

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006-2009

課題番号：18370094

研究課題名 (和文) 劣性致死変異体を用いた包括的な初期胚発生分子機序の解析

研究課題名 (英文) Studies on molecular mechanisms of mammalian early embryonic development by means of recessive lethal mutations.

研究代表者

松尾 勲 (MATSUO ISAO)

地方独立行政法人 大阪府立病院機構 大阪府立母子保健総合医療センター (研究所)

研究者番号：10264285

研究分野：発生遺伝学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：マウス、劣性致死変異体、ヘパラン硫酸鎖、発生、プロテオグリカン、FGF、遺伝学

1. 研究計画の概要

実験動物としてマウスを用いて、注目する発生現象 (未分化幹細胞の維持機構、細胞系譜や胚葉形成などの初期パターン形成機構、神経管形成や軟骨形成などの器官形成機構等) に異常を示す変異体を、表現型を指標に、選定する。同定した変異胚の表現型を形態レベル、細胞レベル及び分子レベルで、詳細に解析することで、異常の原因となっている領域や組織を明らかにする。次に、原因遺伝子の発現解析や相補実験などを行うことで変異原因である遺伝子を決定する。更に、原因遺伝子産物の生化学的な機能と表現型との関係を解明するため、遺伝学的手法や細胞生物学的な解析によって、どのような分子経路を介して、原因遺伝子産物が発生現象に関与しているのかを明らかにする。以上の解析を通じて哺乳動物発生を支配する新規な分子機構を包括的に解明する。

2. 研究の進捗状況

(1)トランスジーン挿入によって胚性致死変異を示す新規マウス劣性変異体を得た。トランスジーン挿入部位を同定するため、染色体 FISH 法やインバース PCR 法により、挿入箇所の塩基配列を決定したところ、トランスジーンは第 2 染色体上の *Ext2* 遺伝子のイントロンに挿入されていた。実際、ホモ変異胚においては、*Ext2* 遺伝子の発現が失われていた。更に *Ext2* 遺伝子産物は、ヘパラン硫酸鎖の重合に働くが、ホモ変異胚では、プロテオグリカンのヘパラン硫酸鎖を欠失していたから、null 変異であることが想定された。また、*Ext2* 遺伝子の cDNA のみを発現するトランスジェニックマウスを作成したところ、ホモ変異体でも *Ext2* cDNA を発現させると、正常に発生・成長することができた。以上の結果から、今回得られ

た、劣性致死変異の原因遺伝子は、*Ext2* 遺伝子であることが強く示唆された。

(2)*Ext2* ホモ変異胚の表現型を、組織切片レベルで解析したところ、変異体では、胚性 6 日目までには、異常がみとめられ、10 日目まで、致死となることが分かった。特に、FGF シグナルが働いている胚体外外胚葉形成維持、中胚葉移動、後方神経上皮誘導に異常が見られた。実際、ヘパラン硫酸鎖は、分泌性シグナル因子の適切なシグナル伝達機能に関与していると示唆されている。そこで、変異胚において、各種分泌性シグナル因子の下流標的遺伝子の発現を解析した結果、FGF の標的遺伝子の発現が失われていた。そこで、どのようなヘパラン硫酸鎖の機能が FGF シグナルの伝達に関与しているのか明らかにするため、FGF4 リガンド、FGF 受容体、コアタンパク質である syndecan-1、ヘパラン硫酸鎖の発現を胚体外外胚葉の形成過程で解析した。その結果、Syndecan-1 はユビキタスに発現するが、ヘパラン硫酸鎖が標的細胞表面に特異的に発現していた。つまり、ヘパラン硫酸鎖は、FGF4 リガンドの局所的な分布に必須であることが分かった。以上の解析から、哺乳動物の初期胚において、ヘパラン硫酸鎖が時間的・空間的に特異的に発現することによって、FGF シグナル活性をしていることが示唆される。

3. 現在までの達成度

①当初の計画以上に進展している。

(理由)

3 年目が終わった時点で、既に研究計画の概要で記載している研究計画の多くを遂行し、幾つかの課題を除いて、ほとんど結論を導くことに成功している。特に、劣性致死変異体の同定、原因遺伝子の特定、相補実験などは

遺伝学な解析のため、数年を要するが、大きな問題点に直面しなかったため計画以上に進展できたと考えられる。更に、単一細胞レベルでの高分解能解析を通じて、哺乳類初期胚発生過程において、ヘパラン硫酸鎖がFGFリガンドの分布に働くことを、見いだすことに成功した点は、予想外な重要な研究成果と言える。また、紙面の都合もあり、*Ext2*変異に特化して、研究の進捗状況をまとめているが、その他の劣性致死変異体についても順調に解析を進めている。

4. 今後の研究の推進方策

研究は、当初の計画以上に進展しているため、研究計画の変更は必要無く、大きな問題点も見あたらない。平成21年度は、最終年度となるため、今まで以上に、本研究課題による成果公表に力点をおきながら、残された研究課題を遂行する予定である。

5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計5件)

① Sayaka Sugiyama, Ariel A Di Nardo, Shinichi Aizawa, Isao Matsuo, Michel Volovitch, Alain Prochiantz and Takao K Hensch
Experience-dependent transfer of *Otx2* homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity.
Cell 134, 508-520 (2008) [査読有]

② Takeshi Sasaki, Hidenori Nishihara, Mika Hirakawa, Koji Fujimura, Mikiko Tanaka, Nobuhiro Kokubo, Chiharu Kimura-Yoshida, Isao Matsuo, Kenta Sumiyama, Naruya Saitou, Tomomi Shimogori and Norihiro Okada
Possible involvement of SINES in mammalian-specific brain formation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105, 4220-4225 (2008) [査読有]

③ Chieko Koike, Akihiro Nishida, Shinji Ueno, Hiromitsu Saito, Rikako Sanuki, Shigeru Sato, Akiko Furukawa, Shinichi Aizawa, Isao Matsuo, Noboru Suzuki, Mineo Kondo, and Takahisa Furukawa
Functional roles of *Otx2* transcription factor in postnatal mouse retinal development
Mol. Cell. Biol. 27, 8318-8329 (2007) [査読有]

④ Shigeru Sato, Tatsuya Inoue, Koji Terada, Isao Matsuo, Shinichi Aizawa, Yasuo Tano, Takashi Fujikado and Takahisa Furukawa.
Dkk3-Cre BAC transgenic mouse line: A tool for

highly-efficient deletion in retinal progenitor cells.

Genesis 45, 502-507 (2007) [査読有]

⑤ Chiharu Kimura-Yoshida, E Tian, Hiroshi Nakano, Saori Amazaki, Kayo Shimokawa, Janet Rossant, Shinichi Aizawa and Isao Matsuo

Crucial roles of *Foxa2* in mouse anterior-posterior axis polarization via regulation of anterior visceral endoderm-specific genes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104, 5919-5924 (2007) [査読有]

[学会発表] (計14件)

[その他]

ホームページによる研究内容・成果の公表

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/inst-mch/Byo/Byo.html>