

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目

ウズラの HMM 変異体において多指症が発症するメカニズムの発生学的解析

氏 名 松原 由幸

論 文 内 容 の 要 旨

鳥類の変異体は、胚発生期における形態形成の研究に幅広く利用されてきた。モグラ (Talpidae) のような四肢の見た目からその名が付けられた、ニワトリの *talpid* 変異体 3 種 (*talpid*, *talpid²*, *talpid³*) は、多指症に代表される特徴的な表現型を持ち、四肢発生の研究分野において注目されてきた。過去の研究から、*talpid* 変異体はそれぞれ原因遺伝子が異なるが、どれも Sonic hedgehog (SHH) シグナル経路の異常によって多指症を発症することが分かっている。

ウズラの Hereditary Multiple Malformation (HMM) 変異体は、常染色体劣勢遺伝のホモ接合型致死の性質を持ち、原因遺伝子は不明である。HMM 劣勢ホモ接合体 (*hmmr*^{-/-}) は *talpid* 変異体と同様に多指症を発症する。その一方で、*talpid²* や *talpid³* に見られる皮下浮腫は *hmmr*^{-/-} には無く、また嘴の形状が異なるなど、ニワトリ *talpid* 変異体と HMM 変異体の間で表現型の差異も見られる。よってウズラの HMM 変異体は、四肢においてニワトリの *talpid* 変異体と類似した表現型を持つものの、その変異が生じる発生原理は *talpid²* や *talpid³* とは異なる可能性が考えられた。本研究で私たちは HMM 変異体を新しいタイプの *talpid* 変異体であると仮定し、HMM 変異体の肢芽における遺伝子発現や細胞レベルの解析を行い、ニワトリ *talpid* 変異体との比較を行った。

はじめに *hmmr*^{-/-} の四肢の骨格の形態を詳細に観察した。*hmmr*^{-/-} の自脚領域には多指症、合指症、短指症を併発した 4~11 本の指の形成が確認された。指骨の数や形状から前後軸に沿ってそれぞれ異なる指の個性を検討したところ、指の個性が完全に喪失していることが分かった。この結果から、発生中の肢芽における前後軸極性が失われていることが示唆された。そこで次に、指骨が形成されるより前の発生段階において、*hmmr*^{-/-} の肢芽の中で前後軸方向に極性を持って発現する遺伝子 (*Hand2*, *Gli3*, *Alx4*, *Lhx9*, *Hoxd13*) の発現パターンを調べた。その結果、それらの発現パターンの異常が見られたことから、*hmmr*^{-/-} の肢芽内の前後軸極性は、肢芽形成直後の St. 20-25 では部分的に維持されているが、自脚領域がつくられた St. 29 では失われていることが分かった。

四肢の前後軸極性は、肢芽の後端部にある Zone of Polarizing Activity (ZPA) から分泌される SHH タンパク質によって決められている。そこで私たちは、*hmmr*^{-/-} の肢芽において、SHH シグナルの下流に存在する遺伝子群の発現パターンを調べた。その結果、*hmmr*^{-/-} の肢芽において *Shh* の遺伝子発現や SHH タンパク質が存在しているにも関わらず、SHH シグナルの下流の遺伝子群 (*Gli1*, *Ptch1*, *Ptch2*, *Bmp2*) の発現は顕著に弱まっていた。このことから *hmmr*^{-/-} では、SHH タ

ンパク質の分泌経路に異常がある、もしくはSHHタンパク質の機能が不活化している可能性が考えられた。また、*hmmr*^{-/-}の肢芽にSHHタンパク質が発現している正常胚のZPAを移植しても、*hmmr*^{-/-}の肢芽間充織細胞では*Ptch2*の発現は誘導されなかった。このことから、HMM変異体においてSHHの下流のシグナル伝達経路に異常がある可能性も示唆された。

*talpid*²や*talpid*³では、肢芽の細胞においてSHHシグナルの伝達に必須であるプライマリーシリアの形成が阻害されている。しかし、*hmmr*^{-/-}の肢芽間充織細胞では、プライマリーシリアは野生型と同様に存在していた。このことからHMMでは*talpid*²や*talpid*³とは異なる発生原理でSHHのシグナル伝達が不活化されており、その結果四肢の前後軸パターン異常が引き起こされていることが示された。

SHHの存在下において転写因子GLI3は、転写活性化型のGLI3Aタンパク質として核へとSHHシグナルを伝え、下流遺伝子の発現を活性化する。ウェスタンブロットングにより、*hmmr*^{-/-}の肢芽では転写活性化型のGLI3Aが過剰に存在していることが分かった。また抗体染色によって、核内においてGLI3タンパク質の局在が見られた。SHHシグナルが不活化している*hmmr*^{-/-}でGLI3Aがなぜ過剰に存在しているかは不明であるが、SHHの下流遺伝子群の発現抑制が起こっていることから、GLI3Aの機能阻害が生じている可能性が考えられた。私たちは*hmmr*^{-/-}の肢芽から*Gli3*の短縮化した異常なsplicing variantを検出した。これと類似したsplicing variantを持つマウス変異体Polydactyly Nagoyaは、多指症を発症することが知られている。このことから*hmmr*^{-/-}の肢芽でも、*Gli3*の異常なsplicing variantによって、GLI3Aの活性が阻害を受けている可能性が示唆された。

本研究から、*hmmr*^{-/-}の肢芽ではSHHタンパク質の働きに異常があることに加えて、間充織細胞におけるSHHのシグナル伝達経路も不活化していることが分かった。*hmmr*^{-/-}の表現型が、*Shh*と*Gli3*それぞれの単独変異体よりも、*Shh*と*Gli3*の二重変異体の表現型に類似していることも、この結論を支持している。今後、HMM変異体の原因遺伝子の探索やその機能解析をすることで、SHHタンパク質の活性化機構や分泌経路を正常に維持するメカニズム、またプライマリーシリア内に存在するSHH受容体からGLI3の活性化に至るまでのシグナル伝達経路の構成因子の機能の解明が期待される。