

氏 名 石 島 淳 子

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第328号

学位授与の日付 平成10年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 Developmental genetics of mouse *Tail-short(Ts)*  
mutant.

論文審査委員 主 査 教 授 桂 勲  
教 授 中辻 憲夫  
助 教 授 林 茂生  
助 教 授 藤澤 敏孝  
助 教 授 古関 明彦（千葉大学）

Mice with the *Tail-short (Ts)* mutation have a shortened, kinky tail and numerous skeletal abnormalities, including a homeotic anteroposterior patterning problem involving the axial skeleton. The phenotype is variable on different genetic backgrounds as is seen in many other mouse mutants. The viability of *Ts* heterozygotes varies dramatically, depending on the mouse strain crossed with the mutant strain. At the extremes, the heterozygotes are viable or lethal prenatally. This indicates that some genes play critical roles in mouse embryogenesis in cooperation with *Ts* mutant gene, and that they are functionally polymorphic among inbred strains.

In this study, outcross experiments between the original *Ts* stock and several inbred strains clearly indicated that laboratory mouse strains could be divided into two groups. A cross with strains from the first group yields viable *Ts* heterozygotes, while a cross with strains of the second group results in dominant lethality in utero. On the basis of that, I planned to map gene(s) that controls strain differences in the viability of the *Ts* heterozygotes. Detailed linkage analysis indicated that a single chromosomal region, genetically inseparable from the *Ts* locus, is responsible for the difference. This result suggests that there exists polymorphism at *Ts* locus among inbred strains, and the allelism affects the viability of the *Ts* heterozygotes.

The different manifestations of the phenotype of *Ts* heterozygotes between these two crosses were useful to understand the function of the *Ts* gene in different stages of mouse embryogenesis. I investigated the phenotype of the *Ts* mutation in crosses with the two groups of strains, which give viable and lethal *Ts* embryos respectively. Some defects, represented by the developmental retardation, were common to embryos both in the viable and the lethal crosses, and were generally emphasized in the lethal cross. Morphological and histological analysis indicated that *Ts* embryos from the lethal cross exhibit more severe developmental defects from the gastrulation stage through to the early fetal stage. In particular, the umbilical vein does not develop properly, which may be the cause of the lethality of the *Ts* heterozygotes around 12.5 dpc.

Morphological anomalies of the *Ts* heterozygotes in the lethal cross were observed in as early as neural plate stage. The embryonic region was poorly developed compared with the extraembryonic region. The phenotype was due to formation of excess mesoderm in the extraembryonic region, which is derived from the posterior primitive

streak. The excess mesoderm was accompanied by the ectopic expression of Brachyury (*T*) gene in the proximal embryonic region. At the fetal stage, the derivatives from distal embryonic region, notochord and tail-gut, showed hyperplasia in the most caudal region of *Ts* heterozygotes. On the other hand, the tail-bud mesenchyme was poorly formed, which explains the cause of the caudal truncation, the phenotype of *Tail-short*, in *Ts* heterozygotes. The inappropriate allocation of the mesodermal cells at the early gastrulation stage in *Ts* heterozygotes may cause shortage of progenitors of the embryonic mesodermal cell in the primitive streak, and results in the defect in the tail-bud formation.

In the later developmental stage, several lines of evidence for the disturbance in establishment of the segmental identity were observed in *Ts* heterozygous embryos, which is associated with alternations of expression pattern of marker genes. Among neural tube defects, malformation of the hindbrain was common phenotype of *Ts* heterozygotes. When segmentation in the hindbrain of *Ts* heterozygotes was examined, the boundary of *Krox20* expression was altered. Additionally, in the viable cross *Ts* heterozygous mice showed several homeotic transformations in the axial skeletal formation with high reproducibility. Most characteristic two phenotypes were posterior transformation of the cervical vertebra to the thoracic vertebra, and an additional vertebra in the upper thoracic region with anterior transformation of all the prevertebrae caudal to the additional vertebra. Overexpression of *Hoxc6* gene in the posterior segments of *Ts* heterozygotes was associated with the anterior transformation.

From study of the phenotypes of *Ts* heterozygous embryos, I hypothesized that there are two major functions of *Ts* gene in normal mouse embryogenesis in two different developmental stages. In early embryonic stage, *Ts* gene plays an important role in mesodermal patterning in primitive streak along anterior-posterior axis. In addition, *Ts* gene is also involved in specification of the segmental identity of hindbrain and prevertebrae. Considering these two putative functions, *Ts* gene plays a crucial role in establishment of mouse axial body plan from early gastrulation stage through to early fetal stage. *Ts* mutation disturbs its normal functions and causes numerous anomalies in mouse embryogenesis. This study suggests that the variable manifestations of the mutant phenotype depends on allelic forms at the *Ts* locus of mating partners.

## 論文の審査結果の要旨

マウスの *Tail-short* (*Ts*) 変異は1950年に発表された古典的な変異で、ヘテロ接合体では短く折れ曲がった尾とホメオチックな転換を伴う異常な骨格、ホモ接合体では桑実胚での致死という表現型を示すことが知られているが、表現型の詳細な解析は行われていない。また、この変異体を様々な系統のマウスと交配すると、系統によりヘテロ接合体の表現型が胚致死から生育可能まで大きく変化することが知られている。石島淳子さんはこれに興味を持ち、*Ts*ヘテロ接合体の表現型を修飾する遺伝子(modifier)のマッピングを行った。また、modifierの存在下で*Ts*ヘテロ接合体がさまざまな強さの表現型を示すことを利用して、胚発生の各段階における*Ts*遺伝子機能に関する情報を得た。

*Ts/+*変異体を10系統のマウスと交配した結果、*Ts*ヘテロ接合体は、5系統では生育可能、4系統では致死、1系統では大半が致死で生存個体は無尾という中間的表現型を示した。後者の5系統は実験用マウスの中で近縁のグループに属するため、これら5系統で*Ts*ヘテロ接合体に致死性を付与するmodifierは、同一起原に由来するらしい。このmodifierを、DNA多型マーカーを用いてマッピングしたところ、*Ts*遺伝子自体か、その非常に近傍にある遺伝子であることがわかった。

致死となる交配では、*Ts*ヘテロ接合体は12.5 dpcで死ぬが、その原因として臍帯静脈が異常に細いことが考えられる。形態異常は既に囊胚初期に見られ、原条の前後軸に沿った中胚葉の分布が異常になる。すなわち、胚体外部分で中胚葉の過形成(*Brachyury* 遺伝子の発現拡大に伴う)が起り、逆に胚体部分が異常に小さい。これが胎児期では、体の最後部での脊索と尾腸の過形成と尾芽間充織の形成欠陥になり、尾部先端部が欠失する。

これらの異常に加えて、体節のidentityの異常も生じる。致死となる交配では神経管の異常、特に*Wnt3a*の*in situ* hybridizationで見た時に菱脳形成異常があり、菱脳特異的に発現する*Krox20*遺伝子の発現境界が変わる。生育可能な交配では、最後部の頸椎がその後の胸椎の形に形態転換し、逆に胸部とそれより後の椎骨がそれぞれ少し前側の椎骨の形に変わる。後者に対応して、後部の体節では*Hoxc6*遺伝子の過剰発現が起こっている。囊胚期の異常が体節のidentityの異常をひき起こすのか、両者は*Ts*遺伝子の別の機能に基づくものかは、不明である。

石島さんは、所属する研究室の高い技術力を生かし、自ら熱心に実験を行った結果、扱いの困難な*Ts*変異体を遺伝学および発生学的に解析することに成功した。これらの研究は、今後の*Ts*遺伝子機能解析の土台となり得るものであり、審査委員全員一致で博士論文として十分な内容を持つと結論した。

公開発表およびそれに続く非公開審査委員会での質疑応答から、石島さんは専門分野の知識とその理解に関して、博士の学位を得るのに十分なものをもつと審査委員会は結論した。英語の実力に関しては、博士論文自体が英語で書かれており、これを読んだ結果、十分な能力があると判断した。