

氏名（本籍）	渡部 桂		
学位の種類	博 士（ 理 学 ）		
学位記番号	博 甲 第 7315 号		
学位授与年月日	平成 27 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
審査研究科	生命環境科学研究科		
学位論文題目	Phenotypic and Genetic Analysis of a Novel Rat Model for Hereditary Cataract (遺伝性白内障の新規ラットモデルの遺伝学的小よび病理学的解明)		
主査	筑波大学教授	理学博士	林 純一
副査	筑波大学教授	博士（理学）	中田 和人
副査	筑波大学教授	博士（医学）	千葉 智樹
副査	筑波大学准教授（連携大学院）	博士（理学）	設楽 浩志

論 文 の 要 旨

KFRS (Kyoto Fancy Rat Stock) シリーズは愛玩用ラット由来の近交系であることから、汎用近交系ラットとは遺伝的背景が大きく異なり、加えて、多くの突然変異の蓄積が認められる有用なバイオリソースである。本論文では、白内障を発症する KFRS4 ラットに着目した。KFRS4 ラットは系統樹立の過程から水晶体混濁が確認できた。そこで KFRS4 ラットがヒト白内障の発症の分子メカニズムを解明するための新たな動物モデルとしての有用性を評価することを目的に水晶体の表現型解析を実施し、さらに発症責任遺伝子の同定を試みた。

KFRS4 ラットにおける白内障発症の病理学的特徴を調査した結果、KFRS4 ラットにおける水晶体混濁は生後 0 日齢から既に水晶体核領域から認められ、水晶体形成が成熟したラットにおいてはその混濁が全核領域に拡張していた。また、発生期からの経時的な病理学的観察を実施した結果、胎生期において水晶体繊維細胞の組織の崩壊の兆候が認められた。その変性は水晶体形成過程でより明確に観察され、生後 9 週齢の成熟した個体においては水晶体核領域では完全に繊維細胞は崩壊し、巨大な空胞も観察された。これらの結果から、KFRS4 ラットの白内障は水晶体繊維細胞の崩壊を伴う核白内障であることが明らかとなった。

次にこの KFRS4 ラットの白内障発症の責任遺伝子を同定するため、表現型と遺伝子型間での連鎖解析を行った。その結果、*kfrs4* 変異はラット第 7 番染色体にマップされ、戻し交配個体の表現型と既知の白内障原因遺伝子であるアクアポリン 0 (Aquaporin 0: AQP0) をコードする *Mip* 遺伝子内の多型マーカーと遺伝子型が完全に連鎖していた。そこで KFRS4 ラットにおける *Mip* 遺伝子の塩基配列を決定した結果、*Mip* 遺

伝子に終止コドンの出現が予測される 5 bp の挿入変異が検出された。次に AQP0 のタンパク質発現解析を行った結果、*kfrs4/kfrs4* ホモ個体において AQP0 が欠損し、また *kfrs4/+*ヘテロ個体においては AQP0 の発現減少が認められた。これらの結果から KFRS4 ラットの白内障発症は *kfrs4* 変異に起因した RNA 分解が生じ、AQP0 が欠損することに起因すると推察された。

一方、これまでヒトにおいても *kfrs4* 変異と極めて類似したナンセンス変異依存的 RNA 分解に起因する白内障患者が報告され、この患者の白内障発症は優性変異である。そこで、3 系統との交配から得られた *kfrs4/+*ヘテロ個体の白内障発症を観察した結果、*kfrs4/+*ヘテロ個体において水晶体混濁は一切認められなかった。これらの結果は KFRS4 ラットの白内障発症はヒトとは異なり、ハプロ不全の影響を受けないことを示唆するものと考えられた。

これらの結果から、ヒト・ラット間において白内障発症の遺伝様式に種差が存在することが示唆されたことから、CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集によって *kfrs4* 変異と類似した変異を導入した *Mip* 変異マウスを樹立した。それらの変異マウスの AQP0 はラット同様に欠損していたが、変異アレルホモ個体で重篤な、変異アレル/野生型アレルヘテロ個体で軽度な白内障発症が確認され、*Mip* 変異マウスはラットとは異なり、ハプロ不全による優性白内障を発症することが明らかとなった。これらの結果からヒト・マウス・ラット間の白内障発症の遺伝様式の種差の原因となる可能性が考えられた。

審 査 の 要 旨

本論文は愛玩用ラット由来の KFRS4 ラットを用いて順遺伝学的手法により白内障発症責任遺伝子 *kfrs4* の変異を同定し、白内障発症がハプロ不全の影響を受けず厳密に劣性遺伝することを遺伝学的に明らかにしたことから、基礎生物学領域の研究として高く評価できる。一方、*kfrs4* 変異と類似した *MIP* 変異をもつヒト家系では白内障が優性遺伝するという報告があるため、*kfrs4* 変異と類似した変異をマウスに導入したところ、このマウスもハプロ不全による優性白内障を発症した。以上のことから KFRS4 ラットの *kfrs4* 変異に依存した白内障発症が劣性遺伝するという現象はラット特異的である可能性を示唆している。よってこれらは種特異的な遺伝様式を解明するための先駆的な成果であり独創性に秀でていと高く評価できる。

平成 27 年 2 月 3 日、学位論文審査委員会において、審査委員全員出席のもとに論文の審査及び最終試験を行い、本論文について著者に説明を求め、関連事項について質疑応答を行った。その結果、審査委員全員によって合格と判定された。

よって、著者は博士（理学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとして認める。