

Title	Identification of a Novel Left-Right Asymmetrically Expressed Gene in the Mouse Belonging to The BPI/PLUNC Superfamily
Author(s)	侯, 娟
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/45261">https://hdl.handle.net/11094/45261</a>
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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	侯 娟
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 18185 号
学位授与年月日	平成 15 年 10 月 28 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 医学系研究科生体制御医学専攻
学位論文名	Identification of a Novel Left-Right Asymmetrically Expressed Gene in the Mouse Belonging to The BPI/PLUNC Superfamily (BPI/PLUNC スーパーファミリーに属する左右非対称に発現する新規遺伝子の同定)
論文審査委員	(主査) 教授 濱田 博司  (副査) 教授 近藤 寿人 教授 平野 俊夫

### 論文内容の要旨

#### [目的]

脊椎動物の左右軸形成の分子機構は、近年左右非対称に発現する遺伝子の同定や、左右形成の異常を来たす変異体の解析などにより明らかになりつつある。マウス胚の左右非対称性の形成過程を概略すると、四つの Step に要約できる。最初の Step は Organizer 活性を持つ node で左右の対称性が破れる、いわゆる初期決定である。Step 2 はこの最初の左右の情報が、node から将来の内臓間質となる側板中胚葉の左側に伝達される過程である。Step 3 では左側板中胚葉全域で左側決定因子である TGF  $\beta$  superfamily に属する Nodal の発現が確立され、node から伝えられた左右の情報が体全体の情報として伝搬される。そして Step 4 では、これら左右非対称な情報をもとに、それぞれの器官原基で左右非対称な形態形成が進んでゆく。

現在までに、その各々の Step で鍵となる因子が同定されているが、その因子間の知見はまだ断片的である。そこで、この左右軸決定に関与する遺伝子カスケードの全容を明らかにするため、われわれは左右非対称な新規遺伝子を cDNA microarray 技術を用いて系統的に単離、選別する Screening を行い、この過程で *LPlunc 1* が単離された。本研究は *LPlunc 1* の蛋白属性と正常胚における詳細な発現パターン、及び本遺伝子を左右形成の遺伝子カスケード上に位置付けるためにいくつかの左右形成異常を示す変異マウスにおける発現変化を解析した。

#### [方法ならびに成績]

まず、*LPlunc 1* 蛋白構造について解析した。cDNA の塩基配列に基づき Database を検索した結果と予想されるアミノ酸配列から、*LPlunc 1* は BPI/PLUNC superfamily に属する因子であることが判明した。BPI/PLUNC superfamily は大きく分けて、LT/LBP (Lipid Transfer/Lipopolysacchride Binding Protein) Family と PLUNC (palate, lung, nasal epithelium clone) Family の二つのファミリーで構成され、それぞれは lipid binding domain を持つ CETP、PLTP、LBP、BPI 4 つのタンパク質と *LPlunc 1*~4、*Splunc 1*~3 の 7 つのタンパク質からなる。CETP、PLTP、LBP、BPI は cholesterol ester、phospholipid、lipopolysacchraide と結合でき、血液中で脂質を運搬し、lipoprotein の balance の調節や細菌に対する宿主防御機能を持つと考えられている。一方、PLUNC family の機能

は不明だが、その発現部位と lipid binding domain を持つことから、細菌に対する宿主防御機能を持つ可能性が想定されている。

LPlunc 1 は BPI/PLUNC Superfamily に保存される二つの lipid binding domain を有する。また他のメンバーと同じく、その Lipid binding domain 構造をとるために重要な二つのシステイン残基も保存されている。同ファミリーの他の分子同様分泌蛋白かどうか確認するため、以下の実験を行った。LPlunc 1 の C 末端に myc tag をつけた発現ベクターを構築し、COS7 細胞に Transfection し、Western Blotting にて anti-myc 抗体で培養上清中に予測された分子量 54~60 kDa の分泌蛋白を検出した。従って、LPlunc 1 は他のファミリー分子と同様な分泌蛋白であることが判明した。

次に、Whole Mount in Situ Hybridization で、発生初期マウス正常胚で *LPlunc 1* の発現パターンを解析したところ、一過性かつ Dynamic な発現パターンが判明した。すなわち、7.5 日胚で左右対称に node の crown cell で発現が開始し、2~3 体節期になると、左側で次第に強くなり、右側で漸減するという非対称な発現を示した。この発現は 9~10 体節期になると、node の構造の消退に伴い、消失する。これは左決定因子 Nodal の node での発現様式と一致し、Nodal の発現との相関関係が示唆された。そこで、Nodal の Hypomorph 型変異体であり、node と左側板中胚葉の両方で Nodal の発現が消失する *Nodal<sup>neo/neo</sup>* 変異マウスで *LPlunc 1* の発現を調べた。意外なことに、*LPlunc 1* の発現は全体的に若干弱くなりながら、左右非対称性はそのまま維持されていたことから、*LPlunc 1* の左右非対称な発現は Nodal signal に非依存的であると考えられた。

さらに *LPlunc 1* を左右形成の遺伝子カスケード上に位置付けるため、左右軸形成の初期決定に係る二つの遺伝子 *iv* 及び *inv* の変異体マウスで *LPlunc 1* の発現を調べた。*LPlunc 1* の左右非対称な発現パターンは *iv/iv* マウスでは random になり、*inv/inv* マウスでは左右性が逆転し、*iv* 及び *inv* の表現型と完全に発現様式が一致するため、*iv* と *inv* の下流に位置することが結論できた。

#### [総括]

node は Organizer 活性を持ち、左右軸初期決定の場所であり、マウス胚の初期発生に重要な構造である。本研究は初期マウス胚において node で左右非対称に発現する新規遺伝子 *LPlunc 1* を同定した。*LPlunc 1* は lipid binding domain を持つ脂質輸送蛋白質であることは、脂質輸送が軸形成の分子機構に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、大変興味深い。現在まで、node にのみ非対称に発現する遺伝子はほとんど知られていないため、*LPlunc 1* の同定は、左右形成の初期段階で node で生じる分子機構を解明するための糸口になると期待される。

### 論文審査の結果の要旨

マウス胚の左右非対称性の形成過程を概略すると、四つの Step に要約できる。最初の Step は Organizer 活性を持つ node で左右の対称性が破れる、いわゆる初期決定である。Step 2 はこの最初の左右の情報が、node から左側側板中胚葉に伝達される過程である。Step 3 では左側板中胚葉全域で左側決定因子である TGF  $\beta$  superfamily に属する Nodal の発現が確立される。Step 4 では、これら左右非対称な情報をもとに、それぞれの器官原基で左右非対称な形態形成が進んでゆく。現在までに、その各々の Step で鍵となる因子が同定されているが、その因子間の知見はまだ断片的である。そこで、鍵と鍵間の情報を埋め、われわれは左右非対称な新規遺伝子を系統的に単離、選別する Screening を行い、この過程で *LPlunc 1* が単離された。本研究は *LPlunc 1* の蛋白属性と正常胚における詳細な発現パターン、及び本遺伝子を左右形成の遺伝子カスケード上に位置付けるためにいくつかの左右形成異常を示す変異マウスにおける発現変化を解析した。

cDNA の塩基配列に基づき Database を検索した結果、予想されるアミノ酸配列から、*LPlunc 1* は BPI/PLUNC superfamily に属する因子であることが判明した。BPI/PLUNC superfamily は大きく分けて、LT/LBP Family と PLUNC Family の二つのファミリーで構成される。LT/LBP family 分子は lipid binding domain をもち、cholesterol、phospholipid、lipopolysaccharide と結合でき、血液中で脂質を運搬し、lipoprotein の balance の調節や細菌に対す

る宿主防御機能を持つと考えられている。一方、PLUNC family の機能は不明だが、その発現部位と lipid binding domain を持つことから、細菌に対する宿主防御機能を持つ可能性が想定されている。LPlunc 1 は BPI/PLUNC Superfamily に保存される二つの lipid binding domain を有し、他のメンバーと同じく、その Lipid binding domain 構造をとるために重要な二つのシステイン残基も保存されている。他のファミリー分子と同様に、LPlunc 1 は分泌蛋白であることも Western Blotting より判明した。

次に、発生初期マウス正常胚で *LPlunc 1* の発現パターンを解析したところ、一過性かつ Dynamic な発現パターンが判明した。すなわち、7.5 日胚で左右対称に node の crown cell で発現が開始し、2～3 体節期になると、左側で次第に強くなり、右側で漸減するという非対称な発現を示した。この発現は9～10 体節期になると、node の構造の消退に伴い、消失する。さらに *LPlunc 1* を左右形成の遺伝子カスケード上に位置付けるため、左右軸形成の初期決定に係る二つの遺伝子 *iv* 及び *inv* の変異体マウス、及び左右形成の Step 2 に関わる遺伝子 Nodal の Hypomorphic 変異体で *LPlunc 1* の発現を調べたところ、*LPlunc 1* の左右非対称な発現パターンは *iv* と *inv* の下流に位置し、Nodal signal に非依存적であることがわかりました。

node は Organizer 活性を持ち、左右軸初期決定の場所であり、マウス胚の初期発生に重要な構造である。LPlunc 1 は lipid binding domain を持つ BPI/PLUNC superfamily に属する因子であることから、脂質輸送が軸形成の分子機構に重要な役割を果たしている可能性が示唆され、大変興味深い。現在まで、node にのみ非対称に発現する遺伝子はほとんど知られていないため、*LPlunc 1* の同定は、左右形成の初期段階で node で生じる分子機構を解明するための糸口になると期待される。したがって、学位の授与に値すると考えられる。