



Title	The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the anterior-posterior axis within the mouse embryo
Author(s)	坂井, 靖夫
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/43211
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 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	坂井靖夫
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第 16472 号
学位授与年月日	平成13年7月4日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	The retinoic acid-inactivating enzyme CYP26 is essential for establishing an uneven distribution of retinoic acid along the antero-posterior axis within the mouse embryo (レチノイン酸不活化酵素である CYP26は、マウス胚の前後軸に沿ったレチノイン酸の不均一な分布を樹立するのに必須である)
論文審査委員	(主査) 教授 浜田 博司 (副査) 教授 細川 互 教授 宮崎 純一

論文内容の要旨

【目的】

レチノイン酸 (RA) は、多様な生理活性をもつビタミンA誘導体であり、細胞分化や形態形成にも重要な役割を果たしている。胚発生における RA は、時期および組織特異的な濃度分布をしているが、その調節機構は明らかでなかった。最近、主たる調節に関わる合成酵素として retinaldehyde dehydrogenase type2 (Raldh2) が報告された。一方、RA の分解酵素である CYP26 (P450RA) は、Raldh2とは相補的かつ RA を低く保つべき部位に一致した発現がみられ、RA の主要な調節酵素であることが示唆された。今回、CYP26に注目し、胚発生における役割を解析した。

【方法ならびに成績】

ES細胞を用いた gene targeting 法により CYP26遺伝子欠損マウスを作製し、その解析を行なった。胚における RA 濃度の変化は、RA 応答性配列-lacZ 遺伝子導入マウスを用いた。表現型の解析は、肉眼解剖、組織切片作成、X-gal 染色法、whole-mount *in situ* hybridization 法、骨格染色、whole-mount immuno-histochemistry 法を用いて行った。CYP26遺伝子欠損マウスは、約3分の2が胚性致死で、産仔にも重篤な致死性異常がみられた。発生段階において、以下に示すような部位での、前後軸に沿ったパターンニングの異常が認められた。

- 1) **尾部の異常:** 両下肢の癒合または欠損、尾の欠損、二分脊椎、鎖肛、馬蹄腎等が認められた。尾部では、胎性8.25日以降に CYP26が発現して積極的に RA 濃度を下げている。CYP26遺伝子欠損マウスでは、尾部での持続した RA 濃度の高値が認められた。その結果、高い RA 濃度に応答する T (Brachyury)、Wnt3aの尾部での発現が抑制され、中胚葉分化異常をきたしたと考えられた。また、中胚葉分化異常は、初期神経細胞マーカーである Sox2の発現で、異所性および過剰な神経管形成を観察することにより、確認された。
- 2) **体幹の異常:** 脊椎骨全域にわたり異常がみられた。腰椎以下の椎骨では、完全または部分欠損がみられ、胸椎では、肋骨の変形・癒合が認められた。頸椎では後方化、腰椎では前方化に相当する椎骨置換が観察された。これらは過去に報告された RA 過剰投与による催奇実験の結果と一致していた。実際に、体幹部での RA の上昇が観察され、体節での Hoxb4 の発現も後方化を呈した。体幹部では、Raldh2 の発現が主であるが、胎性10.5日以降に体節に CYP26が発現している。CYP26遺伝子欠損マウスでは、この発現が消失したことにより、体幹部での RA 濃度の上昇および局所的な濃度の変化が生じたと考えられた。

3) **後脳の異常:** 胎性10.5日の後脳におけるロンボメア (r) 2と3の領域に狭小化が観察された。また、脳神経の走行をみると、r2-4の領域に三叉神経根と顔面/聴神経根の癒合がみられた。胎性8.25日の後脳領域では、RA濃度が頭側で上昇していた。また、Hoxb1の発現は、本来のプロロンボメア (pr)4からpr2-4の領域に前方に変化し、Krox20のpr3での発現も部分的に抑制されていた。CYP26は、胎性7.5-8.0日では前部に、胎性8.25-9.0日ではpr2で発現している。一方Raldh2は、胎性7.75-8.0日で後部に、胎性8.25日以降では体幹部に発現しており、pr3以下の後脳領域には両者とも発現がみられない。このことから、RA濃度の高い体幹部と低いpr2があり、両者に挟まれた領域では濃度勾配が存在すると思われた。CYP26遺伝子欠損マウスでは、pr2でRA濃度が低くならないため、RA濃度勾配が高い状態に変化したものと考えられた。

【総括】

CYP26欠損マウスは、本来CYP26が発現してRA濃度を低く保つべき部位でRA濃度の上昇をきたしたと考えられた。そのため、RA濃度により制御されている様々な遺伝子の発現に変化をもたらし、正常な前後軸に沿ったパターンニングが成されなかった。本研究により、CYP26はRaldh2とともに、マウスの初期発生におけるRA濃度の分布を厳密に調節するための必須な酵素であることが判明した。

論文審査の結果の要旨

従来より、胚発生の様々な局面で、レチノイン酸 (RA) が大きく関与していることが指摘されてきたが、その濃度分布調節の鍵を握る酵素に関しては、全く不明であった。

本研究により、CYP26は胚発生においてRA濃度を低く保つための必須の酵素であることが判明した。また初期発生における前後軸に沿った不均一なRA濃度分布は、合成酵素であるRaldh2と分解酵素であるCYP26の相補的な発現により、厳密に調節されていることが判った。このことは、胚発生とRAに関する数多くの研究の中でも、1つの重要な分解酵素の機能を個体レベルで示した最初の報告であり、今後の発生およびRA研究にも大きく貢献するものである。よって、本研究は学位に値すると思う。