

氏名 榎屋啓志

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第214号

学位授与の日付 平成8年3月21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 マウス四肢前後軸形成の遺伝学的解析

論文審査委員 主査 教授 杉山 勉
教授 池村 淑道
教授 中辻 憲夫
助教授 林 茂生
教授 井出 宏之（東北大学）

論文内容の要旨

脊椎動物の四肢形態形成において、遠近軸、前後軸それぞれについて、apical ectodermal ridge (AER)、zone of polarizing activity (ZPA) が位置情報源として働く。現在では、AERからのシグナル分子としてfibroblast growth factor-4 (FGF-4)、FGF-2が働くことがわかっており、ZPAの活性の本体であると考えられる *Sonic hedgehog* (*Shh*) 遺伝子が単離されている。後部AERとZPAの間には、正の相互作用があり、双方からのシグナルがないと互いの発現が維持されない。また両方のシグナルの存在下で、*Hoxd*遺伝子群、*Bmp-2*遺伝子は前後軸に沿って領域特異的に発現する。ZPAは肢芽後端部に位置するが、肢芽前端部の細胞も、レチノイン酸処理、microdissociation法による細胞培養、AERの除去によりZPA活性を持つようになる。しかし、このような肢芽前端部のZPA化の鍵となる遺伝子や、ZPAを肢芽後端部に局在させるような遺伝的なメカニズムについては未だ知見が少ない。本研究では、マウスを材料とすることにより、四肢前後軸形成を遺伝学的に解析することを試みた。その利点は、次の通りである。マウスでは、肢の形態形成異常と考えられる軸前側多指症の突然変異が、多数報告されている。これらの遺伝子は、四肢の形態形成において重要な機能を持っていることが明らかである。それらの遺伝子の機能を解析することで、形態形成のプロセス一つ一つを理解することができる。① 現在では、PCRによって容易に検定できるマウスゲノム上のマイクロサテライト多型マーカーが、6000以上利用できる。突然変異の染色体上の位置を詳しく調べることにより、その原因遺伝子を同定、単離することが原理的に可能である。A 遺伝的多型を持つ多数の実験用近交系統が確立されている。これらは連鎖解析に有利なだけでなく、特定の突然変異の表現型を抑制または増幅し遺伝子浸透度 (penetrance) を変化させることがある。このことを利用して、ある遺伝的カスケードにある突然変異遺伝子と相互作用する新しい遺伝子の存在を明らかにし、それぞれの遺伝子とそのカスケードのどこに位置するかについて解析することが可能である。

本論文の第1章では、国立遺伝学研究所において新しく得られた軸前側多指症を示すマウス突然変異体 *Recombination induced mutant 4* (*Rim4*) について詳細なマッピングを行った。その結果、*Rim4* はマウス第6染色体近位にマップされた。その染色体上の位置から、*Rim4* が新しい軸前側多指症の突然変異であること、また第6染色体近位にマップされ四肢形態形成において機能している既知の遺伝子である *Hox-a* 遺伝子とは別の遺伝子であることが明らかとなった。

第2章では、*Rim4* と、*Hemimelic extra-toe* (*Hx*)、*Extra-toes^J* (*Xt^J*)、*luxate* (*lx*)、*Strong's luxoid* (*lst*)、*X-linked polydactyly* (*Xpl*) の六つの軸前側多指症を示す突然変異体 (それぞれ第6、5、13、5、2、X染色体上にマップされる) について発生生物学的、分子生物学的解析を行った。これらの突然変異体は肢第一指側に過剰指を形成する。*Shh*、*Fgf-4* がこれらの突然変異体全てで肢芽前端部に異所的に発現していた。また、機能欠損型の突然変異 *Xt^J* の原因遺伝子である *Gli3* 遺伝子は肢芽前側中胚葉で発現していた。以上の結果から、これらの突然変異体の多

指症が肢芽前端部での異所的なZPAの形成に起因すること、肢芽前端部でZPA形成を抑制する遺伝的カスケードが存在することが明らかとなった。この結果は、多くの軸前側多指症がZPAの重複により形成されるものである可能性を示唆している。

第3章では、遺伝的背景が軸前側多指症の発現頻度に与える影響について検討を行った。*Rim4*ヘテロの多指症の発現率が、遺伝的背景により変化することに注目し、多指症の抑制効果の最も顕著であるMSM系統のゲノムに局在する多指症の抑制に関与する遺伝子（ここでは*Rim4*レスキュー遺伝子と呼ぶ）のマッピングを試みた。また他の軸前側多指症においてMSM系統との交配によるレスキューがみられるか否かを検討した。さらに、*Rim4*マウスにおける*Gli3*の発現の検討を行った。この結果、*Rim4*レスキュー遺伝子として、第2染色体上の*D2Mit13*近傍、第15染色体上の*D15Mit2*近傍の二つの候補遺伝子座を特定した。またMSM系統との交配は*Hx*、*Xt^J*、*Ix*、*Ist*の表現型をいずれもレスキューするが、*Xpl*を全くレスキューしないこと、*Rim4*ホモにおいて*Gli3*が正常に発現していることを明らかにした。*D2Mit13*近傍には、本研究で用いた軸前側多指症突然変異の一つである*Ist*が位置している。*Rim4*レスキュー遺伝子が*Ist*であるとする、このことは*Ist*が*Rim4*の下流にある可能性を示唆しており、*Ist*ヘテロの多指症をMSM系統がレスキューすることもこれを支持する。これらの結果から、*Xt (Gli3) - Rim4 - Ist - Xpl* という遺伝的カスケードが肢芽前端部での*Shh*発現抑制を制御している可能性を仮説として提示した。

論文の審査結果の要旨

梶屋啓志君はマウス突然変異系統を用い、脊椎動物の四肢パターン形成機構に関する発生遺伝学的研究を行った。

脊椎動物における四肢パターン形成機構の実験発生学的研究は、従来主としてニワトリ初期胚を用いて行われ、胚の肢芽後端部 ZPA 領域で特異的に発現される *Shh* 遺伝子が、肢芽の前後軸決定に重要な働きをすると考えられている。

梶屋君は多指症突然変異マウスを使用し、四肢パターン形成機構における前後軸決定のメカニズムの解析を行った。まず軸前側多指症突然変異 *Rim4* の染色体上座位が第 6 染色体近位にあり、既に分離されているどの多指症変異遺伝子とも異なる新遺伝子であることを明らかにした。

つぎに *Rim4* をふくむ 6 種軸前側多指症突然変異系統における *Shh* 遺伝子の発現をしらべ、変異系統肢芽において、*Shh* が後端部 ZPA 領域のみならず、正常では発現されない前端部においても異所的に発現され、この *Shh* 異所的発現が軸前側多指と密接に関係していることを明らかにした。

さらに *Rim4* ヘテロ接合個体の多指症発現頻度を抑制するレスキュー遺伝子を同定し、その作用解析の結果に基づき、*Shh* 遺伝子発現を制御する遺伝子作用カスケードのモデルを提出した。

この研究は、脊椎動物の四肢パターン形成制御に関与する遺伝機構に重要な新知見をもたらすものであり、学位論文としての条件を十分に満たすと判断する。