

Title	Tissue specific knock-out of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development
Author(s)	樽谷, 勝仁
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/40751
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	樽 谷 勝 仁
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 3 3 3 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 9 年 6 月 30 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学研究科 内科系専攻
学 位 論 文 名	Tissue specific knock-out of the mouse Pig-a gene reveals important roles for GPI-anchored proteins in skin development (マウス Pig-a 遺伝子の表皮特異的破壊は表皮形成における GPI-アンカー型蛋白の重要性を明らかにした)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 吉川 邦彦 (副査) 教 授 木下タロウ 教 授 竹田 潤二

論 文 内 容 の 要 旨

[目的]

多種類の GPI-アンカー型蛋白が哺乳動物細胞膜上に広く分布している。X 染色体上に存在する Pig-a 遺伝子の産物は GPI-アンカー生合成の初期段階で必須の働きをしている。Pig-a 遺伝子を破壊した GPI-アンカー型蛋白完全欠損個体は発生の初期で致死的事であることが判明している。一方ケラチノサイトでは GPI-アンカー型蛋白として Plasminogen activator urokinase type receptor, E48 antigen, CD16, 56, 58, 59, Heat stable antigen などが知られている。そこで私は組織特異的にジーンターゲットを行うことができる Cre-loxP システムを用いて表皮特異的に Pig-a を欠損させ、表皮細胞の分化増殖における GPI-アンカー型蛋白の役割を解析した。

[方法ならびに成績]

1. 表皮特異的 Pig-a ノックアウトマウスの作成

Cre-loxP システムでは Cre 蛋白が組織特異的に働くマウス、及びエクソンが Cre 蛋白により切断されるように破壊したいエクソンを loxP で挿入したコンストラクトをもったマウスが必要である。まずマウスの Pig-a 遺伝子第 6 エクソンを loxP で挿入するようなコンストラクトを作成し、ES 細胞で相同組み換えを起こし、相同組み換え体由来のマウスを作成した。次に Cre 蛋白を表皮特異的に発現させるために、ヒトの 14 kbp の Keratin 5 のプロモーターをヒト genomic DNA library よりスクリーニングし、その下流に Cre の cDNA 及び human growth hormone の polyA を組み込んだコンストラクトを作製し、それをマウスの卵に打ち込んだトランスジェニックマウスを作成した。この 2 種類のマウスを掛け合わせた。この掛け合わせたマウスにおいて Pig-a 遺伝子が破壊されているかどうかを組織別に PCR 法により確認したところ、ケラチノサイトではほぼ 100% Pig-a 遺伝子の破壊が起きていた。Keratin 5 が発現するといわれている食道、胃にも部分的に Pig-a 遺伝子の破壊が見られた。しかし、他の組織においては Pig-a 遺伝子破壊は全く認められなかった。フローサイトメトリーを用いて GPI-アンカー型蛋白の 1 つである Heat stable antigen の発現を調べたところ、その表皮特異的 Pig-a ノックアウトマウスではその発現が消失していた。

2. 表皮特異的 Pig-a ノックアウトマウスの解析

生後1日目の表皮特異的 Pig-a ノックアウトマウスの外観は、野生型マウスと比べ、皮膚が粗造で、全体的に乾燥していた。このマウスは生後2日位で死亡した。組織学的には基底層から顆粒層にかけてはこのマウスは野生型マウスと比べて変化がなかったが、角層部分の肥厚、basketweave パターンの消失が見られた。角層の電顕では intercellular space が狭く、野生型では見られないような lamellar granule が存在していた。

[総括]

Pig-a 遺伝子をノックアウトすると致死性であった。そこで Cre-loxP システムを用いて表皮における GPI-アンカー型蛋白の役割を検討した。Pig-a loxP マウスと K5-Cre トランスジェニックマウスを交配させたマウスの Pig-a 遺伝子の欠損は表皮特異的に起こり、この表皮特異的 Pig-a ノックアウトマウスでは GPI-アンカー型蛋白が欠損していた。このマウスでは表皮が乾燥し、電顕で角層中正常では認められない lamellar granule が存在した。lamellar granule は正常では角層直下の顆粒層でその内容物である脂質を放出し、表皮の水分保持に重要な役割を果たしていると考えられている。Pig-a ノックアウトマウスではこの水分保持能が低下したために生後間もなく死亡したと想像された。以上より Pig-a あるいは GPI-アンカー型蛋白は表皮の分化過程、特に角層の形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

論文審査の結果の要旨

多種類の GPI-アンカー型蛋白が哺乳動物細胞膜上に広く分布している。X 染色体上に存在する Pig-a 遺伝子の産物は GPI-アンカー生合成の初期段階で必須の働きをしている。GPI-アンカー型蛋白の生体内での役割を解析する目的で通常のジーンターゲティング法で Pig-a を破壊すると致死性だった。そこで組織特異的にジーンターゲティングを行うことができる Cre-loxP システムを用いて表皮特異的に Pig-a を欠損させ、表皮細胞の分化増殖における GPI-アンカー型蛋白の役割を解析しようとした。Cre 組み換え酵素は loxP DNA 配列を特異的に認識し、loxP 配列で挿入された遺伝子を欠失させ破壊する。Pig-a 遺伝子に loxP 部位を挿入したマウスと Keratin 5 のプロモーターを使い Cre 蛋白を表皮特異的に発現するトランスジェニックマウスを交配させることにより、表皮特異的に Pig-a が完全に欠損した雄マウスを作製した。表皮特異的 Pig-a ノックアウトマウスは出生直後より、皮膚が全体的に乾燥し、大部分が生後2日位で死亡した。組織学的には、角層の異常が認められた。これらのことより GPI-アンカー型蛋白は表皮形成において重要な役割をしていると考えられた。

本研究は、Cre-loxP システムという新しい手法を用いて表皮特異的に Pig-a を欠損させたマウスを作成し、かつ GPI-アンカー型蛋白が表皮形成に重要な役割を果たしていることを明らかにしたもので学位に値する。