確認した。これらの実験結果から、*M. minutoides* から樹立した iPS 細胞は、*M. musculus* や *R. norvegicus* と類似した多分化能維持メカニズムを有していると考えられた。今回用いた7つのリプログラミング因子の *M. minutoides* における詳細なアミノ酸配列は今回明らかにしなかったが、複数の因子が *M. minutoides* においても初期化に貢献したことによって iPS 細胞が誘導されたと考える。この結果から、*H. sapiens* や *M. musculus* の Nanog タンパク (Hayashi et al., 2015) において保存されているホメオドメインと同等のアミノ酸配列が、*M. minutoides* においても保存されている可能性が高い。しかし、今回樹立した *M. minutoides* iPS 細胞においては、*Nanog* 遺伝子の発現は *Oct3/4* 遺伝子や *Sox2* 遺伝子の発現と比較すると相対的に低値であった。*M. musculus* では、*Nanog* 遺伝子の発現は、*Oct3/4* 遺伝子および *Sox2* 遺伝子の制御を受けることが知られている (Niwa, 2007; Endoh and Niwa, 2022)。従って *M. minutoides* において、*Nanog* 遺伝子の発現は、*Oct3/4* 遺伝子および *Sox2* 遺伝子との異なる相互作用や制御を反映している可能性が考えられる。

本研究において、*M. minutoides* iPS 細胞の樹立のためのフィーダー細胞として、マイト

マイシン C 処理を施した MEF を用いた。*M. musculus* iPS 細胞においてはフィーダーフリー培養法が報告されており (Lin et al., 2011)、今回 *M. minutoides* iPS 細胞においても試みたが、培養が経過するにつれてコロニーの成長速度の低下やコロニー数の減少が認められ (data not shown)、*M. minutoides* iPS 細胞におけるフィーダーフリー培養法は確立できなかった。

今回樹立した iPS 細胞のコロニーを構成する細胞が、*M. musculus* 由来ではなく *M. minutoides* 由来であることを確認するために、まず *M. musculus* の複数の DNA マイクロサテライトマーカーのプライマーを用いて PCR を行った。しかし、*M. minutoides* と *M. musculus* の判別に用いることができる DNA マイクロサテライトマーカーのプライマーセットを同定することができなかった。そこで、*M. minutoides* と *M. musculus* における *Ghr* 遺伝子のプロモーター領域の長さの違いの利用を試みた。その結果、ゲノム DNA を鋳型にした PCR による、*M. minutoides* と *M. musculus* の判別に成功した。*M. minutoides* iPS 細胞から抽出したゲノム DNA からは、*M. minutoides* のみならず、*M. musculus* 由来のフィーダー細胞のゲノム DNA と推測される少量の増幅産物も観察された。しかしながら、増幅産物のサイズや増幅された量から推定すると、今回用いた *M. minutoides* iPS 細胞のゲノム DNA 解析法は特に問題なく、本方法は、得られた DNA 試料から、*M. minutoides* と *M. musculus* を区別できる有効な方法であると考えた。

M. minutoides iPS 細胞の多分化能解析において、複数の多分化能マーカー遺伝子の発現が mRNA だけでなくタンパクレベルでも認められた。また、iPS 細胞作出のためのリプログラミング誘導ベクターには含まれていない *Eras* 遺伝子および *Fgf4* 遺伝子が発現しており、特に *Fgf4* 遺伝子のゲノム PCR 産物の塩基配列の解析結果から、今回樹立した iPS 細胞において *M. minutoides* 内在性のリプログラミング関連遺伝子が発現し、*M. minutoides* 線維芽細胞においてリプログラミングが生じたことを示唆している。一方、遺伝子導入を行っていない *M. minutoides* 線維芽細胞の遺伝子発現解析において、リプログラミング因子の一つである *Klf4* 遺伝子の発現が認められた。本研究において、*M. musculus* 皮膚線維芽細胞においても *Klf4* 遺伝子の発現が認められたが、本研究と類似した方法によって iPS 細胞を樹立した *T. osimensis* や *M. lucifugus* の線維芽細胞においても *Klf4* 遺伝子の発現が確認されている (Mo et al., 2014; Honda et al., 2017)。 *Klf4* 遺伝子はマウス胎子の皮膚から分離された NIH3T3 細胞から初めて単離および同定され (Shields et al., 1996)、皮膚のバリア機能の維持を含む役割などを有している (Ghaleb and Yang, 2017)。特に幹細胞研究においては、*M. musculus* iPS 細胞の樹立に際してコア因子として用いられたことで大きく注目された (Takahashi and Yamanaka, 2006)。 *Klf4* 遺伝子は多分化能の誘導において段階的に働き、初期には分化関連遺伝子を抑制し、後期には多分化能遺伝子の発現を促進する (Polo et al., 2012)。また、 *Klf4* 遺伝子は LIF/Stat3 pathway による調節を受けている

(Hall *et al.*, 2009)。本研究においては、*M. minutoides* iPS 細胞樹立培養液に LIF を添加したことによって、*M. minutoides* 線維芽細胞内の *Klf4* 遺伝子の発現を促進し、多分化能の獲得に貢献した可能性が考えられる。一方で、本研究で用いた線維芽細胞においては *Klf4* 遺伝子の発現が認められたため、リプログラミング因子として外部から導入せずとも iPS 細胞を誘導できた可能性があり、*Klf4* 遺伝子を除いた 6 つの因子によるリプログラミングを試みる必要がある。

続いて多分化能関連遺伝子発現の定量的な解析を行ったところ、*M. minutoides* iPS 細胞と *M. musculus* ES 細胞間だけでなく、*M. minutoides* iPS 細胞のそれぞれのライン間においても発現量に差があることが明らかになった。今回樹立した *M. minutoides* iPS 細胞のうち 2 ライン (apm_iPSC-6、apm_iPSC-10) において、*Nanog* 遺伝子の発現量は *M. musculus* ES 細胞と同等であったが、*Oct3/4*、*Sox2*、*Eras*、*Fgf4* 遺伝子の発現量は *M. musculus* ES 細胞よりも有意に高かった。この中で *Fgf4* 遺伝子の発現量は *M. musculus* ES 細胞の 19.9~28.3 倍と高く、今回樹立した *M. minutoides* iPS 細胞の大きな特徴の一つであると考えられる。*Fgf4* 遺伝子は未分化な幹細胞に特異的に発現しており、*Sox2*-*Oct3/4* 複合体が *Fgf4* エンハンサーに結合することによって転写が促進される (Yuan *et al.*, 1995)。*M. musculus* ES 細胞において、*Fgf4* 遺伝子は細胞の増殖には大きな影響を与えないが、分化などの細胞運命に密接に関与する。*Fgf4* 遺伝子の欠損や阻害によって発現量が低下すると *Erk1/2* signaling の活性が低下し、ES 細胞の神経系や中胚

葉系の組織への分化能が失われる (Kunath et al., 2007)。本研究において樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は比較的容易に神経細胞に分化させることが可能であり、また EB から遊走した細胞群は能動的に中胚葉性の心筋細胞へと分化したが、これは *M. minutoides* iPS 細胞における *Fgf4* 遺伝子の高い発現量に起因している可能性が考えられた。また、*H. sapiens* ES 細胞では *FGF4* 遺伝子のスプライスアイソフォームが産生されており、未分化性を維持したコロニーの成長を促進する *Fgf4* とそれに拮抗する *FGF4-si* に分類されるという報告がある (Mayshar et al., 2008)。*M. musculus* においてはこのようなアイソフォームは報告されていないが、*M. minutoides* iPS 細胞における *Fgf4* 遺伝子の高発現は単一のアイソフォームによらない可能性も考えられるため、より詳細な転写産物の解析が必要である。

続いて、RNA-seq 解析によって *M. minutoides* iPS 細胞における遺伝子発現を網羅的に解析したところ、RT-PCR による遺伝子発現解析において評価しなかった複数の多分化能に関連する遺伝子の発現が認められた。多分化能および線維芽細胞のマーカー遺伝子に着目すると、iPS 細胞と線維芽細胞それぞれが動物種ごとに類似した発現傾向を示していた。さらに、*M. minutoides* 線維芽細胞と比較して、*M. minutoides* iPS 細胞において発現が増加していた遺伝子群についてエンリッチメント解析を行うと、上位に多分化能に関連する pathway や未分化能維持に関わる GO term があがり、これらの結果から *M. minutoides*

iPS細胞における多分化能の調節メカニズムが *M. musculus* iPS細胞 (Niwa, 2007; Endoh and Niwa, 2022) と類似している可能性が示唆された。しかし、*M. musculus* iPS細胞および *M. musculus* 線維芽細胞を加えた主成分分析を行ったところ、*M. minutoides* iPS細胞と *M. musculus* iPS細胞、*M. minutoides* 線維芽細胞と *M. musculus* 線維芽細胞の群それぞれが独立して分布した。また、エンリッチメント解析においてトップヒットに挙げた WP1763: Mechanisms associated with pluripotency には 292 個の遺伝子が含まれるにもかかわらず、*M. minutoides* iPS細胞において有意に増加していた遺伝子は 102 個のみであった。これらの結果を考慮すると、*M. minutoides* iPS細胞は *M. musculus* iPS細胞と基本的な多分化能維持のメカニズムは共通しているものの、一部異なっている可能性も考えられた。*M. minutoides* iPS細胞においてのみ発現が増加していた 1,661 個の遺伝子の上位には *Cox7b2* 遺伝子、*Zyg11a* 遺伝子、*Foxd3* 遺伝子（神経堤細胞の分化に関与）などが含まれていた。*Cox7b2* 遺伝子は精子形成に関与し (Akter *et al.*, 2021)、*Zyg11a* 遺伝子のミスセンス変異は糖尿病の原因となる (Charoensuk *et al.*, 2021)。一方、発現が減少していた 1,227 個の遺伝子の上位には *Sult1d1* 遺伝子、*Ostn* 遺伝子などが含まれていた。*Sult1d1* 遺伝子は硫酸転移酵素でありストレス応答に関与し (Wong *et al.*, 2010)、*Ostn* 遺伝子は骨細胞のアポトーシスを阻害することによって骨の形態の維持に働く (Mazur *et al.*, 2022)。このように発現が増加/減少していた遺伝子に関する報告は存在するが、関連する研究が少ないため機能的には未知であり、多分化能を調節する機能と

の関連性が不明である遺伝子が多く含まれていた。*M. minutoides* iPS 細胞特異的に発現が変動していた遺伝子の中に *M. minutoides* における多分化能調節メカニズムを特徴付ける因子が含まれている可能性があり、これらの因子同定のためにはより詳細な解析が必要である。

in vitro において *M. minutoides* iPS 細胞の分化能を解析したところ、*M. minutoides* iPS 細胞は比較的容易に神経細胞に分化し、また多能性幹細胞の浮遊培養によって誘導される三次元構造を持つ凝集体である EB を形成した。形成した EB は二層構造を有しており、組織学的にも分化が進んだ異なる性質の細胞集団で構成されていると考えられた (data not shown)。遺伝子発現解析を行ったところ、三胚葉それぞれのマーカー遺伝子だけでなく栄養外胚葉マーカーである *Cdx2* 遺伝子が発現しており、*M. minutoides* iPS 細胞が胚形成だけでなく胎盤形成にも寄与できる可能性が示唆された。また、*T* (*Brachyury*) 遺伝子は、*M. musculus* において中胚葉形成の初期において発現する転写因子であるが (Evans *et al.*, 2012)、*M. musculus* ES 細胞から形成した EB の培養初期に発現し、その後徐々に発現量が減少するという報告がある (Nonaka *et al.*, 2016)。*T* 遺伝子の発現解析結果から、*M. minutoides* iPS 細胞に由来する EB においても培養の継続とともに *T* 遺伝子の発現量が減少する傾向が認められた。この結果は *M. musculus* における報告と一致し、*M. minutoides* においても *T* 遺伝子が中胚葉形成に重要な役割を果たしている可能性が高

いと考えられた。

in vivo における分化能解析では、*M. minutoides* iPS 細胞は三胚葉由来の特徴的な組織構造を有するテラトーマを形成したのみならず、*M. musculus* の胚盤胞期胚への注入によってキメラ動物の発生や組織形成にも寄与していた。誕生したキメラ動物は ICR マウス由来の白い被毛の中に *M. minutoides* iPS 細胞由来の褐色の被毛を有し、生後も大きな異常を示さなかったことから、本研究において樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は *M. musculus* 由来の内部細胞塊と協調して胚体へと発生し、*in vivo* において機能的な細胞集団および器官に分化可能であると考えられる。

多能性幹細胞は、コロニーの形状や遺伝子発現状態などにより naïve 型と primed 型に分類される (Nichols and Smith, 2009)。 *M. musculus* において、ES 細胞は naïve 型に分類され、エピブラスト幹細胞 (Epiblast stem cell: EpiS 細胞) は primed 型であると考えられている。 naïve 型幹細胞と primed 型幹細胞は異なる遺伝子発現を示し、特にキメラ個体への寄与率において大きな違いが認められる (Nichols and Smith, 2009)。本研究における RNA-seq の結果、 naïve 型の *M. musculus* ES 細胞で高発現している *Zfp42* 遺伝子、 *Dppa2* 遺伝子および *Tbx3* 遺伝子などが *M. minutoides* iPS 細胞においても高発現していることが明らかになった。一方で、 primed 型である *M. musculus* EpiS 細胞において

高発現している *Fgf5* 遺伝子や *Foxa2* 遺伝子も *M. minutoides* iPS 細胞において高発現していた。コロニーの形態やキメラ動物への寄与能の実験結果からは、本研究で樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は naïve 型の多能性幹細胞と同等もしくは非常に近い性質を有していると考えられる。近年、naïve 型の多能性幹細胞は胚盤胞補完法を用いた臓器作出に必須のツールとして注目され、これまでに *M. musculus* 体内において *R. norvegicus* の脾臓や胸腺を作出した報告がある (Kobayashi *et al.*, 2010; Isotani *et al.*, 2011)。しかしながら、動物種やドナーとホストの組み合わせによっては、胚盤胞補完法による多能性幹細胞由来の臓器の作出ができなかったという報告もある (Usui *et al.*, 2012; Hamanaka *et al.*, 2018)。胚盤胞補完法を用いた異種動物体内における臓器の作出には、おそらく動物種同士の相性や標的臓器におけるキメリズムの高さ、多能性幹細胞の最適な注入数など様々な条件が関与していると考えられる。また、胚盤胞補完法による研究の多くは、ヒトの臓器を動物体内で作出することを最終的な目的としているが、この目的の達成には齧歯類のような実験動物における知見が必要不可欠である。齧歯類における胚盤胞補完法では *M. musculus* の受精卵を使う方法が一般的である。*M. musculus* に最も近縁である *Mus* 属の動物の多能性幹細胞に関する報告はこれまでになかったが、本研究において初めて *Mus* 属である *M. minutoides* の iPS 細胞を樹立した。また、樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は naïve 型に近い性質を持つため高いキメラ寄与率が期待できる。この結果は、胚盤胞補完法を利用したキメラ動物作出が他の *Mus* 属においても可能となることを示してお

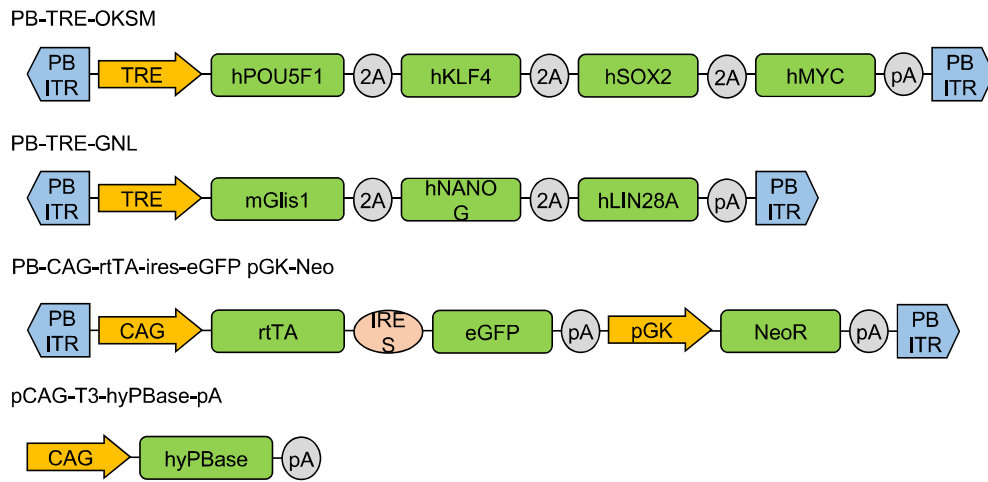
り、*M. musculus* 以外の動物を用いた発生工学の研究を進展させる可能性を示唆している。

以上、本章においては、未解明な点が数多くある、矮小性が特に顕著な哺乳動物である *M. minutoides* において、世界初となる iPS 細胞を樹立し、分子生物学的および発生工学的手法を用いて *M. minutoides* iPS 細胞の多分化能について明らかにするとともに応用研究における有用性を示した。今回樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は、*M. minutoides* の矮小性の解析のみならず、多様な生物集団である齧歯類の種差についての解析や種間キメラ研究においても有効なツールとなりうる。

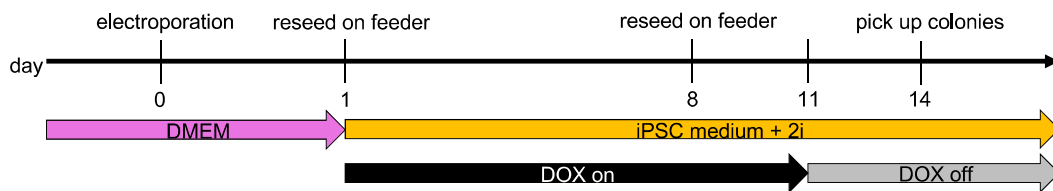
図3-1 *M. minutoides* iPS細胞の樹立

- (A) *M. minutoides* iPS細胞樹立に用いたプラスミドの構造の概略図。
- (B) *M. minutoides* iPS細胞樹立のタイムコース。
- (C) 皮膚片から遊走する初代培養の*M. minutoides*線維芽細胞。bar = 1 mm
- (D) day 7における*M. minutoides* iPS細胞様細胞の蛍光顕微鏡像。bar = 100 μ m
- (E) day 0、7、33における*M. minutoides* iPS細胞の蛍光顕微鏡像。bar = 100 μ m
- (F) ゲノムPCRによる由来動物種の同定。“mouse”は*M. musculus*、“apm”は*M. minutoides*を示す。

A



B



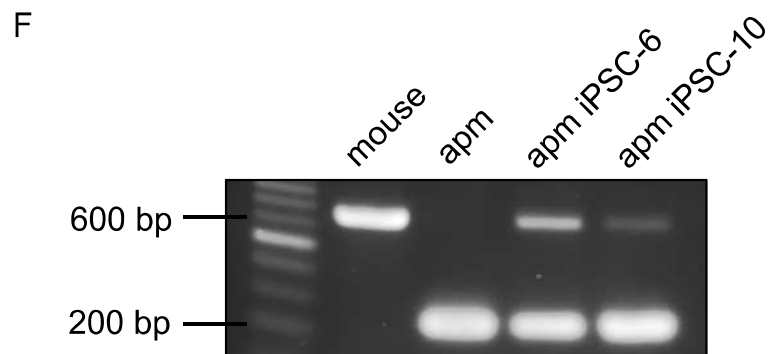
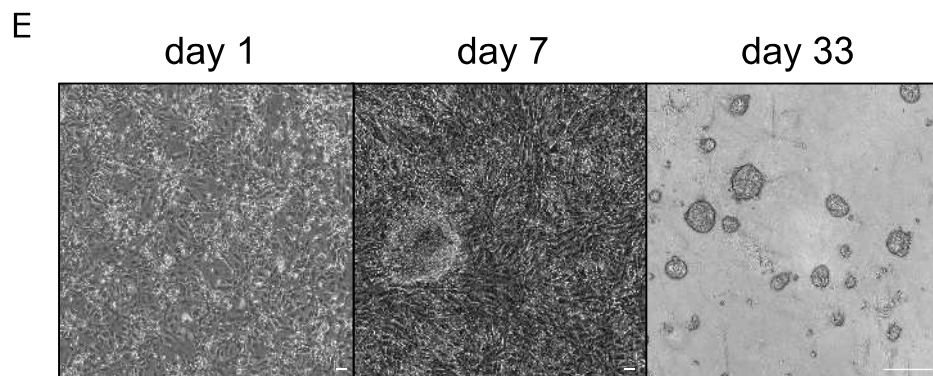
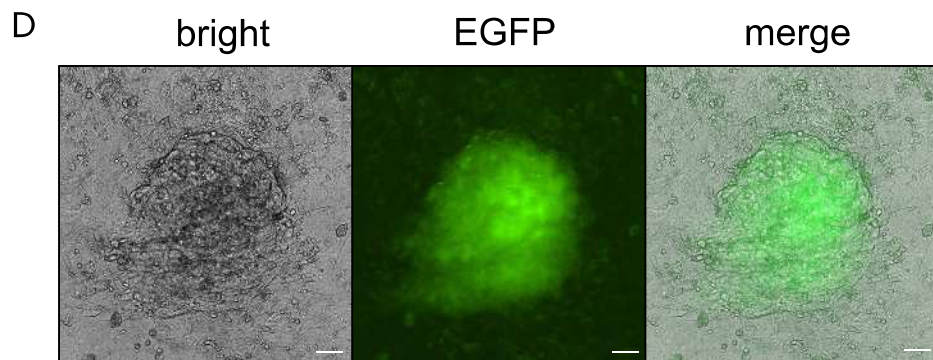
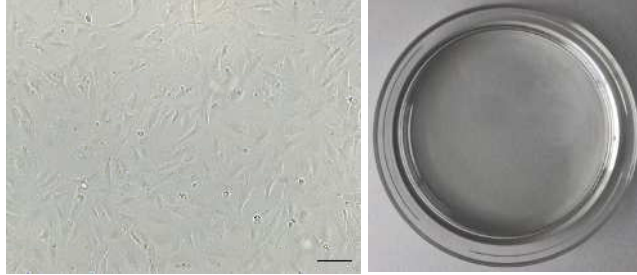


図3-2 *M. minutoides* iPS細胞における多能性の解析

- (A) *M. minutoides*のiPS細胞 (apm iPSC) および線維芽細胞 (apm fibroblast) におけるアルカリホスファターゼ染色の顕微鏡像と肉眼像。bar = 100 μ m
- (B) RT-PCRによる多能性マーカー遺伝子の発現解析。コントロールとして *Gapdh* 遺伝子を用いた。"mouse"は *M. musculus*、"apm"は *M. minutoides* を示す。
- (C) (上) *Fgf4* 遺伝子のcDNAの部分アラインメント解析。上段に *M. musculus*、下段に *M. minutoides* の塩基配列を示す。*は塩基が一致している箇所を示す。(下) アラインメント解析において赤で囲った塩基周辺の波形データ。
- (D) *Fgf4* タンパクの部分アラインメント解析。上段に *M. musculus*、下段に *M. minutoides* のアミノ酸配列を示す。*はアミノ酸残基が一致している箇所を示す。
- (E) 16ラインの *M. minutoides* iPS細胞における *Nanog* 遺伝子の発現量の比較。内部標準として *Gapdh* 遺伝子を用い、*M. musculus* ES細胞における発現量を1とした。"mouse"は *M. musculus*、"apm"は *M. minutoides* を示す。
- (F) *M. minutoides* iPS細胞 (apm_iPSC-6および10) における多能性マーカー遺伝子の発現量の比較。内部標準として *Gapdh* 遺伝子を用い、*M. musculus* ES細胞における発現量を1とした。"mouse"は *M. musculus*、"apm"は *M. minutoides* を示す。*: $p < 0.05$
- (G) 樹立した16ラインの *M. minutoides* iPS細胞における多能性マーカー遺伝子の発現量に関する散布図行列。
- (H) *M. minutoides*のiPS細胞 (apm iPSC) および線維芽細胞 (apm fibroblast) における抗 *Nanog* 抗体および抗 *Oct3/4* 抗体を用いた蛍光免疫染色像。bar = 100 μ m

A

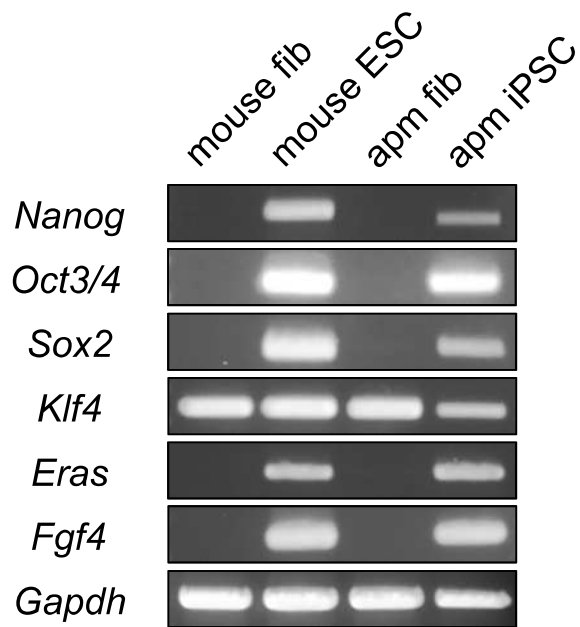
apm fibroblast



apm iPSC



B



C

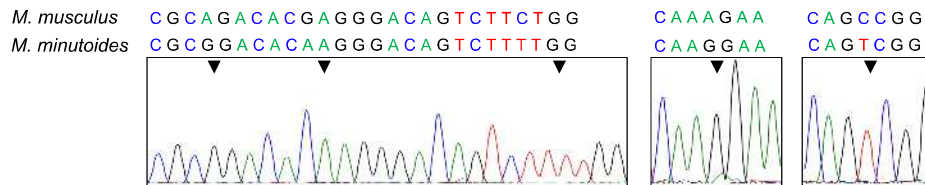
```

Mus_musculus      TGCAGGTGCTGCCCGACGGCCGCATCGGTGGTGTGCACGCAGACACGAGGGACAGTCTTC
Mus_minutoides    TGCAGGTGCTGCCCGACGGCCGCATCGGTGGTGTGCACGCAGACACGAGGGACAGTCTTC
*****

Mus_musculus      TGGAGCTCTCTCCGGTGCAGCGAGGCGTGGTGAGCATCTTCGGAGTGGCCAGCCGGTCT
Mus_minutoides    TGGAGCTCTCTCCGGTGCAGCGAGGCGTGGTGAGCATCTTCGGAGTGGCCAGTCGGTCT
*****

Mus_musculus      TCGTGGCCATGAGCAGCAGGGGCAAGCTCTTCGGTGTGCCTTTCTTTACCGACGAGTGTA
Mus_minutoides    TCGTGGCCATGAGCAGCAGGGGCAAGCTCTTCGGTGTGCCTTTCTTTACCGACGAGTGTA
*****

Mus_musculus      AATTCAAAGAAATACTTCT
Mus_minutoides    AATTCAAAGAAATACTTCT
*****
    
```



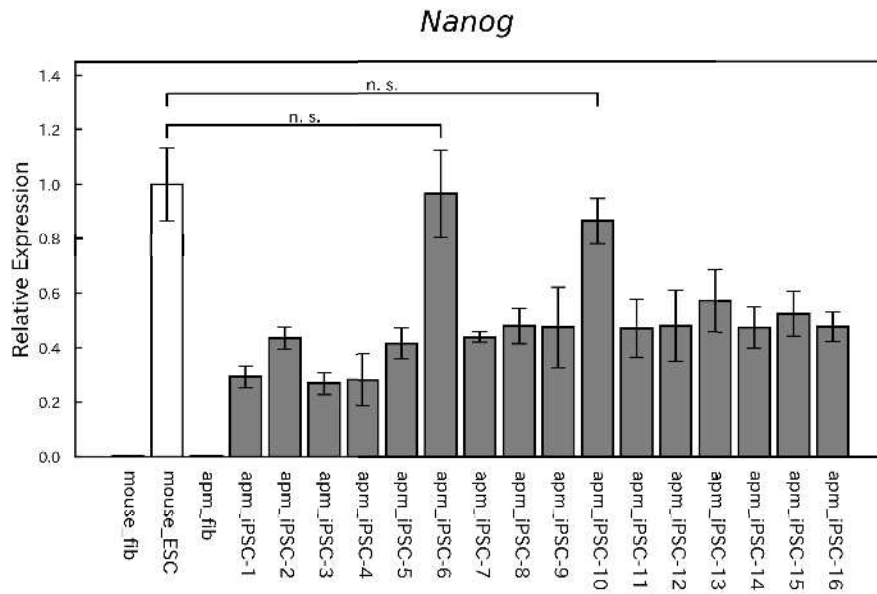
D

```

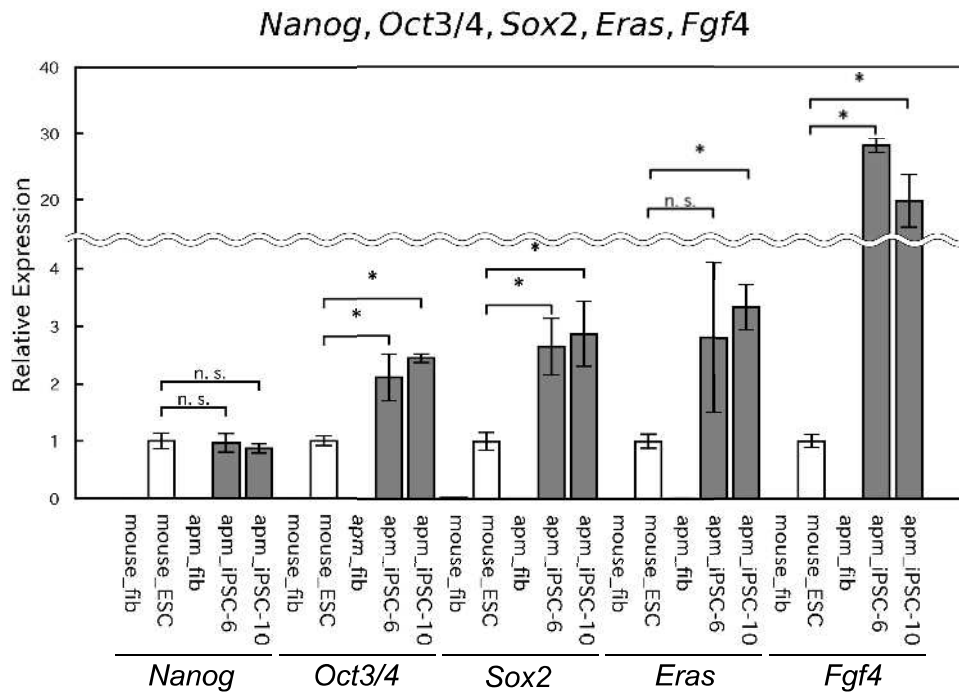
Mus_musculus      VGIGFHLQVLPDGRIGGVHADTRDSLLELSPVQRGVVSIFGVASRFFVAMSSRGKLFVGP
Mus_minutoides    VGIGFHLQVLPDGRIGGVHADTRDSLLELSPVQRGVVSIFGVASRFFVAMSSRGKLFVGP
*****

Mus_musculus      FFTDECKFKEILLPNNYNAY
Mus_minutoides    FFTDECKFKEILLPNNYNAY
*****
    
```

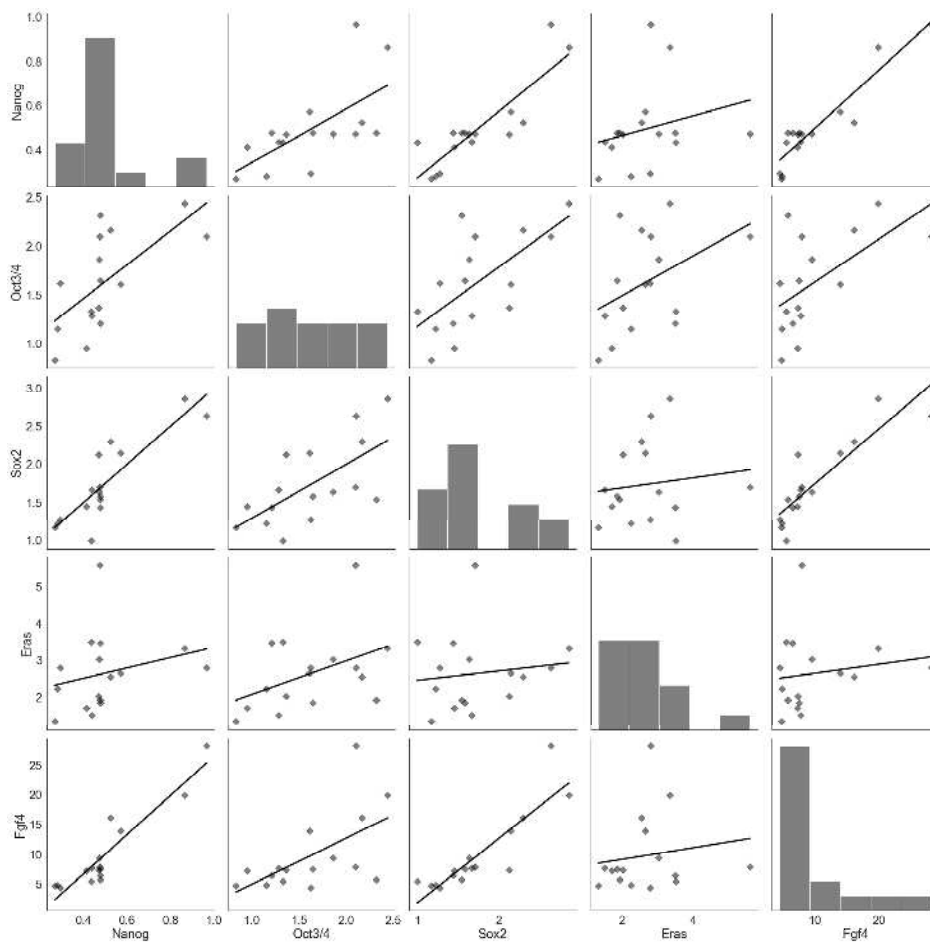

E



F



G



H

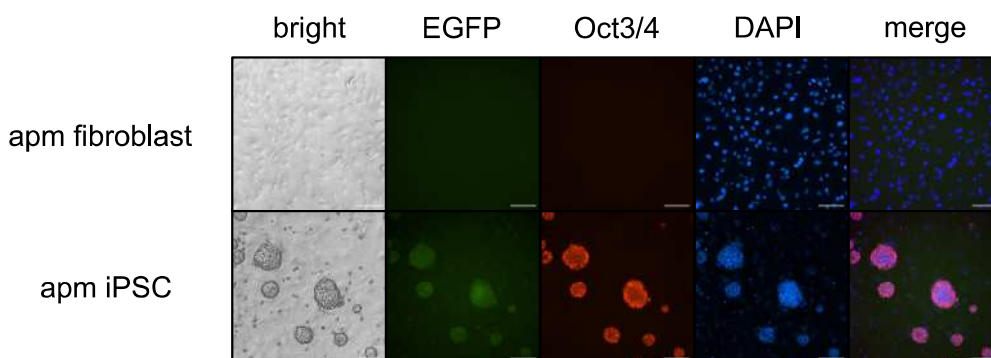
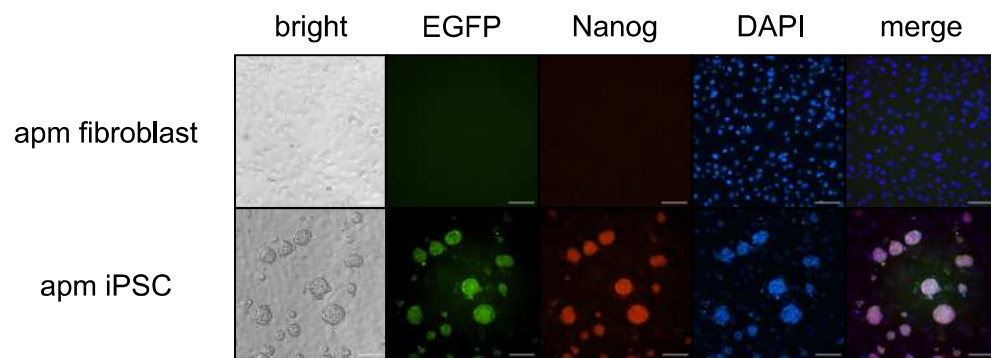
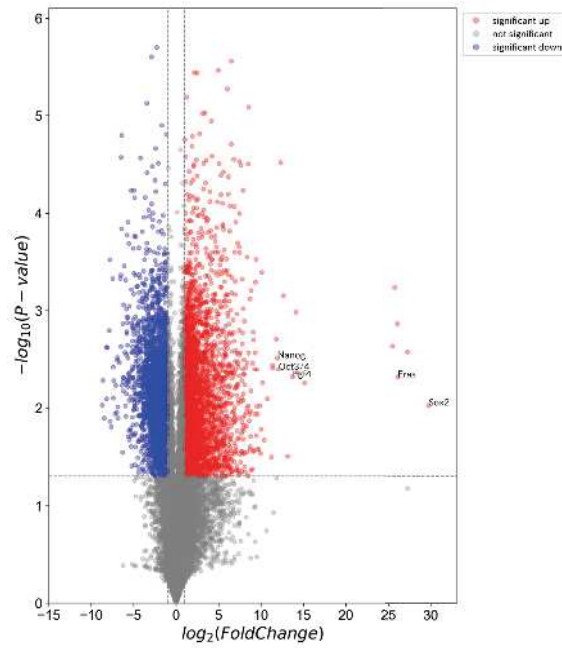


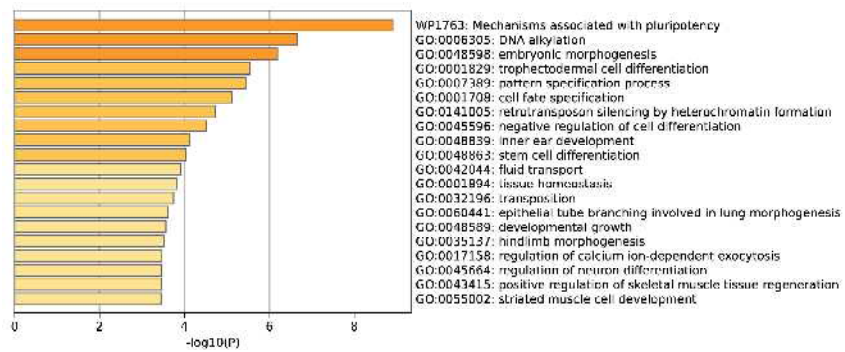
図3-3 *M. minutoides* iPS細胞におけるRNA-seq解析

- (A) *M. minutoides*のiPS細胞および線維芽細胞において発現している遺伝子のボルケーノプロット。iPS細胞において発現が増加している遺伝子を赤、線維芽細胞において発現が増加している遺伝子を青で示す。
- (B) *M. minutoides* iPS細胞において発現が増加している遺伝子のエンリッチメント解析。
- (C) WP1763に含まれる遺伝子のうち、*M. minutoides* iPS細胞において線維芽細胞よりも2倍以上発現が増加していた遺伝子の発現量。
- (D) *M. minutoides*のiPS細胞 (apm_iPS) と線維芽細胞 (apm_fib) および *M. musculus*のiPS細胞 (mouse_iPS) と線維芽細胞 (mouse_fib) の遺伝子発現における主成分分析。
- (E) *M. minutoides*のiPS細胞 (apm_iPS) と線維芽細胞 (apm_fib) および *M. musculus*のiPS細胞 (mouse_iPS) と線維芽細胞 (mouse_fib) における多能性マーカー (Naïve、Primed) および線維芽細胞マーカーの発現量に関するヒートマップ。
- (F) (上) *M. minutoides*および*M. musculus*のiPS細胞において、線維芽細胞よりも2倍以上発現が増加していた遺伝子に関するベン図。(下) 発現が増加していた631個の遺伝子のエンリッチメント解析。
- (G) (上) *M. minutoides*および*M. musculus*のiPS細胞において、線維芽細胞よりも2倍以上発現が減少していた遺伝子に関するベン図。(下) 発現が増加していた582個の遺伝子のエンリッチメント解析。

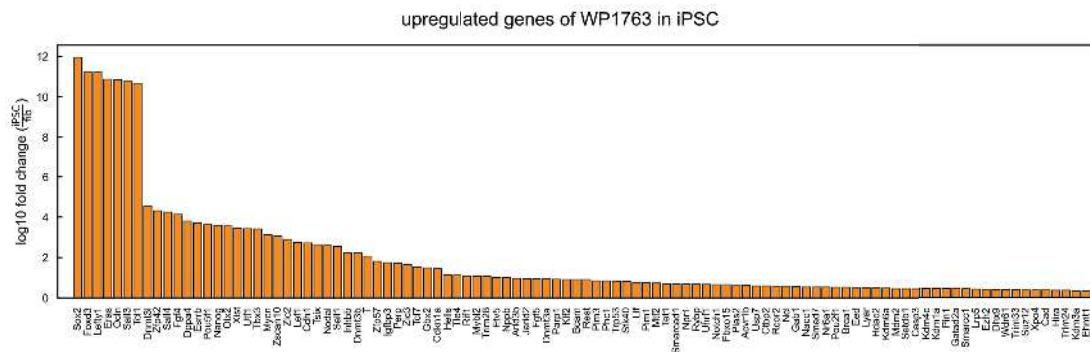
A

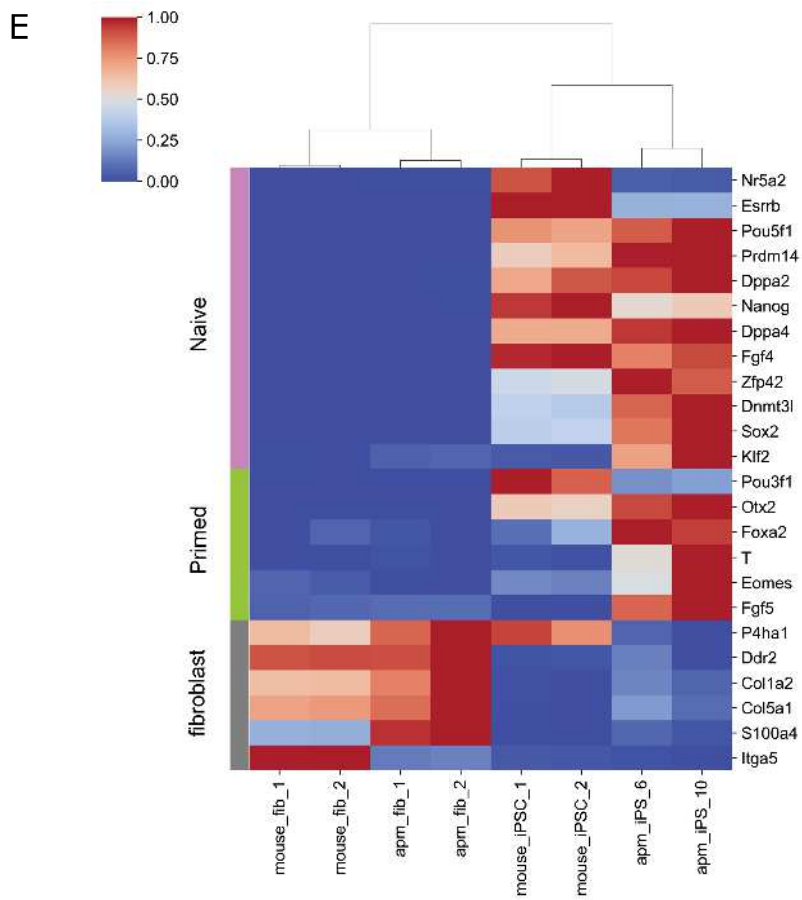
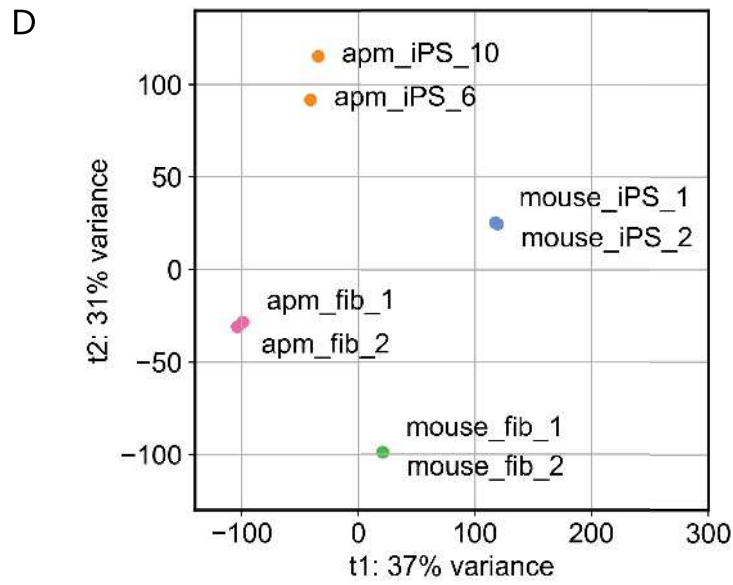


B

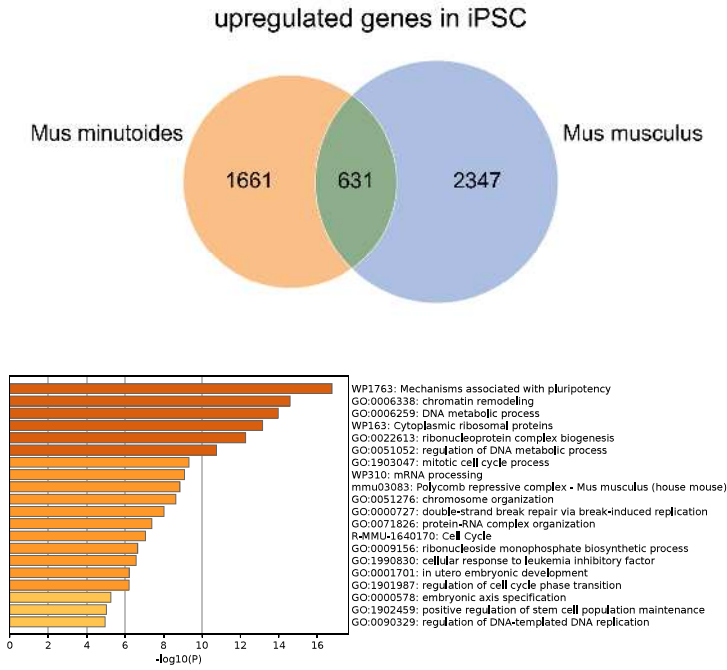


C





F



G

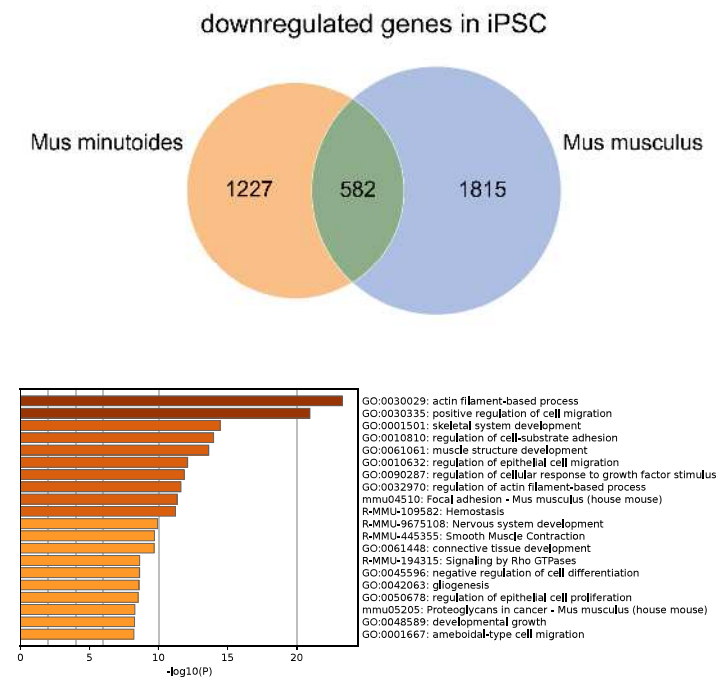
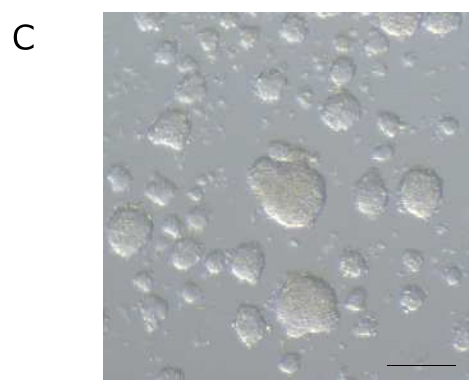
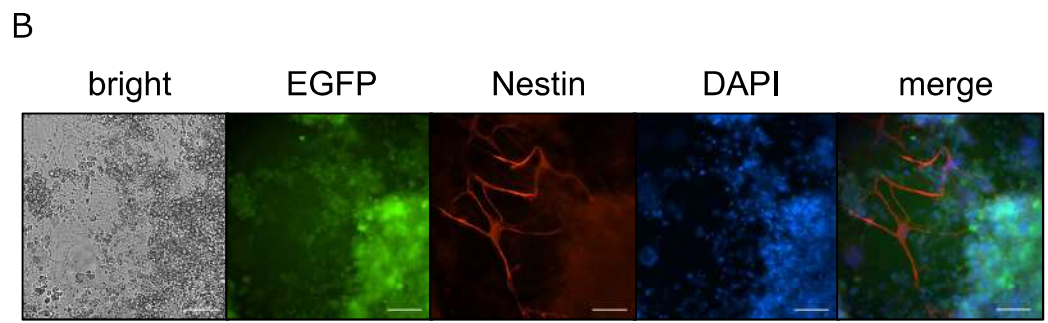
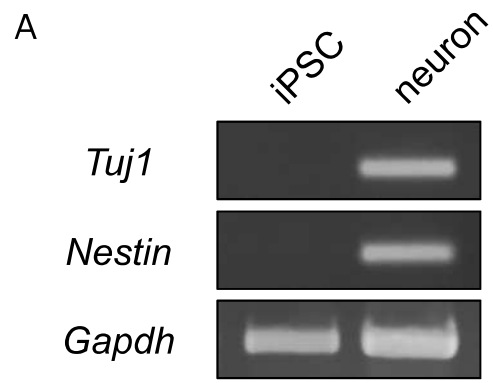


図3-4 *M. minutoides* iPS細胞における*in vitro*分化能解析

- (A) 神経誘導を行った *M. minutoides* iPS 細胞における RT-PCR 解析。コントロールとして *Gapdh* 遺伝子を用いた。
- (B) 神経誘導を行った *M. minutoides* iPS 細胞における抗 Nestin 抗体を用いた蛍光免疫染色像。bar = 50 μm
- (C) 4日間の浮遊培養によって *M. minutoides* iPS 細胞から形成された胚様体。bar = 200 μm
- (D) *M. minutoides* iPS 細胞から形成した胚様体の蛍光顕微鏡像。bar = 100 μm
- (E) 10または20日間浮遊培養した胚様体 (EB d10、EB d20) および胚様体遊走細胞 (EB-cell) における RT-PCR 解析。コントロールとして *Gapdh* 遺伝子を用いた。
- (F) 心筋細胞に分化した胚様体遊走細胞の蛍光免疫染色像。bar = 100 μm



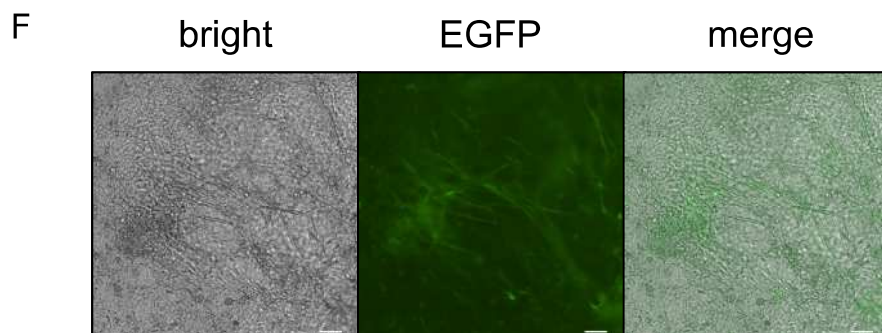
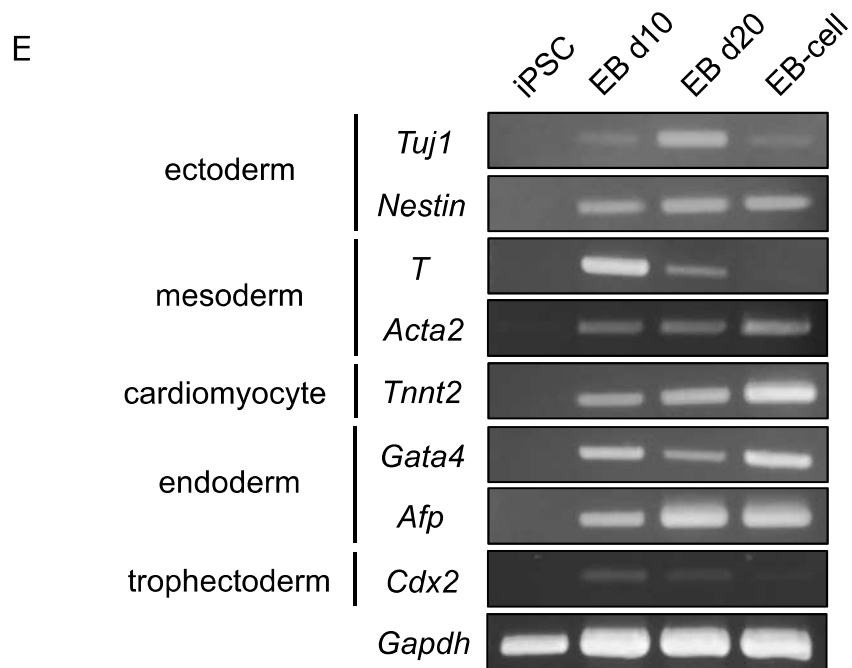
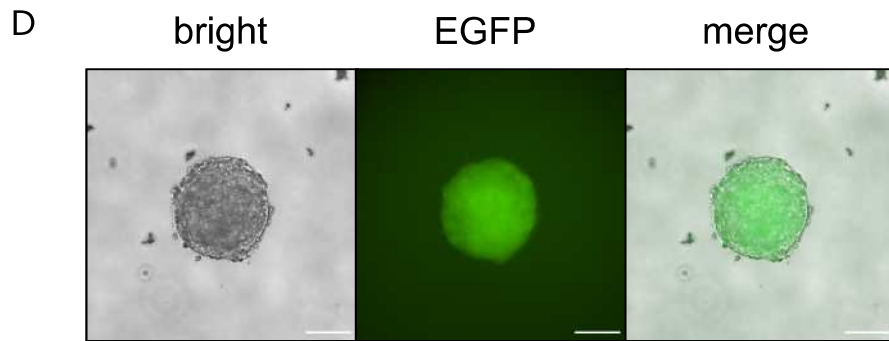
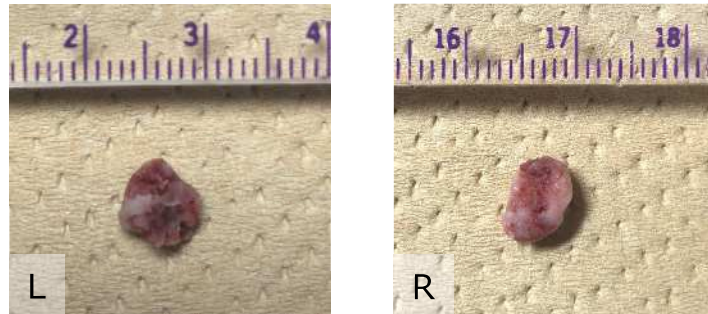


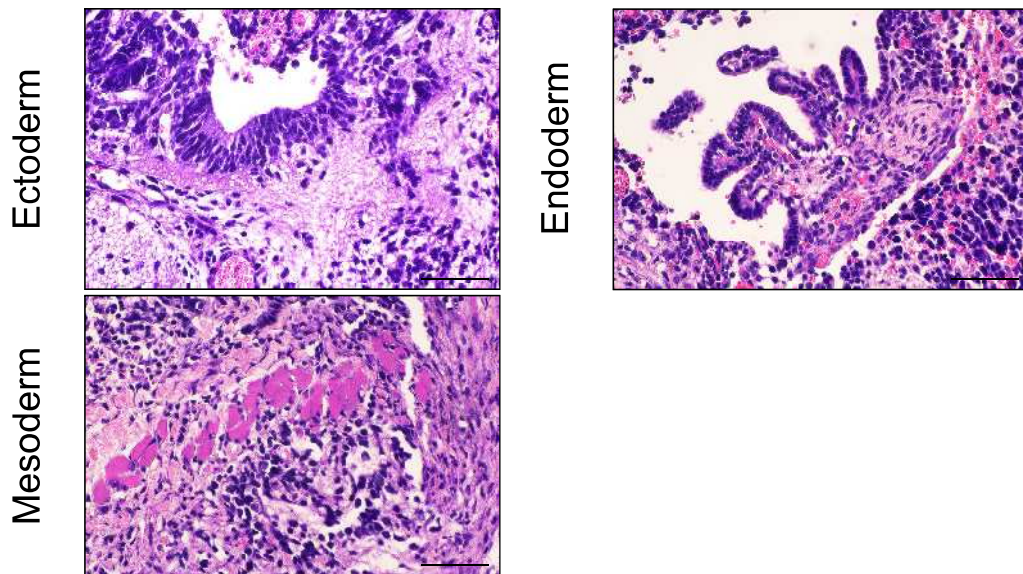
図3-5 *M. minutoides* iPS細胞における*in vivo*分化能解析

- (A) *M. minutoides* iPS細胞から形成されたテラトーマの肉眼像。
- (B) 形成されたテラトーマにおいて認められた外胚葉（神経上皮）、中胚葉（筋肉）および内胚葉（消化管上皮）の組織学的構造。bar = 50 μ m
- (C) テラトーマから抽出したゲノムDNAのPCRによる由来動物種の同定。
"mouse"は*M. musculus*、"apm"は*M. minutoides*を示す。
- (D) 3日齢のキメラマウスと同腹仔。*はキメラマウスを示す。
- (E) 11日齢のキメラマウスと同腹仔。*はキメラマウスを示す。

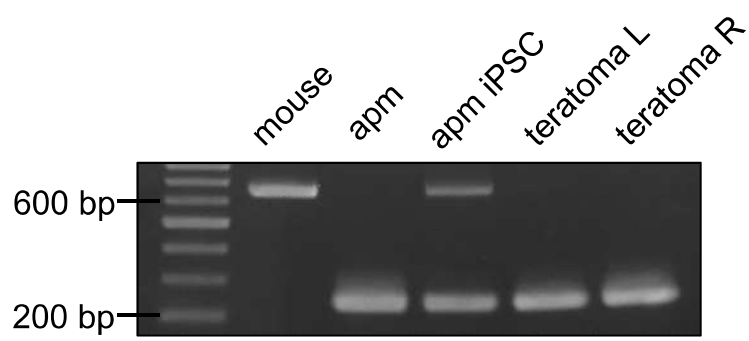
A



B



C



D



E



表3-1 ゲノムPCRに使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' → 3')
<i>Ghr</i> prm	F TCCCTGCAGACCTGTGTTCCGTAC
	R GCACCTCCTGCAGGTACAGGAAG

表3-2 RT-PCRおよびqRT-PCRに使用したプライマー

遺伝子	プライマー配列 (5' → 3')
<i>Nanog</i>	F GATGCGGACTGTGTTCTCTCAGG
	R TCCAAATTCACCTCCAAATCACTGGC
<i>Oct3/4</i>	F GCTAGAACAGTTTGCCAAGCTGC
	R TGCACCAGGGTCTCCGATTTGC
<i>Sox2</i>	F GGATAAGTACACGCTTCCCGGAG
	R TAGGACATGCTGTAGGTGGGCG
<i>Klf4</i>	F GCGAGTCTGACATGGCTGTCAG
	R GTTGTTACTGCTGCAAGCTGCAC
<i>Eras</i>	F GCTCTCACCATCCAGATGACTCAC
	R CTCTGAATCTCATGGACAAGCAGG
<i>Fgf4</i>	F AACGTGGGCATCGGATTCCACC
	R CGTAGGCGTTGTAGTTGTTGGGC
<i>Tuj1</i>	F GGACACCTATTCAGGCCCGACAAC
	R CACGCTGAAGGTGTTTCATGATGC
<i>Nestin</i>	F CGGGAGAGTCGCTTAGAGGTG
	R ATCTTGAGGTGTGCCAGTTGCTG
<i>T</i>	F CATGCTGCCTGTGAGTCATAACG
	R CCTAGAAGATCCAGTTGACACCGG
<i>Acta2</i>	F AGCGTGAGATTGTCCGTGACATC
	R CCTTCTGCATCCTGTCAGCAATG
<i>Tnnt2</i>	F AAGGCTCTGTCCAACATGATGCAC
	R TGATCCGTTTTTCGAGAACGTTG
<i>Gata4</i>	F GGTA ACTCCAGCAATGCCACTAGC
	R CCTGGAAAGGTGTTTGAACAACCCG
<i>Afp</i>	F AAGCTGCGCTCTCTACCAGAC
	R TGGCACAGATCCTTGTGGAAGATG
<i>Cdx2</i>	F CTGGAGCTGGAGAAGGAGTTTCAC
	R GCAAGGAGGTCACAGGACTCAAG
<i>Gapdh</i>	F GTGCTGAGTATGTCGTGGAGTC
	R CATACTTGGCAGGTTTCTCCAG

表3-3 それぞれのiPS細胞において発現が増加していた遺伝子

	遺伝子	iPS細胞	
		<i>Mus minutoides</i>	<i>Mus musculus</i>
Naïve marker	<i>Zfp42</i>	○	○
	<i>Dppa3</i>	○	○
	<i>Tbx3</i>	○	○
	<i>Dazl</i>		○
	<i>Pecam1</i>		○
Primed marker	<i>Otx2</i>	○	○
	<i>Fgf5</i>	○	
	<i>Foxa2</i>	○	
	<i>Nodal</i>		○
	<i>Lefty1</i>		○
	<i>Lefty2</i>		○

総合考察

地球上には約 6,000 種の哺乳動物が生息しているとされており、自然選択および人間による育種を受けた結果、それぞれの動物種あるいは品種ごとに、一定の体の大きさを維持しながらその大きさは次世代に受け継がれる。これまで、哺乳動物の体の大きさに影響を与える因子に関して、数多くの研究が行われてきた。しかしながら、体の大きさを調節し、維持するメカニズムは多数の因子が複雑に相互作用しあって構成されていると予想されるため、全貌の解明には至っていない。

哺乳動物の体の大きさに影響を与える因子に関して行われたこれまでの研究は、単一動物種における突然変異個体や人為的な遺伝子操作を行った個体の解析がほとんどである (Bartke, 1964; Akiba *et al.*, 2022)。動物種を超えて体の大きさに影響を与える重要な因子は明らかにされているものの、ほとんどの研究において動物種間の普遍性に着目した検討は行われていない。近年、近縁な 2 種の哺乳動物 (Debao pony および Mongolian horse) を用いて体の大きさに着目した研究が報告されたが (Fang *et al.*, 2021)、網羅的に解析されてきた実験動物とは異なりゲノム情報や遺伝子の機能などのデータ量が十分でないため、結果を他の動物種へ外挿することは困難であると考えた。

そこで本研究においては、世界最小の哺乳動物のひとつとして知られるアフリカチビネ

ズミ (*Mus minutoides*) を用いた解析を行い、*M. minutoides* に矮小性をもたらしている要因について解明することによって、齧歯類の体の大きさの調節における普遍的なメカニズムについて考察することを目的とした。

第 1 章では、*M. minutoides* における特性が全く明らかにされていない成長関連因子、特に代表的な因子のひとつである成長ホルモン (*Growth hormone: Gh*) 遺伝子、および成長ホルモン産生細胞の分化に関与する *Prop1* 遺伝子について解析し、分子生物学的な側面からその特徴を明らかにした。哺乳動物の体の大きさの調節においてはこれまで、*Gh* 遺伝子は重要な役割を果たしていることは数多く報告されている (Chen *et al.*, 1990; Chen *et al.*, 1991; Iio *et al.*, 2020)。そこで、哺乳動物の中でも極めて矮小な *M. minutoides* における *Gh* 遺伝子や *Prop1* 遺伝子の配列や発現が他の哺乳動物とは異なるのではないかとこの仮説に基づいて実験を行った。その結果、*M. minutoides* においては *Gh* 遺伝子ならびに *Prop1* 遺伝子ともに、塩基配列のみならず、推定されるアミノ酸配列も *M. musculus* とは異なる箇所が見つかった。*M. minutoides* の *Gh* タンパクは全体からすると 0.93% (2 個) のアミノ酸残基が異なっていたのみであるが、細胞内輸送に関与する signal sequence と受容体に結合する機能領域 (Li and Dixon, 1971) にそれぞれ異なるアミノ酸残基が位置していたため、*M. minutoides* において *Gh* タンパクが異常な細胞内局在や細胞外分泌を示したり、*Gh* タンパクの受容体への結合能が *M. musculus* とは異なる可能

性が考えられる。また、Prop1 タンパクは転写因子として働くことが知られているが、*M. minutoides* においては 4.48% (10 個) と比較的高い割合で *M. musculus* と異なっており、さらにその多くが転写促進ドメイン (Pfaffle and Klammt, 2011) に分布していた。従って、カスケードの下流に位置する *Pit1* 遺伝子の転写量が *M. musculus* とは異なる可能性が考えられる。今後、生化学的な検査や培養細胞を用いたより詳細な解析が必要であるが、*M. minutoides* における *Gh* 遺伝子や *Prop1* 遺伝子の分子生物学的解析によって、*Gh-Igf1 axis* が *M. minutoides* の矮小性に一定の割合で関与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* 遺伝子の発現を解析したところ、予想に反して *M. minutoides* における *Gh* 遺伝子の発現は *M. musculus* における *Gh* 遺伝子の発現よりも高い傾向が認められた。ヒトにおいて小人症を呈するラロン症候群患者やその病態モデルとして開発された遺伝子改変動物では、矮小個体となるとともに、肝臓におけるインスリン様成長因子 1 (Insulin-like growth factor 1: *Igf1*) の分泌量低下によるフィードバックによって下垂体での *Gh* 遺伝子の発現が増加することが報告されている (Zhou *et al.*, 1997; Hinrichs *et al.*, 2018) が、本研究における *M. minutoides* を用いた独創的なモデル構築によって、*M. musculus* と *M. minutoides* の関係と、健常個体とラロン症候群個体との類似した関係性の発見につながったと考える。

第 1 章において、*M. minutoides* の *Gh* 遺伝子の特徴的な発現動態を明らかにした。続いての第 2 章では、*Gh* 遺伝子を起点として *Igf1* 遺伝子の発現を促すシグナル伝達経路 (*Gh-Igf1 axis*) の中心的な構成因子である成長ホルモン受容体 (*Growth hormone receptor: Ghr*) 遺伝子に着目した。*Gh* 遺伝子や *Prop1* 遺伝子の解析と同様の方法を用いて解析を行ったところ、*M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子において、タンパクをコードする coding sequence (CDS) の塩基配列は *M. musculus* とは一致せず、さらに *Ghr* タンパクにおいては *Gh* タンパクおよび *Prop1* タンパクよりも多い 7.38% (48 個) のアミノ酸残基が異なっていることが明らかになった。その中でも P469L (469 番目のプロリンがロイシンに変化) は、VaProS による予測において *Ghr* タンパクの機能に「有害な変異」であると判定されたのみならず、両生類のネツタイツメガエル (*Xenopus tropicalis*) を含む脊椎動物間でのアミノ酸配列のアラインメント解析からも、*M. minutoides* 特異的なアミノ酸残基であることが明らかになった。*M. musculus* の *Ghr* タンパクにおいて、P469L が含まれる領域は細胞内シグナル伝達に重要であり (Rowland et al., 2005)、またタンパクの立体構造において、特徴的な分子構造を有するアミノ酸であるプロリン (P) は相互作用部位の形成に密接に関与しているとされている (Kini and Evans, 1995)。本研究においては *Ghr* タンパクの機能に関する直接の解析は行っていないものの、*M. minutoides* においては *M. musculus* と異なるアミノ酸残基の数やその位置、さらには予測アルゴリズムの結果などから、*Ghr* 遺伝子は *M. minutoides* の矮小性と強い相関があると十分に考察できる。

M. minutoides 尾端片から樹立した線維芽細胞、ならびに摘出した組織を用いて *Ghr* 遺伝子の発現解析を行ったところ、いずれにおいても *M. minutoides* の発現は *M. musculus* よりも有意に低く、ラロン症候群における *Gh* 遺伝子の発現増加、*Ghr* 遺伝子および *Igf1* 遺伝子の発現減少と類似していた。また本研究において初めて発見した、*Ghr* 遺伝子の 5'-非翻訳領域 (5'-untranslated region: 5'-UTR) における *M. minutoides* 特有の *dwarf* 配列の機能解析を行ったところ、*dwarf* 配列を含むプラスミドを導入した細胞群において EGFP の蛍光強度が有意に低く、*dwarf* 配列が下流の遺伝子の発現を抑制している可能性が示唆された。これらの結果から *M. minutoides* の *Ghr* 遺伝子の発現は、mRNA の転写レベルだけでなくタンパクの翻訳レベルにおいても抑制されていると考えられる。

以上、*M. minutoides* においては、特有の *dwarf* 配列が *M. minutoides* のラロン症候群様の生理状態を引き起こし、矮小の表現型を生みだしている可能性が考えられた。今後は、*Ghr* 遺伝子の転写および翻訳が減少した Gh-Igf1 axis が生体へ与える影響についてさらに解析を行い、*M. minutoides* が矮小となるさらに詳しいメカニズムを解明する必要がある。

第 1 章および第 2 章では、分子生物学的な解析手法を用いて *M. minutoides* の Gh-Igf1 axis を中心とした成長関連因子の特徴を明らかにするとともに、*M. minutoides* の矮小性との関連について考察した。続いて第 3 章では、発生工学的手法への応用を目的として *M. minutoides* の人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cell: iPS 細胞) の樹立お

よびその幹細胞としての性状評価を行った。今回樹立した *M. minutoides* iPS 細胞は naïve 型と予想されるドーム状のコロニーを形成し、*in vitro* のみならず *in vivo* においても三胚葉への多分化能を示した。さらに、キメラ動物への高率な寄与能を示したため、発生工学の手法である胚盤胞補完法への応用が期待できた。胚盤胞補完法とは、組織形成に必須なマスター遺伝子をノックアウトした胚盤胞期胚に多能性幹細胞を注入することによって、誕生するキメラ動物において欠損組織や細胞を多能性幹細胞に代替的に形成させる方法である (Chen *et al.*, 1993; Kobayashi *et al.*, 2010)。例えば、*M. musculus* において *Pdx1* 遺伝子をノックアウトし、働かなくすると膵臓は形成されないが、*Pdx1* 遺伝子ノックアウト胚盤胞期胚に多能性幹細胞を注入すると、多能性幹細胞に由来する膵臓を持つキメラ個体を作成できる (Kobayashi *et al.*, 2010)。この方法を応用することにより、個体や受精卵の入手が困難である *M. minutoides* の組織をキメラ動物体内に形成し、*in vivo* における解析が可能となる。特に、哺乳動物の大きさを調節するメカニズム解明の点から今後、Gh を産生する下垂体や Gh のシグナルを受容して Igf1 を産生する肝臓などの Gh-Igf1 axis において重要な組織にのみ着目して解析することができるという点は *M. minutoides* を用いた実験において大きなアドバンテージになる。

以上、本研究において、*M. minutoides* に矮小性がもたらされている原因やメカニズムを考察するため、まず代表的な成長関連因子の解析を行うことによって矮小といった表現

型との関連を示した。次に、*M. minutoides* の矮小性はラロン症候群様の生理状態を有することに起因するという仮説を提唱し、*M. musculus* の体の大きさを調節するメカニズムにおける分子レベルでの違いの一端を明らかにした。続いて、*M. minutoides* iPS 細胞を樹立してその幹細胞としての基本的な性状を明らかにし、今後胚盤胞補完法を用いた応用研究を遂行できる可能性を示した。本研究の成果が、動物種を超えた普遍的な動物の大きさを調節するメカニズムを解明するための端緒となることを望んでいる。

参考文献

- Abboud D, Daly AF, Dupuis N, Bahri MA, Inoue A, Chevigné A, Ectors F, Plenevaux A, Pirotte B, Beckers A, Hanson J** GPR101 drives growth hormone hypersecretion and gigantism in mice via constitutive activation of G(s) and G(q/11). 2020. *Nat Commun.* 11 (1): 4752.
- Akiba K, Hasegawa Y, Katoh-Fukui Y, Terao M, Takada S, Hasegawa T, Fukami M, Narumi S** POU1F1/Pou1f1 c.143-83A > G Variant Disrupts the Branch Site in Pre-mRNA and Leads to Dwarfism. 2022. *Endocrinology.* 164 (2).
- Akter MS, Hada M, Shikata D, Watanabe G, Ogura A, Matoba S** CRISPR/Cas9-based genetic screen of SCNT-reprogramming resistant genes identifies critical genes for male germ cell development in mice. 2021. *Sci Rep.* 11 (1): 15438.
- Ansell PJ, Zhou Y, Schjeide BM, Kerner A, Zhao J, Zhang X, Klibanski A** Regulation of growth hormone expression by Delta-like protein 1 (Dlk1). 2007. *Mol Cell Endocrinol.* 271 (1-2): 55-63.
- Aoyama T, Fukao A, Fujiwara T** Translational regulation is mediated by the cross-talk between the miRNA pathway and RNA binding proteins. 2016. *Folia Pharmacologica Japonica.* 147 (6): 346-350.
- Argetsinger LS, Campbell GS, Yang X, Witthuhn BA, Silvennoinen O, Ihle JN, Carter-Su C** Identification of JAK2 as a growth hormone receptor-associated tyrosine kinase. 1993. *Cell.* 74 (2): 237-44.
- Ascacio-Martínez JA, Barrera-Saldaña HA** A dog growth hormone cDNA codes for a mature protein identical to pig growth hormone. 1994. *Gene.* 143 (2): 277-80.
- Bao L, He L, Chen J, Wu Z, Liao J, Rao L, Ren J, Li H, Zhu H, Qian L, Gu Y, Dai H, Xu X, Zhou J, Wang W, Cui C, Xiao L** Reprogramming of ovine adult fibroblasts to pluripotency via drug-inducible expression of defined factors. 2011. *Cell Res.* 21 (4): 600-8.
- Bartke A** Histology of the anterior hypophysis, thyroid and gonads of two types of dwarf mice. 1964. *The Anatomical Record.* 149 (2): 225-235.

- Carneiro M, Hu D, Archer J, Feng C, Afonso S, Chen C, Blanco-Aguilar JA, Garreau H, Boucher S, Ferreira PG, Ferrand N, Rubin CJ, Andersson L** Dwarfism and Altered Craniofacial Development in Rabbits Is Caused by a 12.1 kb Deletion at the HMGA2 Locus. 2017. *Genetics*. 205 (2): 955-965.
- Castro-Peralta F, Barrera-Saldana HA** Cloning and sequencing of cDNA encoding the cat growth hormone. 1995. *Gene*. 160 (2): 311-2.
- Charoensuk C, Thamtarana PJ, Chanprasert C, Tangjittipokin W, Shirakawa J, Togashi Y, Orime K, Songprakhon P, Chaichana C, Abubakar Z, Ouying P, Sujitjoo J, Doria A, Plengvidhya N, Yenchitsomanus PT** Autosomal dominant diabetes associated with a novel ZYG11A mutation resulting in cell cycle arrest in beta-cells. 2021. *Mol Cell Endocrinol*. 522: 111126.
- Chen H, Zuo Q, Wang Y, Song J, Yang H, Zhang Y, Li B** Inducing goat pluripotent stem cells with four transcription factor mRNAs that activate endogenous promoters. 2017. *BMC Biotechnol*. 17 (1): 11.
- Chen J, Lansford R, Stewart V, Young F, Alt FW** RAG-2-deficient blastocyst complementation: an assay of gene function in lymphocyte development. 1993. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 90 (10): 4528-32.
- Chen WY, Wight DC, Mehta BV, Wagner TE, Kopchick JJ** Glycine 119 of bovine growth hormone is critical for growth-promoting activity. 1991. *Mol Endocrinol*. 5 (12): 1845-52.
- Chen WY, Wight DC, Wagner TE, Kopchick JJ** Expression of a mutated bovine growth hormone gene suppresses growth of transgenic mice. 1990. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87 (13): 5061-5.
- Chevret P, Robinson TJ, Perez J, Veyrunes F, Britton-Davidian J** A phylogeographic survey of the pygmy mouse *Mus minutoides* in South Africa: taxonomic and karyotypic inference from cytochrome b sequences of museum specimens. 2014. *PLoS One*. 9 (6): e98499.
- Chikani V, Ho KK** Action of GH on skeletal muscle function: molecular and metabolic mechanisms. 2014. *J Mol Endocrinol*. 52 (1): R107-23.
- Chung J, Zhang X, Collins B, Sper RB, Gleason K, Simpson S, Koh S, Sommer J,**

- Flowers WL, Petters RM, Piedrahita JA** High mobility group A2 (HMGA2) deficiency in pigs leads to dwarfism, abnormal fetal resource allocation, and cryptorchidism. 2018. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 115 (21): 5420-5425.
- Correa FA, Nakaguma M, Madeira JLO, Nishi MY, Abrao MG, Jorge AaL, Carvalho LR, Arnhold IJP, Mendonca BB** Combined pituitary hormone deficiency caused by PROP1 mutations: update 20 years post-discovery. 2019. *Arch Endocrinol Metab*. 63 (2): 167-174.
- Coschigano KT, Holland AN, Riders ME, List EO, Flyvbjerg A, Kopchick JJ** Deletion, but not antagonism, of the mouse growth hormone receptor results in severely decreased body weights, insulin, and insulin-like growth factor I levels and increased life span. 2003. *Endocrinology*. 144 (9): 3799-810.
- Cui D, Li F, Li Q, Li J, Zhao Y, Hu X, Zhang R, Li N** Generation of a miniature pig disease model for human Laron syndrome. 2015. *Sci Rep*. 5: 15603.
- Cunningham BC, Ultsch M, De Vos AM, Mulkerrin MG, Clauser KR, Wells JA** Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule. 1991. *Science*. 254 (5033): 821-5.
- Ding S, Wu X, Li G, Han M, Zhuang Y, Xu T** Efficient transposition of the piggyBac (PB) transposon in mammalian cells and mice. 2005. *Cell*. 122 (3): 473-83.
- Domene HM, Fierro-Carrion G** Genetic disorders of GH action pathway. 2018. *Growth Horm IGF Res*. 38: 19-23.
- Endoh M, Niwa H** Stepwise pluripotency transitions in mouse stem cells. 2022. *EMBO Rep*. 23 (9): e55010.
- Evans AL, Faial T, Gilchrist MJ, Down T, Vallier L, Pedersen RA, Wardle FC, Smith JC** Genomic targets of Brachyury (T) in differentiating mouse embryonic stem cells. 2012. *PLoS One*. 7 (3): e33346.
- Evans MJ, Kaufman MH** Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. 1981. *Nature*. 292 (5819): 154-6.
- Ezashi T, Telugu BP, Alexenko AP, Sachdev S, Sinha S, Roberts RM** Derivation of induced pluripotent stem cells from pig somatic cells. 2009. *Proc Natl Acad Sci*

U S A. 106 (27): 10993-8.

Fang J, Zhang D, Cao JW, Zhang L, Liu CX, Xing YP, Wang F, Xu HY, Wang SC, Ling Y, Wang W, Zhang YR, Zhou HM Pathways involved in pony body size development. 2021. *BMC Genomics*. 22 (1): 58.

Ghaleb AM, Yang VW Krüppel-like factor 4 (KLF4): What we currently know. 2017. *Gene*. 611: 27-37.

Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, Rotwein PS, Parks JS, Laron Z, Wood WI Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. 1989. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86 (20): 8083-7.

Goujon L, Allevato G, Simonin G, Paquereau L, Le Cam A, Clark J, Nielsen JH, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M, Et Al. Cytoplasmic sequences of the growth hormone receptor necessary for signal transduction. 1994. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91 (3): 957-61.

Hackett RH, Wang YD, Larner AC Mapping of the cytoplasmic domain of the human growth hormone receptor required for the activation of Jak2 and Stat proteins. 1995. *J Biol Chem*. 270 (36): 21326-30.

Hall J, Guo G, Wray J, Eyres I, Nichols J, Grotewold L, Morfopoulou S, Humphreys P, Mansfield W, Walker R, Tomlinson S, Smith A Oct4 and LIF/Stat3 additively induce Krüppel factors to sustain embryonic stem cell self-renewal. 2009. *Cell Stem Cell*. 5 (6): 597-609.

Hamanaka S, Umino A, Sato H, Hayama T, Yanagida A, Mizuno N, Kobayashi T, Kasai M, Suchy FP, Yamazaki S, Masaki H, Yamaguchi T, Nakauchi H Generation of Vascular Endothelial Cells and Hematopoietic Cells by Blastocyst Complementation. 2018. *Stem Cell Reports*. 11 (4): 988-997.

Han X, Han J, Ding F, Cao S, Lim SS, Dai Y, Zhang R, Zhang Y, Lim B, Li N Generation of induced pluripotent stem cells from bovine embryonic fibroblast cells. 2011. *Cell Res*. 21 (10): 1509-12.

Hansen LH, Wang X, Kopchick JJ, Bouchelouche P, Nielsen JH, Galsgaard ED,

- Billestrup N** Identification of tyrosine residues in the intracellular domain of the growth hormone receptor required for transcriptional signaling and Stat5 activation. 1996. *J Biol Chem.* 271 (21): 12669-73.
- Hayashi M, Zywitza V, Naitou Y, Hamazaki N, Goeritz F, Hermes R, Holtze S, Lazzari G, Galli C, Stejskal J, Diecke S, Hildebrandt TB, Hayashi K** Robust induction of primordial germ cells of white rhinoceros on the brink of extinction. 2022. *Sci Adv.* 8 (49): eabp9683.
- Hayashi Y, Caboni L, Das D, Yumoto F, Clayton T, Deller MC, Nguyen P, Farr CL, Chiu HJ, Miller MD, Elsliger MA, Deacon AM, Godzik A, Lesley SA, Tomoda K, Conklin BR, Wilson IA, Yamanaka S, Fletterick RJ** Structure-based discovery of NANOG variant with enhanced properties to promote self-renewal and reprogramming of pluripotent stem cells. 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 112 (15): 4666-71.
- Hinrichs A, Kessler B, Kurome M, Blutke A, Kemter E, Bernau M, Scholz AM, Rathkolb B, Renner S, Bultmann S, Leonhardt H, De Angelis MH, Nagashima H, Hoeflich A, Blum WF, Bidlingmaier M, Wanke R, Dahlhoff M, Wolf E** Growth hormone receptor-deficient pigs resemble the pathophysiology of human Laron syndrome and reveal altered activation of signaling cascades in the liver. 2018. *Mol Metab.* 11: 113-128.
- Hirayama R, Toyohara K, Watanabe K, Otsuki T, Araoka T, Mae SI, Horinouchi T, Yamamura T, Okita K, Hotta A, Iijima K, Nozu K, Osafune K** iPSC-derived type IV collagen alpha5-expressing kidney organoids model Alport syndrome. 2023. *Commun Biol.* 6 (1): 854.
- Honda A, Choijookhuu N, Izu H, Kawano Y, Inokuchi M, Honsho K, Lee AR, Nabekura H, Ohta H, Tsukiyama T, Ohinata Y, Kuroiwa A, Hishikawa Y, Saitou M, Jogahara T, Koshimoto C** Flexible adaptation of male germ cells from female iPSCs of endangered *Tokudaia osimensis*. 2017. *Sci Adv.* 3 (5): e1602179.
- Iio A, Maeda S, Yonezawa T, Momoi Y, Motegi T** Isolated growth hormone deficiency in a Chihuahua with a GH1 mutation. 2020. *J Vet Diagn Invest.* 32 (5): 733-736.
- Isotani A, Hatayama H, Kaseda K, Ikawa M, Okabe M** Formation of a thymus from rat ES cells in xenogeneic nude mouse<-->rat ES chimeras. 2011. *Genes Cells.*

16 (4): 397-405.

Juarez-Aguilar E, Castro-Munozledo F, Guerra-Rodriguez NE, Resendez-Perez D, Martinez-Rodriguez HG, Barrera-Saldana HA, Kuri-Harcuch W Functional domains of human growth hormone necessary for the adipogenic activity of hGH/hPL chimeric molecules. 1999. *J Cell Sci.* 112 Pt 18: 3127-35.

Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Zidek A, Potapenko A, Bridgland A, Meyer C, Kohl SaA, Ballard AJ, Cowie A, Romera-Paredes B, Nikolov S, Jain R, Adler J, Back T, Petersen S, Reiman D, Clancy E, Zielinski M, Steinegger M, Pacholska M, Berghammer T, Bodenstein S, Silver D, Vinyals O, Senior AW, Kavukcuoglu K, Kohli P, Hassabis D Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. 2021. *Nature.* 596 (7873): 583-589.

Kaabi Y Growth hormone and its receptor: A molecular insight. 2012. *Saudi Journal for Health Sciences.* 1 (2).

Katayama M, Fukuda T, Kaneko T, Nakagawa Y, Tajima A, Naito M, Ohmaki H, Endo D, Asano M, Nagamine T, Nakaya Y, Saito K, Watanabe Y, Tani T, Inoue-Murayama M, Nakajima N, Onuma M Induced pluripotent stem cells of endangered avian species. 2022. *Commun Biol.* 5 (1): 1049.

Katayama M, Hirayama T, Horie K, Kiyono T, Donai K, Takeda S, Nishimori K, Fukuda T Induced Pluripotent Stem Cells With Six Reprogramming Factors From Prairie Vole, Which Is an Animal Model for Social Behaviors. 2016. *Cell Transplant.* 25 (5): 783-96.

Kawaguchi T, Tsukiyama T, Kimura K, Matsuyama S, Minami N, Yamada M, Imai H Generation of Naive Bovine Induced Pluripotent Stem Cells Using PiggyBac Transposition of Doxycycline-Inducible Transcription Factors. 2015. *PLoS One.* 10 (8): e0135403.

Kendall SK, Samuelson LC, Saunders TL, Wood RI, Camper SA Targeted disruption of the pituitary glycoprotein hormone alpha-subunit produces hypogonadal and hypothyroid mice. 1995. *Genes Dev.* 9 (16): 2007-19.

Kim A, Pyykko I Size matters: versatile use of PiggyBac transposons as a genetic manipulation tool. 2011. *Mol Cell Biochem.* 354 (1-2): 301-9.

Kini RM, Evans HJ A hypothetical structural role for proline residues in the flanking segments of protein-protein interaction sites. 1995. *Biochem Biophys Res Commun.* 212 (3): 1115-24.

Kobayashi R, Horii T, Hatada I Genome editing for developing disease models in mice. 2022. *Journal of mammalian ova research*= 日本哺乳動物卵子学会誌. 39 (1): 9-15.

Kobayashi T, Yamaguchi T, Hamanaka S, Kato-Itoh M, Yamazaki Y, Iбата M, Sato H, Lee YS, Usui J, Knisely AS, Hirabayashi M, Nakauchi H Generation of rat pancreas in mouse by interspecific blastocyst injection of pluripotent stem cells. 2010. *Cell.* 142 (5): 787-99.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. 2018. *Mol Biol Evol.* 35 (6): 1547-1549.

Kunath T, Saba-El-Leil MK, Almousaillekh M, Wray J, Meloche S, Smith A FGF stimulation of the Erk1/2 signalling cascade triggers transition of pluripotent embryonic stem cells from self-renewal to lineage commitment. 2007. *Development.* 134 (16): 2895-902.

Laron Z, Pertzelan A, Mannheimer S Genetic pituitary dwarfism with high serum concentration of growth hormone--a new inborn error of metabolism? 1966. *Isr J Med Sci.* 2 (2): 152-5.

Li CH, Dixon JS Human pituitary growth hormone. 1971. *Arch Biochem Biophys.* 146 (1): 233-6.

Li K, Meza Guzman LG, Whitehead L, Leong E, Kueh A, Alexander WS, Kershaw NJ, Babon JJ, Doggett K, Nicholson SE SOCS2 regulation of growth hormone signaling requires a canonical interaction with phosphotyrosine. 2022. *Biosci Rep.* 42 (12).

Li W, Wei W, Zhu S, Zhu J, Shi Y, Lin T, Hao E, Hayek A, Deng H, Ding S Generation of rat and human induced pluripotent stem cells by combining genetic reprogramming and chemical inhibitors. 2009. *Cell Stem Cell.* 4 (1): 16-9.

Li Z, Li Y, Zhang Q, Ge W, Zhang Y, Zhao X, Hu J, Yuan L, Zhang W Establishment

- of Bactrian Camel Induced Pluripotent Stem Cells and Prediction of Their Unique Pluripotency Genes. 2023. *Int J Mol Sci.* 24 (3).
- Liao J, Cui C, Chen S, Ren J, Chen J, Gao Y, Li H, Jia N, Cheng L, Xiao H, Xiao L** Generation of induced pluripotent stem cell lines from adult rat cells. 2009. *Cell Stem Cell.* 4 (1): 11-5.
- Liao M** cDNA cloning of growth hormone from giant panda (*Ailuropoda melanoleuca*) and its expression in *Escherichia coli*. 2003. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology.*
- Lin J, Fernandez I, Roy K** Development of feeder-free culture systems for generation of ckit+sca1+ progenitors from mouse iPS cells. 2011. *Stem Cell Rev Rep.* 7 (3): 736-47.
- Lin S, Li C, Li C, Zhang X** Growth Hormone Receptor Mutations Related to Individual Dwarfism. 2018. *Int J Mol Sci.* 19 (5).
- List EO, Sackmann-Sala L, Berryman DE, Funk K, Kelder B, Gosney ES, Okada S, Ding J, Cruz-Topete D, Kopchick JJ** Endocrine parameters and phenotypes of the growth hormone receptor gene disrupted (GHR^{-/-}) mouse. 2011. *Endocr Rev.* 32 (3): 356-86.
- Liu M, Zhao L, Wang Z, Su H, Wang T, Yang G, Chen L, Wu B, Zhao G, Guo J, Yang Z, Zhang J, Hao C, Ma T, Song Y, Bao S, Zuo Y, Li X, Cao G** Generation of Sheep Induced Pluripotent Stem Cells With Defined DOX-Inducible Transcription Factors via piggyBac Transposition. 2021. *Front Cell Dev Biol.* 9: 785055.
- Ludwig-Peisker O, Ansel E, Schweizer D, Jagannathan V, Loechel R, Leeb T** PCYT1A Missense Variant in Vizslas with Disproportionate Dwarfism. 2022. *Genes (Basel).* 13 (12).
- Lupu F, Terwilliger JD, Lee K, Segre GV, Efstratiadis A** Roles of growth hormone and insulin-like growth factor 1 in mouse postnatal growth. 2001. *Dev Biol.* 229 (1): 141-62.
- Maekawa M, Yamaguchi K, Nakamura T, Shibukawa R, Kodanaka I, Ichisaka T, Kawamura Y, Mochizuki H, Goshima N, Yamanaka S** Direct reprogramming of somatic cells is promoted by maternal transcription factor Glis1. 2011. *Nature.*

474 (7350): 225-9.

Maharajan P, Maharajan V Growth hormone signal transduction. 1993. *Experientia*. 49 (11): 980-987.

Mayshar Y, Rom E, Chumakov I, Kronman A, Yayon A, Benvenisty N Fibroblast growth factor 4 and its novel splice isoform have opposing effects on the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. 2008. *Stem Cells*. 26 (3): 767-74.

Mazur CM, Castro Andrade CD, Tokavanich N, Sato T, Bruce M, Brooks DJ, Boussein ML, Wang JS, Wein MN Partial prevention of glucocorticoid-induced osteocyte deterioration in young male mice with osteocrin gene therapy. 2022. *iScience*. 25 (9): 105019.

Mcpheeron AC, Lee SJ Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94 (23): 12457-61.

Miyawaki S, Kawamura Y, Oiwa Y, Shimizu A, Hachiya T, Bono H, Koya I, Okada Y, Kimura T, Tsuchiya Y, Suzuki S, Onishi N, Kuzumaki N, Matsuzaki Y, Narita M, Ikeda E, Okanoya K, Seino K, Saya H, Okano H, Miura K Tumour resistance in induced pluripotent stem cells derived from naked mole-rats. 2016. *Nat Commun*. 7: 11471.

Mo X, Li N, Wu S Generation and characterization of bat-induced pluripotent stem cells. 2014. *Theriogenology*. 82 (2): 283-93.

Mukherjee A, Alzhanov D, Rotwein P Defining human insulin-like growth factor I gene regulation. 2016. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 311 (2): E519-29.

Nichols J, Smith A Naive and primed pluripotent states. 2009. *Cell Stem Cell*. 4 (6): 487-92.

Niwa H How is pluripotency determined and maintained? 2007. *Development*. 134 (4): 635-46.

Nonaka A, Yoshida M, Iha M, Kubo Y, Kihara Y, Kikuchi T, Kumagai Y, Sasaki A, Kobayashi M Exogenous expression of homeoprotein EGAM1N prevents in vitro cardiomyogenesis by impairing expression of T and Nkx2.5, but not Mef2c, in

- mouse embryonic stem cells. 2016. *Cytotechnology*. 68 (6): 2431-2436.
- Okuma S** Study of Growth Hormone in Spontaneous Dwarf Rat. 1984. *Folia endocrinol*. 60 (8): 1005-1014.
- Olson LE, Tollkuhn J, Scafoglio C, Krones A, Zhang J, Ohgi KA, Wu W, Taketo MM, Kemler R, Grosschedl R, Rose D, Li X, Rosenfeld MG** Homeodomain-mediated beta-catenin-dependent switching events dictate cell-lineage determination. 2006. *Cell*. 125 (3): 593-605.
- Pfaffle R, Klammt J** Pituitary transcription factors in the aetiology of combined pituitary hormone deficiency. 2011. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 25 (1): 43-60.
- Pfaffle RW, Blankenstein O, Wuller S, Kentrup H** Combined pituitary hormone deficiency: role of Pit-1 and Prop-1. 1999. *Acta Paediatr Suppl*. 88 (433): 33-41.
- Polo JM, Anderssen E, Walsh RM, Schwarz BA, Nefzger CM, Lim SM, Borkent M, Apostolou E, Alaei S, Cloutier J, Bar-Nur O, Cheloufi S, Stadtfeld M, Figueroa ME, Robinton D, Natesan S, Melnick A, Zhu J, Ramaswamy S, Hochedlinger K** A molecular roadmap of reprogramming somatic cells into iPS cells. 2012. *Cell*. 151 (7): 1617-32.
- Rahmoun M, Perez J, Saunders PA, Boizet-Bonhoure B, Wilhelm D, Poulat F, Veyrunes F** Anatomical and molecular analyses of XY ovaries from the African pygmy mouse *Mus minutoides*. 2014. *Sex Dev*. 8 (6): 356-63.
- Ramaswamy K, Yik WY, Wang XM, Oliphant EN, Lu W, Shibata D, Ryder OA, Hacia JG** Derivation of induced pluripotent stem cells from orangutan skin fibroblasts. 2015. *BMC Res Notes*. 8: 577.
- Reh CS, Geffner ME** Somatotropin in the treatment of growth hormone deficiency and Turner syndrome in pediatric patients: a review. 2010. *Clin Pharmacol*. 2: 111-22.
- Rowland JE, Lichanska AM, Kerr LM, White M, D'aniello EM, Maher SL, Brown R, Teasdale RD, Noakes PG, Waters MJ** In vivo analysis of growth hormone receptor signaling domains and their associated transcripts. 2005. *Mol Cell Biol*. 25 (1): 66-77.

- Sato T, Kudo T, Ikehara Y, Ogawa H, Hirano T, Kiyohara K, Hagiwara K, Togayachi A, Ema M, Takahashi S, Kimata K, Watanabe H, Narimatsu H** Chondroitin sulfate N-acetylgalactosaminyltransferase 1 is necessary for normal endochondral ossification and aggrecan metabolism. 2011. *J Biol Chem.* 286 (7): 5803-12.
- Schaefer GB, Rosenbloom AL, Guevara-Aguirre J, Campbell EA, Ullrich F, Patil K, Frias JL** Facial morphometry of Ecuadorian patients with growth hormone receptor deficiency/Laron syndrome. 1994. *J Med Genet.* 31 (8): 635-9.
- Schaible R, Gowen J** A new dwarf mouse. 1961. *Genetics.* 46: 896.
- Shields JM, Christy RJ, Yang VW** Identification and characterization of a gene encoding a gut-enriched Kruppel-like factor expressed during growth arrest. 1996. *J Biol Chem.* 271 (33): 20009-17.
- Smit LS, Meyer DJ, Billestrup N, Norstedt G, Schwartz J, Carter-Su C** The role of the growth hormone (GH) receptor and JAK1 and JAK2 kinases in the activation of Stats 1, 3, and 5 by GH. 1996. *Mol Endocrinol.* 10 (5): 519-33.
- Snell GD** DWARF, A NEW MENDELIAN RECESSIVE CHARACTER OF THE HOUSE MOUSE. 1929. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15 (9): 733-4.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG** Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. 2009. *Cell.* 136 (4): 731-45.
- Sung YH, Baek IJ, Seong JK, Kim JS, Lee HW** Mouse genetics: catalogue and scissors. 2012. *BMB Rep.* 45 (12): 686-92.
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S** Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. 2007. *Cell.* 131 (5): 861-72.
- Takahashi K, Yamanaka S** Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. 2006. *Cell.* 126 (4): 663-76.
- Takeda N** Gene targeting in embryonic stem cells through homologous recombination. 2007. *Folia Pharmacol. Jpn.* 129 (5): 330-336.
- Tannenbaum GS, Epelbaum J, Bowers CY** Interrelationship between the novel

- peptide ghrelin and somatostatin/growth hormone-releasing hormone in regulation of pulsatile growth hormone secretion. 2003. *Endocrinology*. 144 (3): 967-74.
- Thoma EC, Heckel T, Keller D, Giroud N, Leonard B, Christensen K, Roth A, Bertinetti-Lapatki C, Graf M, Patsch C** Establishment of a translational endothelial cell model using directed differentiation of induced pluripotent stem cells from Cynomolgus monkey. 2016. *Sci Rep*. 6: 35830.
- Usui J, Kobayashi T, Yamaguchi T, Knisely AS, Nishinakamura R, Nakauchi H** Generation of kidney from pluripotent stem cells via blastocyst complementation. 2012. *Am J Pathol*. 180 (6): 2417-26.
- Vagner S, Galy B, Pyronnet S** Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. 2001. *EMBO Rep*. 2 (10): 893-8.
- Van Den Eijnden MJ, Lahaye LL, Strous GJ** Disulfide bonds determine growth hormone receptor folding, dimerisation and ligand binding. 2006. *J Cell Sci*. 119 (Pt 15): 3078-86.
- Varadi M, Anyango S, Deshpande M, Nair S, Natassia C, Yordanova G, Yuan D, Stroe O, Wood G, Laydon A, Zidek A, Green T, Tunyasuvunakool K, Petersen S, Jumper J, Clancy E, Green R, Vora A, Lutfi M, Figurnov M, Cowie A, Hobbs N, Kohli P, Kleywegt G, Birney E, Hassabis D, Velankar S** AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. 2022. *Nucleic Acids Res*. 50 (D1): D439-D444.
- Vasques GA, Andrade NLM, Correa FA, Jorge AaL** Update on new GH-IGF axis genetic defects. 2019. *Arch Endocrinol Metab*. 63 (6): 608-617.
- Voorbij AM, Van Steenbeek FG, Vos-Loohuis M, Martens EE, Hanson-Nilsson JM, Van Oost BA, Kooistra HS, Leegwater PA** A contracted DNA repeat in LHX3 intron 5 is associated with aberrant splicing and pituitary dwarfism in German shepherd dogs. 2011. *PLoS One*. 6 (11): e27940.
- Vučak M, Bangura J, Ghersi BM, Nichols J, Hughes J, Da Silva Filipe A, Tremeau-Bravard A, Wolking DJ, Amara E, Bangura A, Kanu MC, Kanu OT, Kargbo D, Lavalie EG, Lungay V, Robert W, Turay M, Fornie S, Samba TT, Sesay BB,**

- Swaray P, Vandi MA, Bah MA, Mansaray AA, Bird BH, Davison AJ** Genome Sequences of Five Arenaviruses from Pygmy Mice (*Mus minutoides*) in Sierra Leone. 2022. *Microbiol Resour Announc.* 11 (5): e0009522.
- Willan K, Meester J** Breeding biology and postnatal development of the African dwarf mouse. 1978. *Acta Theriologica.* 23 (3): 55-74.
- Wong S, Tan K, Carey KT, Fukushima A, Tiganis T, Cole TJ** Glucocorticoids stimulate hepatic and renal catecholamine inactivation by direct rapid induction of the dopamine sulfotransferase Sult1d1. 2010. *Endocrinology.* 151 (1): 185-94.
- Wu S, Wu Y, Zhang X, Capecchi MR** Efficient germ-line transmission obtained with transgene-free induced pluripotent stem cells. 2014. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 111 (29): 10678-83.
- Wu W, Cogan JD, Pfäffle RW, Dasen JS, Frisch H, O'connell SM, Flynn SE, Brown MR, Mullis PE, Parks JS, Phillips JA, 3rd, Rosenfeld MG** Mutations in PROP1 cause familial combined pituitary hormone deficiency. 1998. *Nat Genet.* 18 (2): 147-9.
- Yoshioka S, Fujii W, Ogawa T, Sugiura K, Naito K** Development of a mono-promoter-driven CRISPR/Cas9 system in mammalian cells. 2015. *Sci Rep.* 5: 18341.
- Yu FX, Zhao B, Guan KL** Hippo Pathway in Organ Size Control, Tissue Homeostasis, and Cancer. 2015. *Cell.* 163 (4): 811-28.
- Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin, Ii, Thomson JA** Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. 2007. *Science.* 318 (5858): 1917-20.
- Yuan H, Corbi N, Basilico C, Dailey L** Developmental-specific activity of the FGF-4 enhancer requires the synergistic action of Sox2 and Oct-3. 1995. *Genes Dev.* 9 (21): 2635-45.
- Zhang Z, Florez S, Gutierrez-Hartmann A, Martin JF, Amendt BA** MicroRNAs regulate pituitary development, and microRNA 26b specifically targets lymphoid enhancer factor 1 (Lef-1), which modulates pituitary transcription factor 1 (Pit-1) expression. 2010. *J Biol Chem.* 285 (45): 34718-28.

Zhou Y, Xu BC, Maheshwari HG, He L, Reed M, Lozykowski M, Okada S, Cataldo L, Coschigamo K, Wagner TE, Baumann G, Kopchick JJ A mammalian model for Laron syndrome produced by targeted disruption of the mouse growth hormone receptor/binding protein gene (the Laron mouse). 1997. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94 (24): 13215-20.

Zhu X, Gleiberman AS, Rosenfeld MG Molecular physiology of pituitary development: signaling and transcriptional networks. 2007. *Physiol Rev*. 87 (3): 933-63.

謝辞

本研究を行うにあたって、学部学生時代から多大なご指導ならびに本論文のご校閲を賜り、研究だけに留まらずあらゆる面で気にかけていただきました山口大学獣医発生学研究室の加納聖先生に深く感謝申し上げます。また、ご多忙の中、本研究に対して懇切なるご助言をいただきました山口大学獣医解剖学研究室の日下部健先生ならびに今井啓之先生に深く感謝致します。さらに、実験材料の提供および解析の一部を実施していただき、結果について甚深なディスカッションを行ってくださった東京大学実験動物学研究室の藤井渉先生に厚く御礼申し上げます。

本稿のご校閲ならびにご助言を賜った鹿児島大学生理学研究室内の白石光也先生、山口大学獣医薬理学研究室内の佐藤晃一先生ならびに山口大学獣医繁殖学研究室の高木光博先生に感謝致します。

本研究を行うにあたって、尊い命をいただいたアフリカチビネズミおよびマウスたちに心からの感謝の意とともにご冥福をお祈り致します。

また、研究室実験ゼミにおいて活発な議論をし、多様なご指摘を賜りました藤野郁さ

んをはじめ、支えてくださった獣医発生学研究室ならびに獣医解剖学研究室の皆様
に感謝致します。さらに、大学院進学のきっかけとなった池田俊太さんをはじめ、
大学院生活を味わい深く楽しいものにしてくださった友人の皆様
に御礼申し上げます。

最後に、学部生時代から今に至るまで、私の気ままな自由を許し
応援していただいた家族に心より感謝し謝辞とさせていただきます。