

氏名	いけ や まこと 池 谷 真
学位(専攻分野)	博士(理学)
学位記番号	理博第2351号
学位授与の日付	平成13年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	理学研究科生物科学専攻
学位論文題目	マウス初期発生過程における Wnt-1 および Wnt-3a の機能に関する研究
論文調査委員	(主査) 教授 竹市雅俊 教授 西田栄介 教授 井口八郎

論文内容の要旨

発生過程において、受精卵からはさまざまな型の細胞が生み出される。特に、哺乳類の卵は基本的に対称であることから、発生過程で起こるさまざまな現象には細胞間の相互作用が重要な役割を果たすことになる。そのため、細胞間相互作用を担っている分子の機能を明らかにすることは、現在の発生生物学の一つの大きな研究テーマとなっている。

申請者は特に分泌性シグナル分子をコードする遺伝子である Wnt-3a の機能に興味を持ち、解析を行った。Wnt-3a は発生過程において、原条領域および中枢神経系の背側において領域特異的に発現する遺伝子である。すでに Wnt-3a のノックアウトマウスは作製されており、その表現型解析から、原条領域において未分化な細胞が体節へと分化するのに必須の遺伝子であるということが報告されていた。申請者は、ノックアウトマウスをさらに詳細に解析することにより、Wnt-3a の新しい機能として、椎骨の前後軸に沿った部域化に必須な役割を果たすということを明らかにした。また、cdx-1 遺伝子が Wnt-3a シグナルの下流で働くということを示唆するデータを示した。

また、もう一つの発現領域である中枢神経系の背側領域は、位置的には脊椎動物のからだの最も背側にあたる。このためそこから分泌される因子には、その物質を分泌する場所がからだの最も背側であるということを伝える役割があることが期待できる。またそれ以外に、脊椎動物が発生する上で重要な細胞集団である neural crest 細胞が神経管の背側から生み出される領域であり、その細胞集団の発生を制御していることも期待される。しかし、Wnt-3a ノックアウトマウスには、上記のような発生現象に関する異常は観察されなかった。

ここで考えられるのは、Wnt-3a と機能的によく似た他の wnt 遺伝子が Wnt-3a と同じ領域で発現しているために、その遺伝子によって Wnt-3a の機能が補完され、結果として Wnt-3a ノックアウトマウスでは表現型が観察されないという可能性である。実際、Wnt-3a とよく似た機能を持ち、Wnt-3a とほぼ重なって発現する遺伝子に Wnt-1 がある。そこで、Wnt-1 および Wnt-3a の両遺伝子を欠損したダブルミュータントマウスを作成し、その表現型を解析した。

まず外見からわかることとして、ダブルミュータントマウスは間脳の一部を欠いていた。そこで、間脳で発現する分子マーカーの発現を調べ、間脳の背側視床および zona limitans とよばれる背側視床と腹側視床の境界部がダブルミュータントマウスでは欠損していることを明らかにした。

つぎに、neural crest 由来の組織や移動中の neural crest について詳細な解析を行った。その結果、Wnt 遺伝子が neural crest の発生に重要な役割を果たしていることを明らかにした。

さらに、ダブルミュータントマウスにおいて体節のパターン形成がどうなっているかを調べたところ、皮筋節 (dermamyotome) の神経管側の領域の欠損および皮筋節の外側化、さらに硬節の分布が皮筋節の内側に広がっていることが観察できた。また、筋分化に関しても調べたところ、9.5日胚で発現するべき myf-5 の発現がほとんど観察できなかったのに対し、10.5日胚で発現する MyoD の発現量は特に影響を受けていなかった。以上から、Wnt-1 および Wnt-3a が体節のパターン形成に必須であること、初期の筋分化に必須であるが後期の筋分化には必須ではないことを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

発生過程で起こるさまざまな現象には細胞間の相互作用が重要な役割を果たす。そのため、細胞間相互作用を担っている分子の機能を明らかにすることは、現在の発生生物学の一つの大きな研究テーマとなっている。申請者は、その中でも特に分泌性シグナル分子をコードする遺伝子である Wnt-3a のマウス初期発生過程における機能に興味を持ち、解析を行っている。

すでに作成されていた Wnt-3a のノックアウトマウスの解析から、Wnt-3a は原条領域において未分化な細胞が体節へと分化するのに必須の遺伝子であるということが報告されていた。申請者は、ノックアウトマウスをさらに詳細に解析することにより、Wnt-3a の新しい機能として、椎骨の前後軸に沿った部域化に必須な役割を果たすということを明らかにしている。また、その分子メカニズムの一端として、*cdx-1* 遺伝子が Wnt-3a シグナルの下流因子として働いているということを示唆するデータを示している。椎骨の部域化に関してこのような分子メカニズムが報告された例はこれまでになく、このことは貴重な知見である。

また、申請者は Wnt-3a の中枢神経系の背側における役割についても論じている。この領域には位置的には脊椎動物のからだの最も背側にあたるため、そこから分泌される Wnt-3a には、その物質を分泌する場所がからだの最も背側であるということを伝える役割があることが期待できる。また、それ以外に、脊椎動物が発生する上で重要な細胞集団である neural crest 細胞が神経管の背側から生み出されるため、この細胞集団の発生を制御している可能性も考えられる。しかし、Wnt-3a ノックアウトマウスには上記のような発生現象に異常は観察されなかった。この原因として、Wnt-3a と機能的によく似ており、かつ同じ領域で発現している Wnt-1 遺伝子が Wnt-3a の機能を補完している可能性が考えられた。そこで本論文では、Wnt-1 および Wnt-3a の両遺伝子を欠損したダブルミュータントマウスを作成し、その表現型を解析している。その結果、移動中の neural crest 細胞の数が減少し、neural crest 細胞の分子マーカーの発現が神経管の背側に観察されたということを報告しており、wnt 遺伝子が neural crest の初期の発生過程に重要な役割を果たしていることを明らかにしている。neural crest 細胞の初期発生過程を制御している分子の報告はまだ少なくこの点において申請者の研究はこの分野の研究に大きく貢献することが期待される。

さらに申請者は、神経管から分泌される Wnt の役割として、体節の発生制御に関与しているということも報告している。体節のパターン形成は、周囲の細胞から分泌される因子によって制御されていることはすでにわかっていたが、神経管の背側から分泌される因子の分子実体は明らかでなかった。そこで、申請者はダブルミュータントマウスにおいて体節のパターン形成について解析をおこない、皮筋節 (dermamyotome) の神経管側の領域の欠損および皮筋節の外側化、さらに硬節の分布が皮筋節の内側に広がっていることを観察している。また、筋分化に関しても調べたところ、初期の筋分化がほとんど起こっていないことを報告している。その結果、Wnt-1 および Wnt-3a が体節のパターン形成に必須であること、初期の筋分化に必須であるが後期の筋分化には必須ではないことをはじめて明らかにしている。

以上の知見は、分泌性シグナル分子 Wnt-3a が発生過程においてさまざまな局面で重要な働きをしているということ、ノックアウトマウスの解析という非常に明確な手法で示しており、またその解析も非常に詳細なものである。よって、申請論文は博士 (理学) の学位論文として価値あるものと認められる。

なお、平成13年2月5日、本論文および参考論文に報告されている研究業績を中心とし、これに関連した研究分野について試問した結果、申請者の学識と研究能力を評価することができたので、合格と認めた。