

平成 22年 6月 1日現在

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

研究成果の概要（和文）：

マウストランスジーン挿入劣性致死変異体として、*Ext2* 変異を同定した。EXT2 は、ヘパラン硫酸鎖付加重合活性を持つため、ホモ変異胚は、ヘパラン硫酸鎖欠損を示し、FGF シグナル伝達が見られなかった。欠損胚において、FGF リガンド、受容体、コアタンパク質、ヘパラン硫酸の発現を解析した結果、細胞膜上のヘパラン硫酸鎖が、FGF リガンドの局所的な分布及びシグナル伝達に必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We identified the transgene insertion allele of mouse *Ext2*, one of the causative genes of human multiple hereditary exostoses, which catalyzes elongation of HS-chains. Marker expression analyses of *Ext2*-deficient embryos revealed that HS-chains are essential for response to Fibroblast growth factor (FGF) signaling and, in particular, local distribution of the FGF ligands as well as FGF signaling. Moreover, HS-chains expression attached with cell surface is distinctively specific to those areas in which FGF signaling is potentially active. Fur

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007年度	3,300,000	990,000	4,290,000
2008年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

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. 研究開始当初の背景

2000年頃から、海外を中心に、化学変異源であるENUを用いた表現型を基準としたマウス変異体同定の国家的プロジェクトが開始された。しかし、2005年時点で、初期胚発生に異常を示す

劣性致死変異体の場合は、特に、バランス無しに、遺伝学的なマッピングを行うのが極めて困難であることから、優性遺伝によるマウス病態疾患遺伝子座の同定にプロジェクトはシフトしていた。2005年以降も、ニューヨーク州立大学の

Anderson等を中心とした少数のグループのみが、劣性致死変異体スクリーニングと原因遺伝子同定のプロジェクトを成功させている。実際、ENUによって変異マウスを作製し、原因遺伝子を決定する手法に比べて、ジーントラップ又はノックアウトを全遺伝子に対して行う方が効率的であるという考えから、2005年以降からは、ヨーロッパとアメリカを中心とした、国際ノックアウトマウスコンソーシアムが結成され、5年以内に全ての翻訳可能遺伝子についてES細胞レベルでnull変異細胞が作成される予定であった。従って今後、各研究者がnull変異マウスを作製する必要性はほとんどなくなることが想定された。国内においては、2005年の時点で、5~10程度の研究室がENU、ジーントラップ、トランスポゾン等を用いて、突然変異体からの表現型及び原因遺伝子の同定を行っていた。しかし、本研究課題において申請者が注目している初期胚発生過程の胚葉形成や神経管形成等の表現型を指標に劣性致死変異体のスクリーニングを行ってはいなかった。以上の2005年頃の研究動向を考慮すると、申請者の研究課題は小規模で興味ある表現型を効率よく選択し、対象とするマウスの発生現象を解析するには適したシステムと考えられた。

また、現時点でも、ヒト新生児の5%以上が神経管の閉鎖不全や先天性心疾患を初め、何らかの先天性奇形を持って生まれている。実際、乳児の死亡原因の20%~30%が、先天異常である。このような先天性奇形や発育期の病態疾患は、遺伝及び環境要因が複雑に影響することで、特定の分子機構が異常になることで、生じると考えられている。しかし、どのような分子的な異常が原因で、先天異常が発症するのか、ほとんど明らかにされていない状況である。マウスの発生様式は極めてヒトと類似し、マウスはヒトの病態疾患のモデル動物として最も適していることから、本研究課題で得られた劣性致死変異体マウスにおいて見られる先天異常の病態発症メカニズムを分子レベル及び細胞レベルで、詳細に解析することによって、将来的には、ヒト先天異常の病態を正常状態へと回復させる新しい医療技術の開発につながることを期待された。

2. 研究の目的

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。

3. 研究の方法

(1) 胚性致死となるトランスジーン挿入変異の特定

常染色体上にトランスジーンが挿入されたトランスジェニックマウスラインを樹立し、オス及びメスのトランスジェニックラインを交配し、妊娠したメスを解剖し、胚発生段階を追って、メンデル率に沿って約4分の1で致死となる胚がいるか特定した。更に、数世代を経てもトランスジーンに依存して表現型が伝播するか確認する。同定したトランスジェニックラインは、9世代以上にわたってB6系統に戻し交配を行った。

(2) トランスジーンの挿入箇所の特異性

挿入されたトランスジーン配列の一部を用いて染色体FISH法を行うことで、常染色体上の1箇所にトランスジーンが挿入されているを特定した。更に、挿入されているトランスジーン配列の末端塩基配列に相同なPCRプライマーを設計し、インバースPCRを行い、塩基配列をマウスゲノム配列と比較することで、マウスゲノム上におけるトランスジーン挿入箇所を特定した。得られた情報から、内在性の遺伝子配列が、トランスジーン挿入によってどのように変化したか、サザン法などによって確認した。更に、ホモ変異胚の遺伝子型決定に必要なPCRプライマーを設計した。

(3) 表現型の解析

発生段階を追って外見上の表現型を解析し、記録撮影を行った。また、変異胚を固定後、パラフィン切片を作成し、適当な試薬で染色し、組織レベル、細胞レベルでの異常を形態学的に解析した。また、各種分子マーカーのRNAプローブを作成し、in situハイブリダイゼーション法を行うこと、また特異的な抗体を用いて免疫染色法を行うことで、異常の箇所や性質を特定した。

(5) 相補性試験

原因遺伝子特定のため、候補遺伝子のcDNAをCAGプロモーター下で過剰に発現するトランスジェニックマウスを作製した。得られたトランスジェニックマウスと変異マウスを交配し、得られたオスのトランスジェニックマウスと変異マウスと変異マウスの雌を交配させることで、ホモ変異胚でcDNAを発現する胚を得た。得られたホモ胚において、異常な表現型が回復できているか解析した。また、原因遺伝子のノックアウトマウスやジーントラップ変異マウスを導入・作製し、ヘテロ変異マウスと交配し、表現型を解析した。特に、得られたダブルヘテロ変異胚がホモ変異胚の表現型と一致するか検証した。

4. 研究成果

(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

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ため、null 変異であることが想定された。次に、*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製したところ、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 日目までに、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 シグナル活性を制御していることが示唆される。

(3) *Ext2* 遺伝子は、小児成長期のみで発症するヒト多発性遺伝性外骨腫の原因遺伝子である。そこで、今回得られた *Ext2* ヘテロ変異マウスで外骨腫の発症が認められるか検討した。軟 X 線撮影解析及び組織学的解析の結果、2 ヶ月齢以上のマウスにおいて、ヒト外骨腫と類似した腫瘍が、肋骨をはじめとする長管骨で高頻度に認められた。また、加齢に従って軟骨腫瘍の発症頻度及び発症箇所とも増加していた。次に、軟骨腫瘍がいつどのように形成・成長しているか明らかにするため、今回、0 週齢から 4 週齢のヘテロ変異マウスの長管骨(主に肋骨)を用いて組織切片を作成し、腫瘍の成長過程を解析した。その結果、1 週齢以降、外骨腫へ成長すると考えられる異常な軟骨細胞凝集である小節が、ヘテロ変異マウスで高頻度に観察された。さらに、これらの小節は、週齢を経るごとに出現数及び含まれる細胞数が

共に増加する傾向があることが分かった。また、小節の出現領域は、軟骨の成長帯周辺より perichondrium 周辺により限局する傾向がみられた。*Ext2* ヘテロ変異マウス個体において観察された、異常な軟骨細胞の凝集が、どのように外骨腫へと成長するのかは、現時点では不明である。特に、観察された小節の出現頻度に比べて、外骨腫の出現頻度は一桁以上低いことが分かった。従って、軟骨性の小節がどのように外骨腫にまで成長するかについては、今後詳細な検討を行う必要性が示唆された。また、現在までに、外骨腫の由来は、成長帯からなのか、perichondrium からなのか不明であるが、異常な細胞凝集が、軟骨の成長帯周辺より perichondrium 周辺により限局して出現する傾向がみられたことから、perichondrium 由来であることが示唆された。今回、ホモ変異胚において FGF シグナル伝達不全が見られたことから、FGF シグナルが外骨腫の発症に関与しているか、細胞内伝達因子である *FRS2a* との二重変異体を作成し、表現型の解析を行った。結果、*FRS2a* と *Ext2* の二重ヘテロ変異体において、外骨腫の発症頻度、軟骨性の小節の発生頻度などに、顕著な差は認められなかった。以上の結果は、*FRS2a* 遺伝子を 1 コピー減らしても、外骨腫の発症頻度や腫瘍細胞の出現頻度は影響を受けないことを示唆する。

(4)別の劣性致死トランスジーン挿入変異体としてマウス *Brd2* 変異体を同定し、表現型の解析及び原因遺伝子の同定を行った。本ホモ変異胚では、外見上、矮小及び頭部の形成不全(神経管閉鎖不全などを含む)を示し、胚性 13 日目までに致死となった。各種分子マーカーを用いて詳細な表現型解析をすすめた結果、神経管の Apico-basal な極性や前後軸に沿った極性は、ほぼ正常に発生が進行していることが分かった。その一方、9.5 日目以降、ホモ変異胚では、細胞分裂が進行せず、細胞死を示すことを明らかにした。原因遺伝子を特定するため、染色体 FISH 及びインバース PCR 解析を行ったところ、トランスジーン挿入によって、第 17 番染色体上ゲノム領域が約 30kb に渡り欠失していた。欠失ゲノム領域内には、*Brd2* 遺伝子が存在し、その発現はホモ変異胚では完全に、消失していた。そこで、発生異常の原因が *Brd2* 遺伝子産物によることを、相補実験により検証した。*Brd2* 欠損マウス及び *Brd2* 過剰発現マウスを作製し、その表現型を解析した。*Brd2* 欠損変異体としては、英国サンガーセンターの *Brd2* ジーントラップ変異体を用い、過剰発現マウスについては、CAG プロモーター下に *Brd2* cDNA を連結したトランスジェニックマウスを作製した。*Brd2* 変異胚では、ジーントラップホモ変異体でも、当部門で得られた *Brd2* トランスジーン挿入変異との多重ヘテロ変異体でも、頭部形成不全、矮小等の異常を示し、胚性致死となった。一方、

Brd2 過剰発現マウスは正常に発生し、*Brd2* トランスジーン挿入変異体で見られる発生異常をレスキューさせることができた。以上の知見から、本劣性致死変異の原因は、*Brd2* 遺伝子産物欠損によることを証明した。

5. 主な発表論文等

(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 7 件)

Ryuji Hiramatsu, Kyoko Harikae, Naoki Tsunekawa, Masamichi Kurohmaru, Isao Matsuo and Yoshiakira Kanai

FGF signaling directs a center-to-pole expansion of tubulogenesis in mouse testis differentiation

Development 137, 303-312 (2010) [査読有]

Shinichi Miyagawa, Anne Moon, Ryuma Haraguchi, Chie Inoue, Masayo Harada, Chiaki Nakahara, Kentaro Suzuki, Daisuke Matsumaru, Takehito Kaneko, Isao Matsuo, Lei Yang, Makoto M. Taketo, Taisen Iguchi, Sylvia M. Evans, and Gen Yamada

Dosage-dependent hedgehog signals integrated with Wnt/ -catenin signaling regulate external genitalia formation as an appendicular program

Development 136, 3969-3978 (2009) [査読有]

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]

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]

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]

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]

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 20 件)

Isao Matsuo Identification and characterization of a transgene insertion mutation of *Ext2* gene encoding a glycosyltransferase, Mouse Molecular Genetics Meeting, September 1-5, 2007, Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, UK

Isao Matsuo Heparan sulfate chains synthesized by *Ext2* regulate *Fgf* signaling during mammalian embryogenesis

Mouse Genetics & Genomics: Development and Disease 2008.10.29-11.2 Cold Spring Harbor Laboratory, USA

Isao Matsuo Spatio-temporal expression of heparan sulfate glycosaminoglycan chains modulates distribution of *Fgf* signaling during mammalian embryogenesis.

16th International Society of Developmental Biologists Congress
UK, Edinburgh, 2009.9.6-10

Isao Matsuo Specific expression of heparan sulfate glycosaminoglycan chains is crucial for local distribution of FGF signaling in mouse extraembryonic ectoderm of the.

第 32 回日本分子生物学会年会
2009.12.9-12 横浜

(図書) (計 1 件)

吉田 千春、平松 竜司、松尾 勲
Wnt シグナルとマウス前後軸決定 ~ Wnt 拮抗因子 *Dickkopf1* 遺伝子に着目して ~
医学のあゆみ 233 巻 10 号 印刷中 (2010)

(その他)

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 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