

氏 名(本籍) 加 藤 成 樹

学位の種類 博 士 (農 学)

学位記番号 農 博 第 8 5 1 号

学位授与年月日 平 成 18 年 3 月 24 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当

研究科専攻 農学研究科応用生命科学専攻
(博士課程)

学位論文題目 遺伝子欠損マウス作製による LGR4 / Gpr48 の機能に関する研究

論文審査委員 (主 査) 教 授 西 森 克 彦
(副 査) 教 授 佐 藤 英 明
教 授 内 田 隆 史

論文内容要旨

第1章 序論

生体の細胞膜上において、7回膜貫通型の受容体として知られる **G-protein coupled receptor (GPCR)**のうち、我々の注目する **LGR-family (leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor)**では、**glycoprotein hormone** を **ligand** とする受容体である **FSHR (卵胞刺激ホルモン受容体)**, **LHR (黄体形成ホルモン受容体)**, **TSHR (甲状腺刺激ホルモン受容体)**の3つは **LGR1~3**に相当し、幅広い研究が展開している。

一方 **Stanford** 大学の **Hsueh AJ** らは、近年 **LGR4~8** を発見しこれを進化的・構造的相同性により **Type A, B, C** の3種に分類した。**Type A** は **FSHR, LHR, TSHR** であり、**Type C** には近年 **ligand** が **Relaxin-family** であると示唆された **LGR7 (ligand は INSL7/relaxin)**, **LGR8 (ligand は INSL3)**が属する。**LGR4~6** は **Type B** であり、このタイプの **LGR-family** は現時点で全て **orphan-receptor** である。

FSHR と **LHR** は卵成熟及び排卵という雌性生殖機構に必須であることが示されている。また **TSHR** については遺伝子破壊により **TSH** が過多となり、バセドウ病の病因となることが明らかとなっている。**LGR7KO** 雌マウスは乳頭の形態形成及び分娩異常を示し、精子形成障害や無精子症マウスの報告がされた。**LGR8** は **ligand** 発見以外に、決定的な機能については明らかにされていないが、臨床例において不妊や精巣癌の誘発との深い関連が示唆される睾丸停留患者で、**ligand** の **INSL3** の **mutation** が多数確認されている。このように **LGR-family** は生殖関連機能への関与を示す遺伝子が多い。

マウス **LGR4/Gpr48** 遺伝子は **FSHR, LHR** と高い配列相同性を保ち、また卵巣で強い発現を示した。生殖機能は **FSHR, LHR** 以外にも様々な遺伝子の制御を受けていると考えられており、これら2つの受容体遺伝子とその **ligand** による生体内シグナルの持つ機能を、卵巣で発現する **LGR4/Gpr48** 遺伝子が相補あるいは一部代替する役割を持つ可能性を考えた。一方、**LGR4/Gpr48** 遺伝子は腎臓でも高い発現を示した。

本研究は、**LGR4/Gpr48** 遺伝子に注目し、薬剤開発研究のターゲットとして未知 **ligand** の発見を目指すことをも視野に入れ、まずこの受容体機能の解明を行うこととした。そこで、生体での様々な恒常性の維持に果たすその機能を明らかにするため、**LGR4/Gpr48** 遺伝子欠損マウスを作製し、解析することを目的とした。

第2章 マウス **LGR4/Gpr48** 遺伝子の取得と遺伝子構造の完全決定

マウス **LGR4/Gpr48** 遺伝子は腎臓で特に強く発現し、次いで卵巣、肝臓、大腸で強く発現していることを明らかとした。また、**LGR4/Gpr48** は心臓、肺、小腸、精巣、子宮、

は全身で幅広く発現する遺伝子であり、雌雄生殖器官でのみの局所的発現を示す **LGR-family type A** の **FSHR** や **LHR** とは異なり、幅広い組織での発現分布を示す **type C** の **LGR7** や **LGR8** と近い結果となった。

次に、**PCR** 法にてマウス **LGR4/Gpr48 cDNA** 全長を取得し、**LGR4/Gpr48** 遺伝子が **951** アミノ酸により構成されることを明らかにした。さらにマウス **E14TG2a** ゲノムファージライブラリーから **LGR4/Gpr48** 遺伝子ゲノムをスクリーニングし、**exon/intron** 構造を明らかとした。また **primer extension** 法により **transcription start site** を明らかとして **LGR4/Gpr48** 遺伝子の **exon1** を同定した。この結果マウス **LGR4/Gpr48** 遺伝子は **18** 個の **exon** で構成され、全長は約 **95kb** の遺伝子であった (**Fig. 2**)。以下にマウス **LGR4/Gpr48** 遺伝子の **LGR-family** に共通の特徴を示した。

1. **intron1** が非常に大きい。
2. 最終 **exon** が **7** 回膜貫通部位を全てコードしている。
3. **ligand** 結合部位付近に **24** アミノ酸から構成される **leucine-rich-repeat** 配列を持つ。

ヒト **Gpr48** 及びラット **LGR4** とはそれぞれアミノ酸レベルで **92.8%**、**97.1%** の相同性を持ち、マウス **FSHR**、**LHR**、**THSR** とそれぞれ約 **25%**、ラット **LGR5**、**LGR6**、**LGR7** とは **49%**、**46%**、**33%** の相同性を保つ遺伝子であった。

第3章 **LGR4/Gpr48** 遺伝子欠損 **conditional KO** マウスの作製

取得したゲノム DNA を元に、**5' arm 7.5kb**、**3' arm 2.0kb** の全長 **18.8kb** の **KO** ベクターを作製し、**E14TG2a ES cell** に導入した (**Fig. 3**)。薬剤選択により、**400** クローンをピックアップし **4** つの正しく相同組み換えした **ES** クローンを受精卵 (**blastocyst**; 胚盤胞) にマイクロインジェクションし、**9** 匹のキメラマウスを得た。このうち **1** 匹が生殖細胞系列に **ES** 細胞が寄与していることが分かった。このキメラマウスと **C57BL/6J** マウス及び発生初期に全身で **flippase** を発現する **Act-flpe** トランスジェニックマウスとの交配を行い、**neomycine resistant gene** 配列を有する **allele** を持つマウス (**floxed neo**) と **FRT** 配列に囲まれた領域が組み換わった **allele** を持つマウス (**floxed**) の **2** ラインの **LGR4/Gpr48** 遺伝子 **conditional KO** マウスを得た (**Fig. 4**)。

第4章 卵巣における **LGR4/Gpr48** 遺伝子の機能解析

成熟齢 (生後 **8** 週以降) 野生型雌マウスより卵巣を摘出し、*in situ* ハイブリダイゼーションを行って発現部位を特定した (**Fig. 5**)。この結果 **LGR4/Gpr48** 遺伝子は、卵巣顆粒

膜細胞 (ovarian granulosa cell) で特異的に発現することを見出した。また、初期卵胞顆粒膜細胞での発現は微弱であるが、2次及び3次卵胞における顆粒膜細胞では強い発現が見られ、排卵を終えた黄体でも強い発現を維持し、卵発生から排卵までを通して重要なシグナル伝達を担う受容体遺伝子である可能性を示唆した。

性サイクルの各 phase における卵巣での LGR4/Gpr48 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション及び定量 RT-PCR にて調べたところ、E 期 (estrus; 発情期) に発現が上昇しており、何らかの雌性生殖への関わりを示唆していると考察した (Fig. 6)。

そこで、未成熟齢 (生後 3~4 週齢) 野生型雌マウスに対して gonadotropin (PMSG, hCG; 性腺刺激ホルモン) を投与し、強制的な排卵誘導に伴う LGR4/Gpr48 遺伝子の発現変化を検討した。処理後の各時間における卵巣での LGR4/Gpr48 遺伝子の発現を *in situ* ハイブリダイゼーション及び定量 RT-PCR にて調べたところ、排卵が最も活発な処理後 16 時間後に LGR4/Gpr48 遺伝子の著しい発現上昇を見出した。また、排卵後黄体形成に至るまで卵胞部位で高い発現を維持することから、排卵期及び卵胞顆粒膜細胞の黄体化の時期に関わる遺伝子であると考えられた (Fig. 7)。

次に、PMSG のみの誘導をかけて、処理後の各時間において同様に LGR4/Gpr48 遺伝子の発現変化を観察したが発現誘導は見られず、LGR4/Gpr48 遺伝子は hCG、つまり生体内の LH サージ (急激な大量分泌) に応答性を示す遺伝子であった。

生殖器官での LGR4/Gpr48 遺伝子の機能寄与を明らかにするため、全身で LGR4/Gpr48 遺伝子を欠損した null マウスを解析に用いる予定であったが、このマウスは新生児致死を示した。P21 (離乳時) において各 genotype のマウス数を調べたところ、約 600 サンプル中 1 例を除いて null マウスは存在せず、ほぼ全て (99.8%) が出生直後に死亡していることから、生存に必須遺伝子であることを明らかとした (Table 1)。今後、成獣マウスにおける解析を行うために、卵巣 conditional 解析として LGR4/Gpr48 遺伝子との発現部位の一致した別の cre マウスの導入を試みる必要がある。

第5章 腎機能と皮膚上皮角化細胞における LGR4/Gpr48 遺伝子の機能解析

LGR4/Gpr48 遺伝子 null マウスは 100% が EOB (Eye open at birth; 出生時眼瞼開裂) を示した (Fig. 8)。他の遺伝子 KO マウスに見られた同様の表現型解析では、皮膚上皮角化細胞 (ケラチノサイト) の異常が報告されており、LGR4/Gpr48 遺伝子 null マウスのケラチノサイトについても細胞増殖能・遊走能の影響を調べた。出生直後の仔マウスに対して *in vivo* での細胞増殖能試験を行ったところ、null マウスでは有意に細胞増殖能の低下を見出した。また、各 genotype のケラチノサイトにスクラッチアッセイ (コンフルエントな状態のケラチノサイトにチップ先で傷をつけ、傷の埋まり具合により遊走能を

測定する)を行い、**LGR4/Gpr48** 遺伝子 **null** の細胞の遊走能が低下していることを見出した (Fig. 9)。

そこで、**LGR4/Gpr48** 遺伝子のケラチノサイトでの機能を明らかにするため、条件特異的な遺伝子欠損誘導による **conditional** 解析を行った。**floxed** マウスのケラチノサイトに細胞透過型の **PTD (protein transduction domain)-cre** タンパクを導入し、後天的に **LGR4/Gpr48** 遺伝子欠損を誘導してそのケラチノサイトへの影響を観察した。これにより、ケラチノサイトを用いた **conditional** の実験系を確立した。

LGR4/Gpr48 遺伝子 **null** マウスは生存して出生した場合も体が小さく、動きも緩慢で、母胎内における発育遅滞が見られた。**LGR4/Gpr48** 遺伝子 **null** の **embryo** は、胎生 15.5 日付近より発育遅滞が見られ出生時まで遅滞の悪化が進行し、出生直後には 3 割近い体重の減少を示した。また、体重の減少率にほぼ同率の組織・臓器重の減少が見られたが、腎臓だけは著しい矮小化を示した (Table 2)。

矮小化の見られた出生直後の **LGR4/Gpr48** 遺伝子 **null** マウスの腎臓においては、腎実質が形成されていない個体もあり、形態形成に関わる可能性を示唆した。また、血漿クレアチニン濃度を測定したところ、**LGR4/Gpr48** 遺伝子 **null** マウスでは有意に高い数値を示した (Fig. 10)。**null** マウスの腎臓形成異常の程度とこの数値にはプラスの相関性が見られ、さらに糸球体数及び密度の低下を示した (Fig. 11)。これらの結果は **LGR4/Gpr48** 遺伝子が十分な大きさを持つ機能的にも正常な腎を形成し、その機能の恒常性に必須の遺伝子であることを示唆した。

約 600 匹の **null** マウス中、例外的に 1 匹のみ生き延びたマウスは、生後から乳離れの時期に至っても著しい発育遅滞が見られ、発育不良、動作緩慢であった。生後 6 週にこのマウスは死亡したが、腎臓には腫大した **cyst (嚢胞)** が多数見られ形態的には多嚢胞性腎障害であると考えられた (Fig. 12)。**LGR4/Gpr48** 遺伝子欠損は、何らかのメカニズムにより多嚢胞性腎障害と恐らくそれにより引き起こされる高濃度の血漿クレアチニンを誘発し、新生児致死を引き起こすと推定される。

総括

本研究では以下のことを明らかにした。

1. マウス **LGR4/Gpr48** 遺伝子を取得し、その構造解析を行った結果、**18** 個の **exon** から構成される約 **95kb** の遺伝子であり、腎臓、卵巣、肝臓、大腸で強く発現し、進化的・構造的保存性の高い遺伝子であった。
2. **2-loxP-2-FRT** システムを用いて、マウス **LGR4/Gpr48** 遺伝子の **7** 回膜貫通部位をターゲットングした **conditional KO** マウスを作製した。得られた **floxed neo** マウスはホモ-ヘテロ遺伝子変異体共に、野生型マウスとの差異は見られなかった。
3. 雌の生殖サイクルに伴い、**LGR4/Gpr48** 遺伝子の発現が変化し、また性ホルモン投与による誘導により、著しい発現上昇が見られることから雌性生殖機能への関与を予想した。
4. **LGR4/Gpr48** 遺伝子 **null** マウスは出生時に **EOB (Eye open at birth; 出生時眼瞼開裂)** を示し、ケラチノサイトの増殖能・遊走能に関わる遺伝子であることを明らかにした。また、**LGR4/Gpr48-floxed** マウス由来初代培養ケラチノサイトを用いた、*in vitro* での誘導的遺伝子欠損の実験系を確立した。
5. **LGR4/Gpr48** 遺伝子 **null** マウスは **IUGR (Intra-uterine growth retardation; 子宮内発育遅滞)** を示し、特に腎臓の著しい矮小化を呈した。また、殆どが出生後 **2** 日以内に死亡する新生児致死の表現型であることを見出した。これら **null** マウスはクレアチニン濃度の上昇、糸球体密度の低下を観察し、腎機能・形態形成異常を示した。
6. **1** 匹のみ例外的に生き延びた **LGR4/Gpr48** 遺伝子 **null** マウスは、著しい発育遅滞を示し腎臓は **cyst** を形成していた。遺伝的な多嚢胞性腎障害は、**PKD** 遺伝子との強い相関が示唆されており、**LGR4/Gpr48** 遺伝子シグナルに **PKD** シグナルが関わる可能性が高いと考えられた。

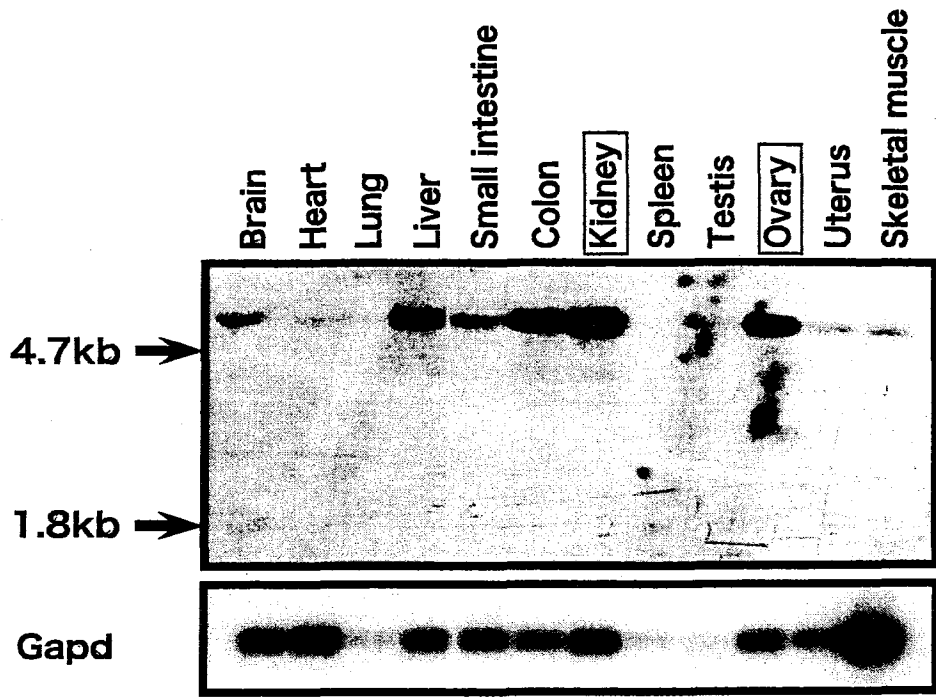


Fig. 1 Northern blot analysis of LGR4/Gpr48 gene. Adult mice tissues; lanes are Brain, Heart, Lung, Liver, Small intestine, Colon, Kidney, Spleen, Testis, Ovary, Uterus, Skeletal muscle. LGR4/Gpr48 gene strongly expressed in Kidney and Ovary.

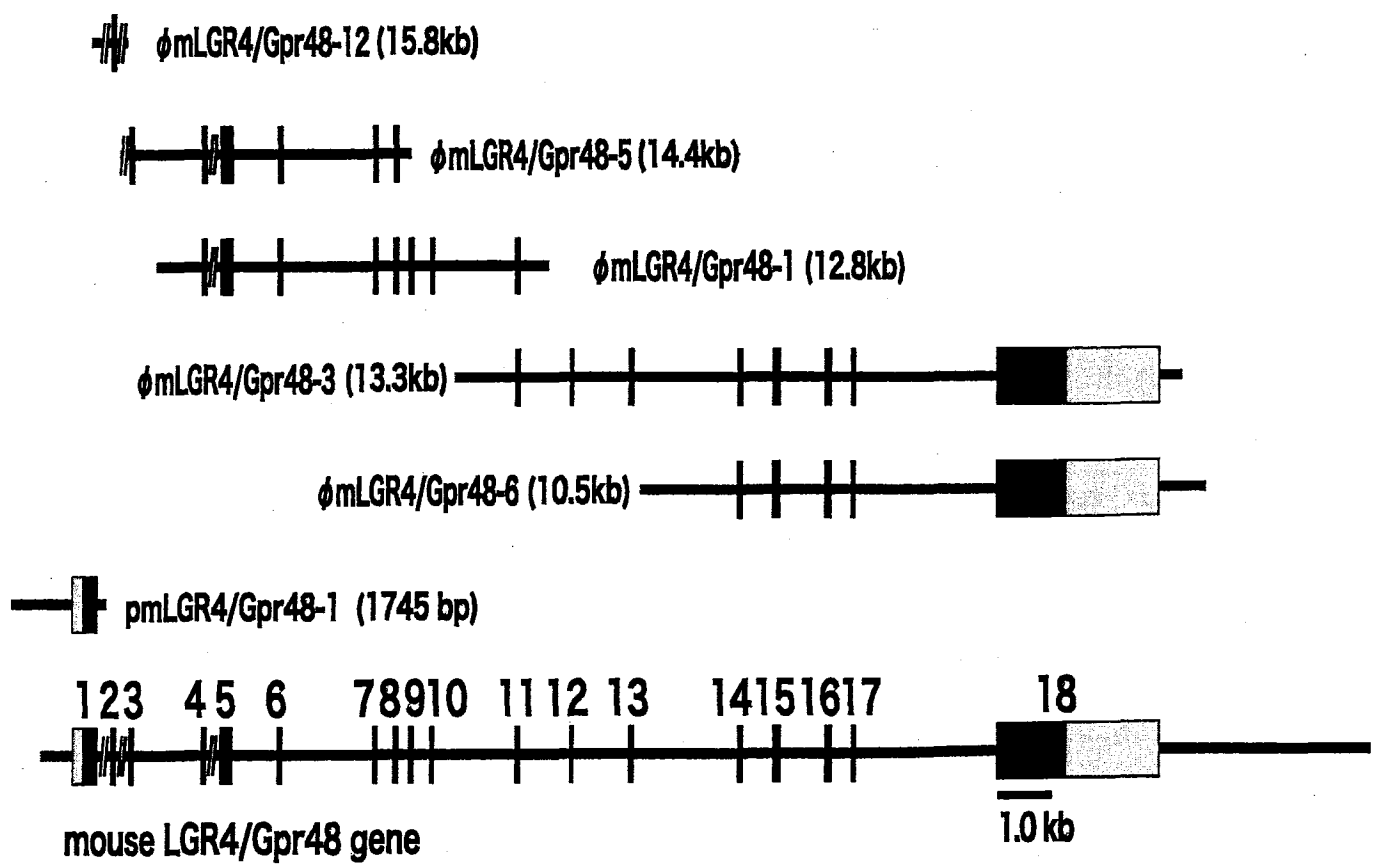


Fig.2 LGR4/Gpr48 gene structure. Mouse LGR4/Gpr48 gene consists of 18 exons spanning to about 95kb long.

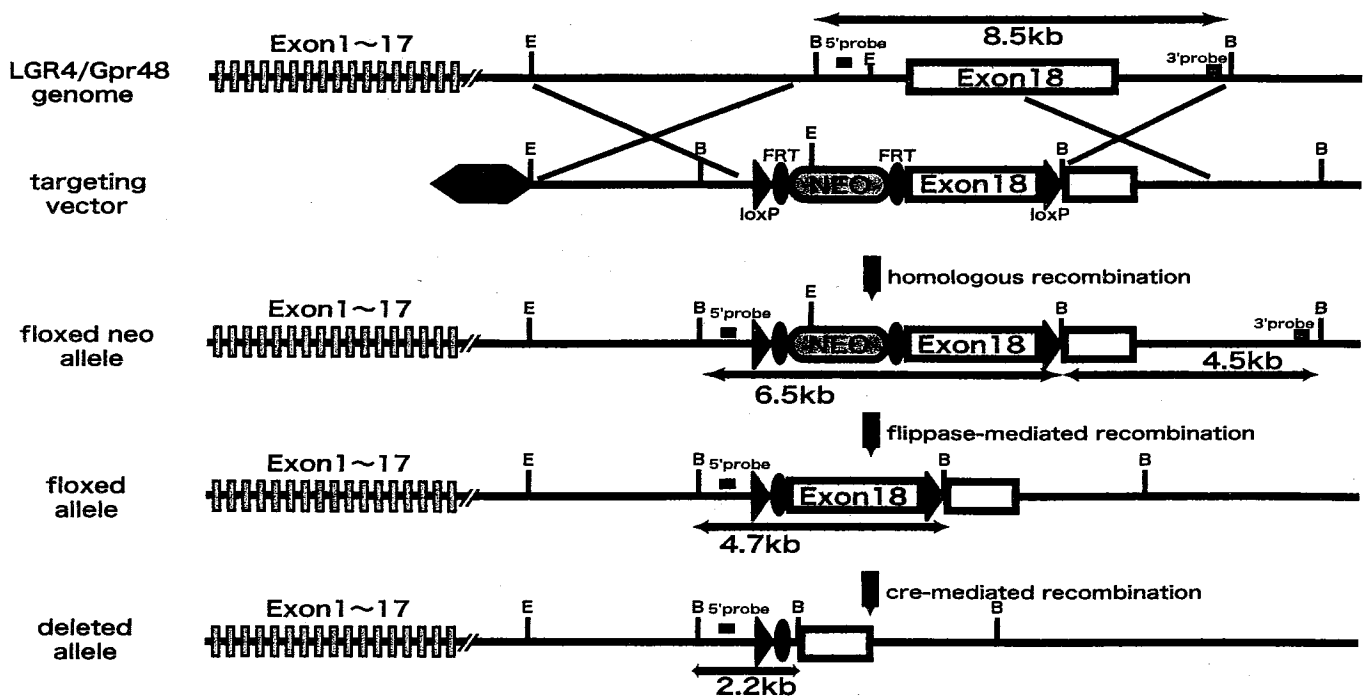
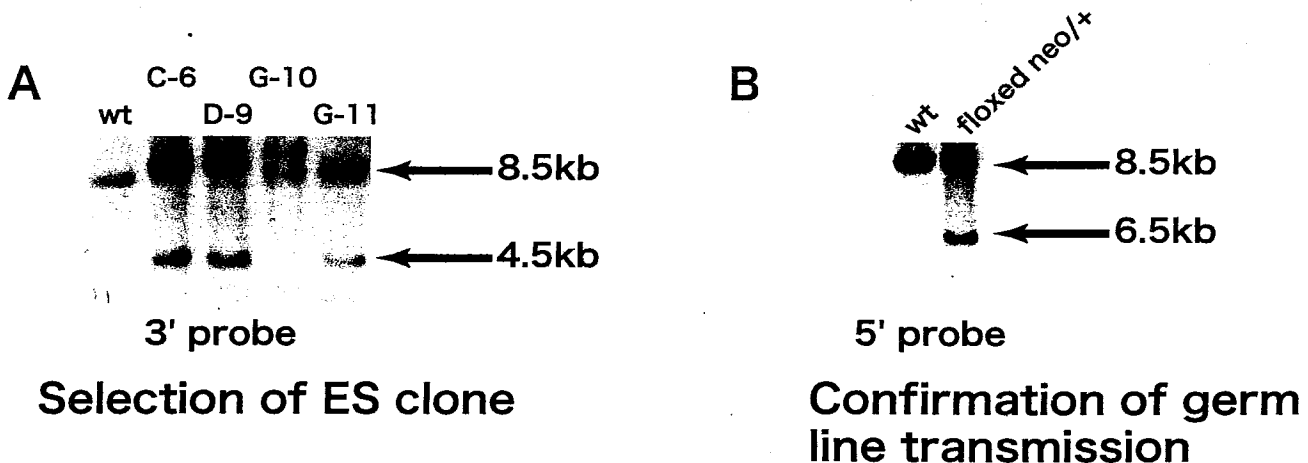


Fig.3 LGR4/Gpr48 targeting vector and expected gene structure after homologous recombination.

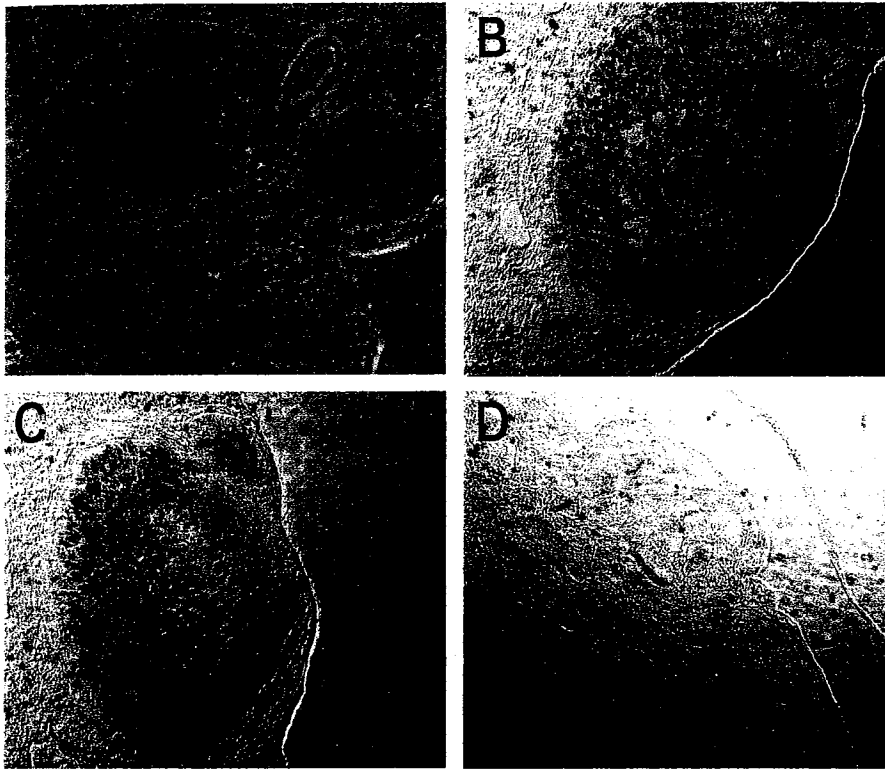
After initial homologous recombination, Exon 18 of one allele of LGR4/Gpr48 gene was substituted with floxed Exon 18 and NEO gene, and we called this type mice as "LGR4-floxed neo". Crossing of the "LGR4-floxed neo" mice with Act-flpe mice generated "LGR4-floxed" mice. Further crossing of the "LGR4-floxed" with CAG-cre mice generated LGR4 null mice.

Southern blot analysis



wt:wild-type
 C-6:correct recombination
 D-9:correct recombination
 G-10:incorrect recombination
 G-11:correct recombination

Fig.4 Southern blot analysis for ES clone selection and germ line transmission. After introduction of knockout vector into ES cell by electroporation, clones with correct recombination showing 8.5 kb and 4.5 kb long fragments (A). Chimeric mice with ES clone G-11 cell showed gene line transmission of the targeted allele (B).



A: secondary follicle
 B: tertiary follicle
 C: corpus luteum
 D: negative control

Fig.5 Stage dependent expression of LGR4/Gpr48 along with ovarian folliculogenesis.

Sections of follicles prepared from ovary in different stages were hybridized to detect localization of LGR4/Gpr48 gene expression.

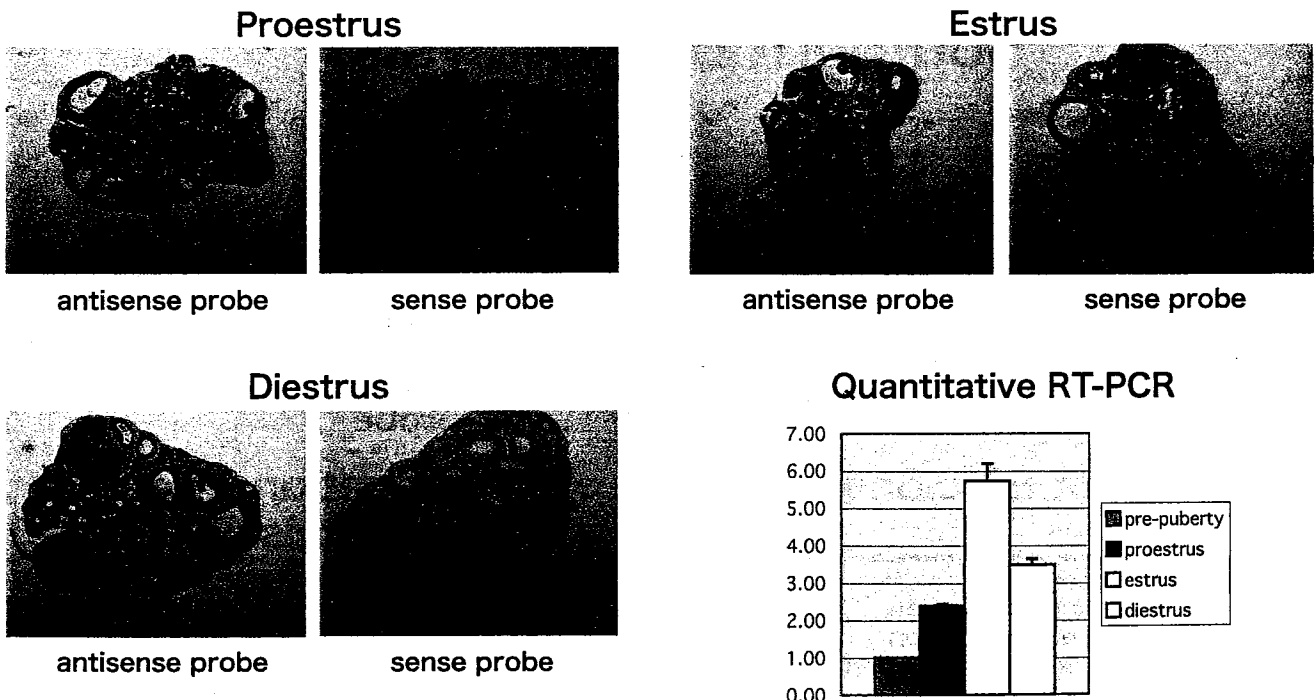


Fig.6 In situ hybridization and quantitative RT-PCR for LGR4/Gpr48 ovarian expression in each estrus cycle.

To characterize the expression profile of LGR4/Gpr48 gene along the ovulatory cycle, in situ hybridization was carried out. In parallel, quantitative RT-PCR was done for RNA from ovary.

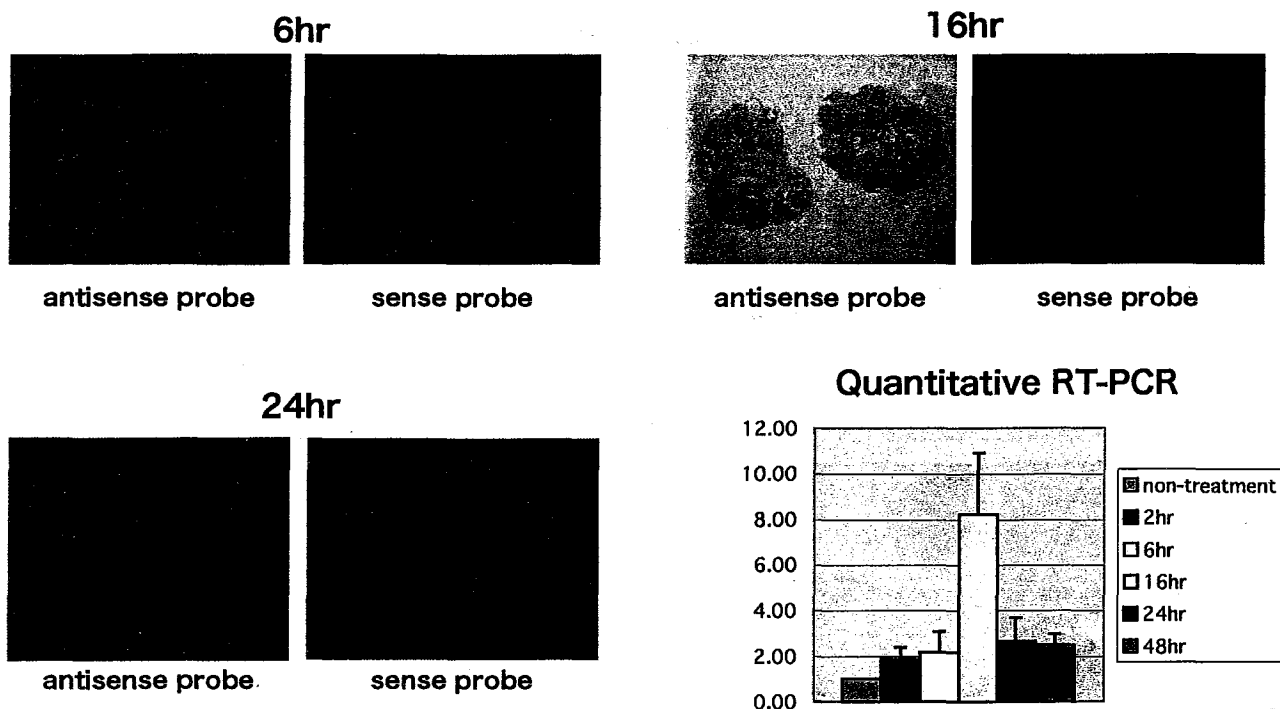


Fig.7 In situ hybridization and quantitative RT-PCR for LGR4/Gpr48 ovarian expression after treatment of superovulation.

To study the effect of superovulation on LGR4/Gpr48 gene expression, in situ hybridization was performed. Each sections were prepared from ovary at 6hr, 16hr and 24hr after administration of hCG.

Table1 Number of embryos at each embryonic day, and of newborn and weaned pups.

Number of embryos at each day

	E14.5	E15.5	E16.5	E17.5	E18.5
+/+	13	10	21	11	13
+/-	21	20	36	24	18
-/-	10	11	14	8	7

Number of pups at birth (P0)

+/+	420	+/- 742	-/- 216
♂	205	♂ 371	♂ 105
♀	215	♀ 371	♀ 111

Number of pups at weaning (P21)

+/+	245	+/- 421	-/- 1
♂	120	♂ 213	♂ 1
♀	125	♀ 208	♀ 0

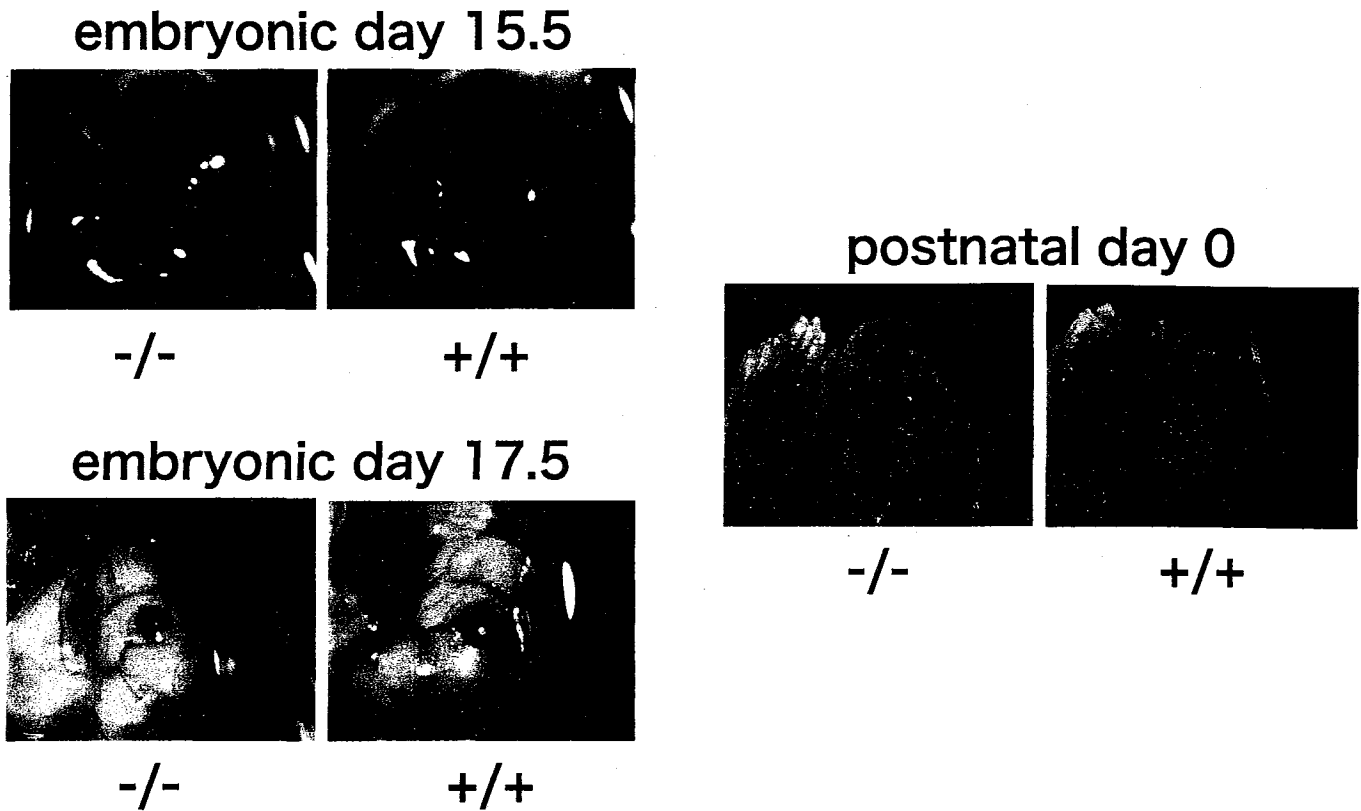


Fig.8 All null mice exhibited EOB (Eye open at birth) phenotype. Null embryos and newborn mice were prepared on embryonic day (E) 15.5 (when eyelid formation may onset), E 17.5 and postnatal day 0.

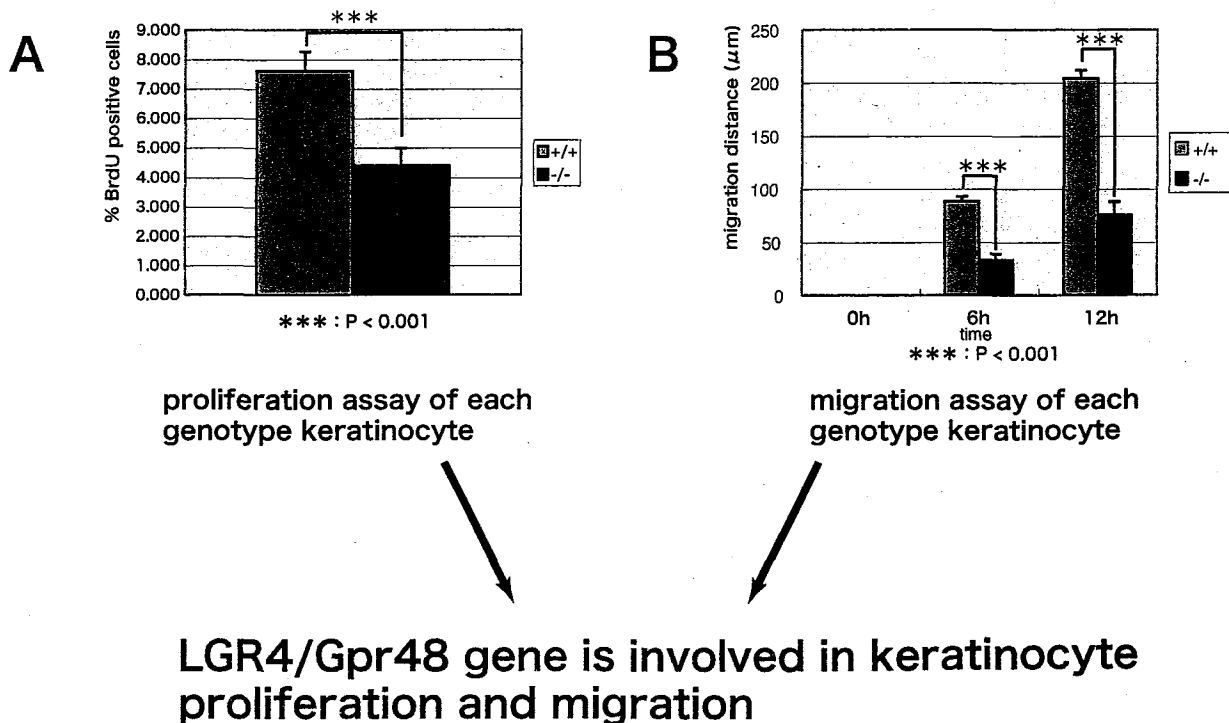


Fig.9 Proliferation and migration assay of null mice-derived keratinocyte. Cell proliferation was examined after administration of BrdU to newborn mice. Percentage of BrdU-positive in basal membrane cells (A) or migration ability in scratch assay were indicated (B).

Table2 Overview of absolute organ weights and organ weight/body ratios in control and null mice at birth.

Organ and units	genotype		
	+/+	+/-	-/-
Body weight (g)	1.55±0.02 (64)	1.54±0.01 (121)	1.08±0.02 (44)
Ratio (%)	100	100	100
Liver (mg)	54.64±0.94 (61)	54.87±0.75 (112)	35.54±0.96 (36)
Ratio (%)	3.53±0.02	3.56±0.02	3.29±0.03
Heart (mg)	11.13±0.19 (61)	11.09±0.14 (112)	8.23±0.25 (36)
Ratio (%)	0.72±0.02	0.72±0.01	0.76±0.04
Kidney (mg)	7.99±0.13 (61)	7.81±0.07 (112)	2.43±0.11 (36)
Ratio (%)	0.52±0.02	0.51±0.02	0.23±0.07
Lung (mg)	41.63±0.78 (61)	40.75±0.68 (112)	31.20±0.75 (36)
Ratio (%)	2.69±0.02	2.65±0.02	2.89±0.02

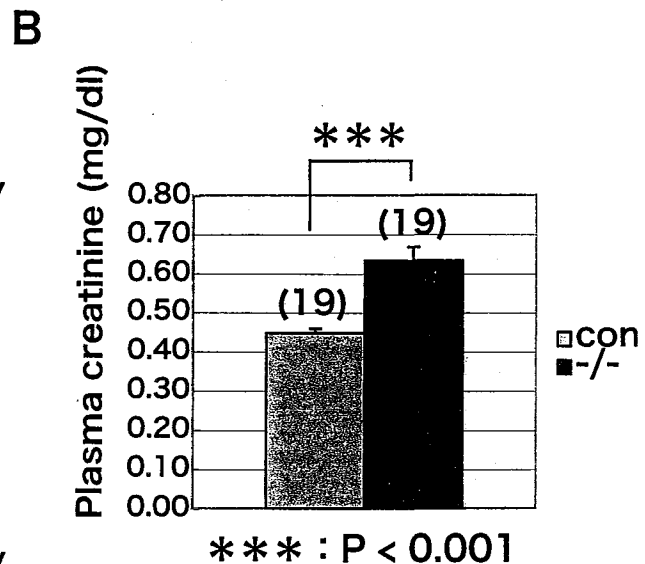
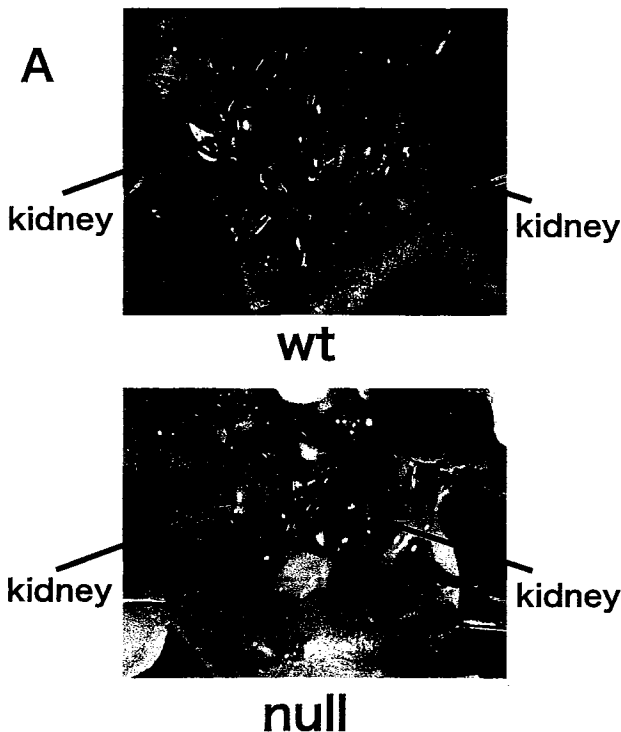


Fig.10 Effects of LGR4/Gpr48 deficiency on kidney at P0 mice. Microscopic observation of kidney from newborn null mice was shown (A). Few samples for null mice looked like blister with no substantially renal structure. B showed plasma creatinine concentration in newborn null mice as indicator of glomerular filtration ability.

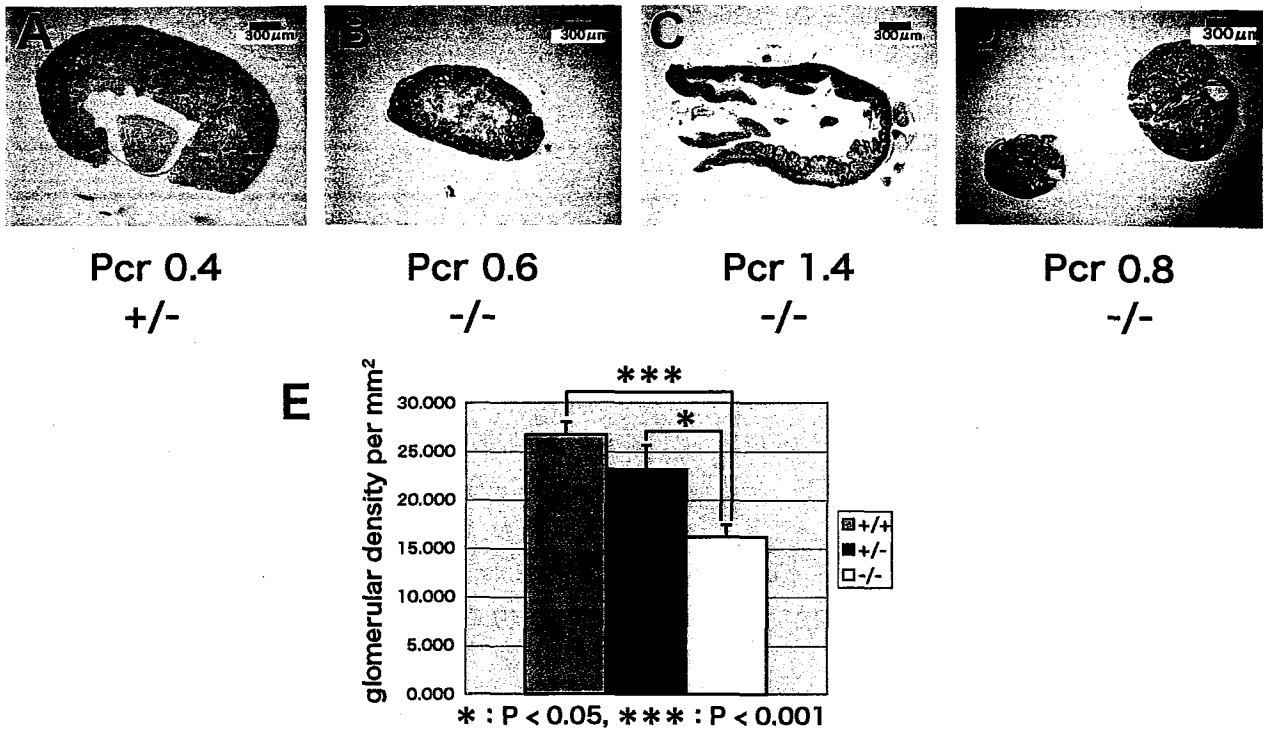


Fig.11 Impaired kidney of the LGR4/Gpr48 null mice. Some of newborn null mice showed severe dismorphology of kidney, whose degree is in accordance with plasma creatinine cocentration (A~D). D showed notable size difference between right and left kidneys. E showed glomerular density of null mice kidney.

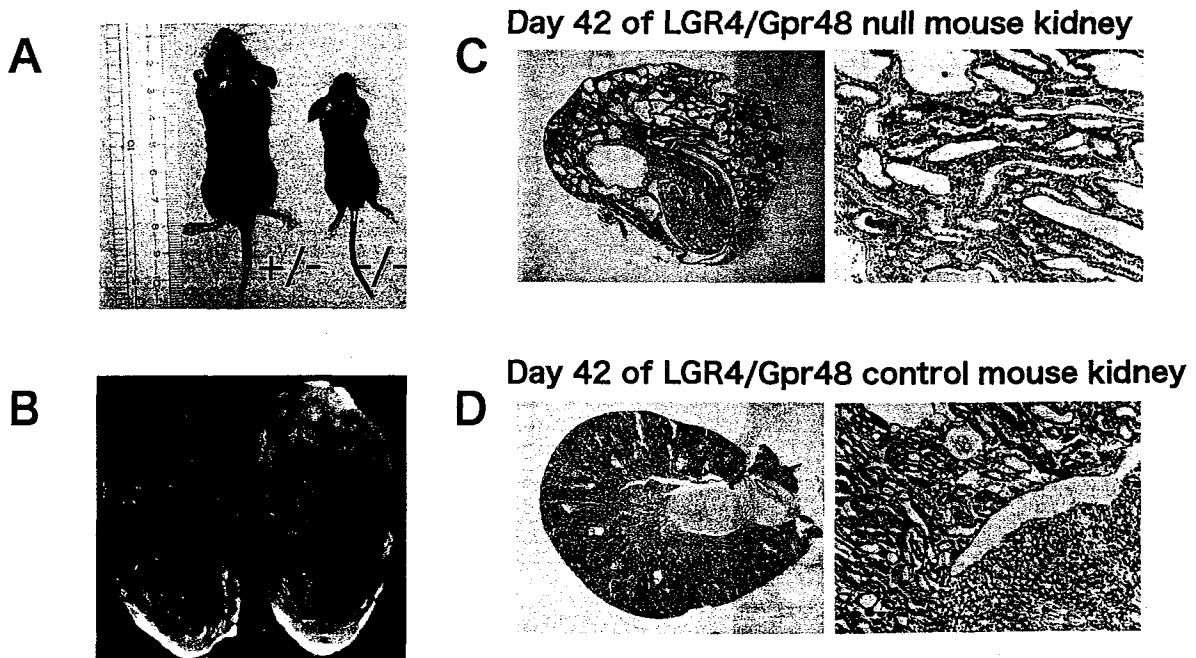


Fig.12 Only one LGR4/Gpr48 null mouse survived for 42 days and exhibited polycystic kidney. A showed photograph of exceptionally surviving null mice. It died on P 42, and B showed its kidneys prepared just after dying. C exhibited histology of kidney shown in B. D is normal kidney histology of heterozygous littermate as a control.

論文審査結果要旨

動物生体の細胞膜上に見いだされる7回膜貫通型受容体のGPCRのなかで、LGR (leucine-rich repeat containing G-protein coupled receptor) ファミリーに属するものとしてFSHR, LHR, TSHRなどグリコプロテインホルモン受容体はその解析も進んでいる。これらに近縁のLGRとして、スタンフォード大のHueh AJらによりLGR4⁸が発見された。博士論文提出者の加藤成樹はTypeB型に属し、マウス卵巣、腎臓や肝臓、大腸などで高い発現を見せるLGR4/Gpr48 (以下LGR4)を選び、LGR4の生体に於ける機能の解析を行い、その結果を博士論文として提出した。加藤はまず、LGR4遺伝子のマウス卵巣顆粒膜細胞での発現をin situ hybridizationにより確認した。LGR4遺伝子は2次と3次卵巣顆粒膜細胞で強い発現を見せ、排卵周期のE期(発情期)に発現が上昇する。またPMSGとHCG投与による過排卵処理後16時間後にLGR4の発現が著しく上昇し、これがhCG投与により、生体内ではLHサージに応答し発現上昇することを示した。続いて、加藤はLGR4遺伝子欠損マウスを作成し、その生体に於ける機能解析を試みた。まずratLGR4との相同性からPCRによりマウスLGR4のcDNA全長を取得し、マウスLGR4は全951アミノ酸から成ることを明らかにした。続いてマウス胚性幹細胞E14Tg2a由来のゲノムライブラリーより、LGR4全ゲノム約95kbを取得し、エクソンイントロン構造(18エクソン)を明らかにし、又プライマーエクステンション法により転写開始部位を明らかにした。得られたLGR4ゲノムを用い、5'arm 7.5kb, 3'arm 2.0kb, 全長18.8kbのターゲットベクターを作成、これをマウス胚性幹細胞E14Tg2aに導入、正しく相同組み替えしたクローン4株を得た。これをマウス胚盤胞に注入し、9匹のキメラマウスを得た。このうちES細胞が生殖細胞に寄与した1匹を得て、全身でflippaseを発現するAct-flpeTGマウスと掛け合わせネオマイシン耐性遺伝子を除去し、LGR4遺伝子の膜貫通ドメインがLoxP配列で挟まれた、いわゆるコンディショナルKO“floxed”マウス(LGR4^{+/fx})を作成した。また、これを全身でCreを発現するCAG-CreTGマウスと掛け合わせ、LGR4遺伝子の膜貫通ドメインが完全に失われたLGR4ヘテロ欠損マウス(LGR4^{+/-})を得た。LGR4ヘテロ欠損マウス同士の交配により得たLGR4^{-/-}(ヌル)マウスはその半数が胎生致死を示し、残りも生後1~2日間でその大半が死亡する(新生致死)表現型を示した。かろうじて出生したP1(生後1日以内)マウスは発育遅滞を示し出生時の体重が標準の7割しかなかった。その内臓の中で、特に腎臓が著しい矮小化(標準の3割)を示した。P1マウスの血漿クレアチニン値は有意に高く、腎機能低下を示した。腎臓の糸球体密度も減少し、LGR4が腎臓の形成または機能維持に必須であることを示した。一方、LGR4ヌルマウスは新生児EOB(Eye open at birth; 出生時眼瞼開裂)を示した。このEOBは他の遺伝子KOマウスでも皮膚上皮角化細胞(ケラチノサイト)の異常に伴う症状として報告されている。この為、LGR4ヌルP1マウスのケラチノサイトの細胞増殖能と遊走能を調べたところ、個体皮膚領域のケラチノサイトの増殖能低下と、初代培養ケラチノサイトでの遊走能低下が確認された。

以上、加藤成樹の博士論文は本農学研究科の基準に照らして十分に学位取得に値するものと判断され、その発表においても審査員一同、加藤成樹は博士(農学)の学位を取得するに十分な能力と資格を有するものとの評価を受けた。