



Title	Involvement of Sip1 in Positioning of Somite Boundaries in the Mouse Embryo
Author(s)	丸橋, 光次
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	http://hdl.handle.net/11094/46237
DOI	
rights	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

氏名	まるはしみつし 丸 橋 光 次
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学位記番号	第 19841 号
学位授与年月日	平成17年11月11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	Involvement of SIP1 in Positioning of Somite Boundaries in the Mouse Embryo (体節の分節境界の位置決定における <i>Sip 1</i> 遺伝子の役割)
論文審査委員	(主査) 教授 近藤 寿人 (副査) 教授 濱田 博司 教授 八木 健

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

脊椎動物の体節形成は、前後軸に沿ったからだの分節性を規定する重要な現象である。例えば、脊椎動物のからだには脊椎骨や肋骨など、連続して繰り返される節状の構造があり、これら組織形成は初期発生段階の体節に由来する。この体節形成の異常は脊椎骨や肋骨の癒合・湾曲などの遺伝病の原因になっている。したがって体節の形成機構を明らかにすることにより、疾患の原因を解明することが期待される。

マウス胚の体節は、未分節中胚葉が2時間ごとに、ほぼ等間隔で、1つ1つくびれ切れる(分節化)ことによって形成される。これまでの私たちの研究から、マウス初期胚において、*Sip 1* 遺伝子の発現が、次に分節が生じる境界の後側で周期的に繰り返されることが示されていた。このことから本研究では *Sip 1* 遺伝子の体節形成過程、特に未分節中胚葉の分節化における機能に注目し、*Sip 1* ノックアウトマウスの作製と解析を行い、脊椎動物における体節形成機構を解明することを目的とした。

〔 方法ならびに成績 〕

Sip1 ノックアウトマウスの作製には、ジーンターゲット法を用い、またコンディショナルノックアウトマウスの作製も視野に入れ、Cre/LoxP システムを導入した。Western blotting 法による解析から、変異体において SIP1 タンパク質が生成されていないことを確認し、この変異体が null 変異体であることを確認した。*Sip1* ホモ変異胚(*Sip1*^{-/-}胚)は、胎生9-10日目まで致死となるため、すべての実験は8.5日胚を用いて解析を行った。形態および組織学的解析から、*Sip1*^{-/-}胚の個々の体節は前後に短く、一方で未分節中胚葉は前後に長くなっていた。体幹部の沿軸中胚葉の長さ(体節領域+未分節中胚葉)は、野生型胚と変わらなかったことから、*Sip1*^{-/-}胚において、体節の分節化の生じる境界が前側に移動していることが示唆された。また、分節境界に特異的に発現し、体節の分節化に不可欠である *Mesp2* 遺伝子の発現も、*Sip1*^{-/-}胚では前方に移動しており、体節の分節境界の前方化を支持する結果であった。

これまでの研究から、体節の分節境界は、時計遺伝子 (*Lunatic Fringe*, *Hes7* など) の活性化による時間的な制

御と、前後軸に沿った FGF/Wnt シグナルの濃度勾配による空間的な制御によって、決定されていると考えられている。次に私たちは、これら分節境界の決定に関与する遺伝子の発現を、in situ hybridization 法を用いて調べた。Sip1^{-/-}胚において、Lunatic Fringe や Hes7 (時間的制御)、Fgf8 および Wnt3a (空間的制御) の発現が、未分節中胚葉において、ともに前方へと広がっていた。Sip1^{-/-}胚における 1 つ 1 つの体節が形成される時間的な間隔は、野生型と同じであったことから、分節境界の前方化は時計遺伝子の時間周期性の変化によるものではないと考えられた。このことから、Fgf8 および Wnt3a の発現領域の前方への拡大が、分節境界を前側に移動させる原因と考えられた。Fgf8 の転写活性は node とその周辺部に限定されており、沿軸中胚葉に広がる後方から前方への発現の勾配は、「比較的安定な Fgf8 mRNA が時間経過とともに分解される」ことによってもたらされることが知られている。Sip1^{-/-}胚においても、Fgf8 の転写活性化領域は node とその周辺部であった。このことから、Sip1^{-/-}胚における Fgf8 の発現領域の前方への拡大は、転写活性化領域の前側への拡大ではなく、Fgf8 mRNA の分解が遅くなったことが原因であると考えられた。一方、レチノイン酸シグナルが、Fgf8 の発現を沿軸中胚葉の前側から抑制していることが知られている。私たちは、レチノイン酸合成酵素である Raldh2 遺伝子の発現を、Sip1^{-/-}胚で調べた。Sip1^{-/-}胚において Raldh2 遺伝子の発現領域が前側に縮小していた。このことから、Sip1^{-/-}胚においてレチノイン酸シグナルが沿軸中胚葉において減弱化されていることが示唆され、Fgf8 の発現領域の前方への拡大をもたらした可能性が示された。

[総 括]

この研究により、Sip1 遺伝子は、体節の分節境界の決定に不可欠な役割を果たすことが示された。また、体節形成に関わる遺伝子の発現を調べることにより、SIP1 は未分節中胚葉における Fgf8 mRNA の安定性に対して負に制御することによって、その発現を抑制すると考えられた。一方レチノイン酸の合成に関わる Raldh2 遺伝子の発現領域が、Sip1^{-/-}胚において前側へと縮小していたことから、SIP1 が Raldh2 の発現制御、すなわちレチノイン酸シグナル活性をコントロールすることによって、Fgf8 の発現領域の前方限界を規定することが考えられた。このように、Sip1 遺伝子は、Fgf8 の発現を分節境界で抑制することにより、正確な分節境界の設定し、脊椎動物胚の規則正しい分節性をもたらすために、不可欠な遺伝子であることが示された。

論文審査の結果の要旨

マウス初期胚の体節は、沿軸中胚葉が、前側から 1 つ 1 つ、等間隔でくびれ切れること (分節化) によって形成される。Sip1 遺伝子の発現は、体節の分節境界の後側で繰り返される。分節境界は、沿軸中胚葉における Fgf8 発現領域の、前方境界付近で決定されることが示されている。

Sip1 ノックアウトマウス (Sip1^{-/-}) 胚では、すべての体節の分節境界が前側に移動していた。Sip1^{-/-}胚では、Fgf8 の発現領域が前側に拡大しており、この拡大が分節境界の前方化の原因であると考えられた。さらに Fgf8 の発現領域の拡大は、Fgf8 の mRNA の安定化によることが示唆され、SIP1 が分節境界において Fgf8 mRNA の安定性を負に制御している可能性が示された。

本論文では、Sip1 遺伝子が体節形成に深く関わっており、分節境界の決定に重要な役割をもつことが示された。また、Fgf8 の発現が、分節境界において SIP1 によって抑制される事により、正確な分節境界の位置が決定されるものと考えられた。本論文は、脊椎動物の体節形成における新たな知見を提供し、分節化の分子機構の解明に寄与したものである。これを学位論文に値するものと認める。