

占める。その領域はN末端側 Zn フィンガークラスターの第4フィンガーと、Smad 結合領域、中央部ホメオドメイン様配列およびコレプレッサー CtBP 結合配列を含む。この第7エキソンの欠失が起こると、フレームシフトにより以降の第8エキソンで翻訳が停止され、結果的に上流のN末端側 Zn クラスターの第3フィンガーまでしか持たないようなタンパクが生じることになる。このような Sip1 タンパクはおそらく全く機能を有しないものと考えられ、第7エキソンを欠失させることで、null 変異を誘起することが出来ると考えられる。そこでジーンターゲティング法を用いてその第7エキソンを挟むように loxP 配列を導入したターゲティングベクターを構築し、常法に従いマウス ES 細胞に導入し、相同組換え体 ES 細胞クローンを単離した。

(3) 次にこの ES 細胞を用いて、キメラマウスを作製し、生殖系列細胞が変異 allele を持つような生殖系列キメラマウスを単離した。このマウスと、C57BL/6 あるいは ICR 系統の野生型マウスを交配させ上述の Sip1 変異 allele を有するヘテロマウスを得た。さらこれらのマウスと Cre recombinase を発現している EIIa-Cre マウスを交配し、その子孫から、第7エキソンを欠失させたヘテロ変異マウスを単離した。

(4) 次にヘテロ変異マウス同士を交配させてホモ変異マウスを作製し、その表現型を観察した。その結果、ホモ変異胚では 1. 胎生 9.5 から 10.5 日で致死となる、2. 胎生 8.75 日でおこる、turning が起こらない、3. 体節は7個以上生じない、その結果、体幹部が成長せず、短縮な形態を示す、4. 神経管が全く閉じない、5. 前頭部の形成不全、等の症状を呈することが判明した。

D. 考察

(1) 第7エキソン欠失 allele が実際に null 変異であるのかどうかを以下の実験により確認した。胎生 12.5 日のヘテロ変異および野生型マウス胎児から核抽出液を調製し、Sip1 のN末端側に対する抗体を用いた western-blot 法によりそれぞれの抽出液内の Sip1 タンパクの大きさ及び有無を調べた。その結果、ヘテロ変異個体から得られた Sip1 タンパクは、存在量が約 1/2 に減少した野生型の大きさの物のみで、上述した小さなタンパクの存在は確認されなかった。即ち、第7エキソン欠失変異 allele は null 変異であることが確認された。ヒトにおける Sip1 の変異もマウスの第7エキソンに相当する部分にナンセン

ス変異が生じたものが大半を占めており、このことはヒトの SIP1 変異異常がドミナントネガティブな変異ではなく haplo-insufficient な変異によるものであることを示すものである。この変異のホモ変異マウスは比較的初期胚の胎生致死であることから、ヒトにおいても同様のことが起こると考えると、ヒトにおいて発見された患者が全て de novo の変異のみであることと矛盾しない。

(2) Sip1 ホモ変異マウスは胎生 10.5 日までに致死となる。turning がおこらず、体節も 7 個以上生じない。また神経管も頭部から尾部に至るまで決して閉じることはない。このような極めて重篤な表現型は Sip1 が初期胚の発生において重要な働きを担っていることを示しているが、同じ ZFHX ファミリーである δ EF1 の表現型が比較的後期の骨形成に起こることと比べると極めて対照的である。この違いは当然、その構造に反映されると考えられるが、両者の大きな違いは唯一 Smad との結合能力であり、また初期胚においては TGF β 系シグナルが発生の基本的なプロセスに重要な役割を担っていることを考え合わせると、Sip1 と TGF β 系シグナルとの関連性を強く示唆していると考えられる。

(3) ヒトにおける SIP1 変異異常では、脳発達障害を伴ったヒルシュスプルング病（神経堤細胞由来の組織である大腸の神経節にその異常が観察される）においてまず発見された。マウスにおいても Sip1 の発現は神経堤細胞（あるいはそれに由来する組織）に観察された。今後、この変異マウスにおいて、特にそのヘテロ変異マウスにおいて同様の症状が観察されるか検討する必要がある。

E. 結論

SIP1 遺伝子の（特に胚発生過程での）機能を個体レベルで明らかにすることを目的として、そのノックアウトマウスの作製と解析に着手した。これまでにマウス Sip1 遺伝子の null ホモ変異マウスの作製に成功し、その表現型の解析から、Sip1 はマウス初期胚の発生過程において極めて重要な働きを担っていることが示された。今後はこれらの表現型についてさらに詳細な解析を行い、ヒトにおける SIP1 遺伝子変異異常の理解も含めて、SIP1 分子の機能を個体レベルで明らかにしたい。

F. 研究発表

(原著論文)

1. Suppression of polydactyly of *Gli3* mutant (*extra toes*) by $\delta EF1$ homozygous mutation. Moribe, H., Takagi, T., Kondoh, H. and Higashi, Y. *Develop. Growth. Differ.* 42: 367-376 (2000)
2. The transcriptional repressor ZEB regulates p73 expression at the crossroad between proliferation and differentiation. Fontemaggi, G., Gurtner, A., Strano, S., Higashi, Y., Sacchi, A., Piaggio, and Blandino, G. *Mol. Cell Biol.* 21: 8461-8470 (2001)
3. Generation of the floxed allele of the SIP1 (Smad-interacting protein 1) gene for Cre-mediated conditional knockout in the mouse. Higashi, Y., Maruhashi, M., Nelles, L., Van de Putte, T., Verschueren, K., Miyoshi, T., Yoshimoto, A., Kondoh, H. and Huylebroeck, D. *Genesis* 32, 82-84 (2002)

(学会発表)

(国内)

- (1) SIP1 (Smad interacting protein 1) のマウス胚発生過程における発現パターンの解析. 丸橋光次, Kristin Verschueren, Danny Huylebroeck, 高木豪, 近藤寿人, 東雄二郎. 日本発生生物学会 第 33 回大会 高知, 2000/5/25
- (2) SIP1 遺伝子の体節形成過程における発現解析. 丸橋光次, Kristin Verschueren, Danny Huylebroeck, 高木豪, 近藤寿人, 東雄二郎. 日本分子生物学会 第 23 回大会 神戸, 2000/12/13
- (3) Cre/loxP 系を用いた水晶体特異的な遺伝子ターゲティング. 好本あき, 牟田真由美, 東雄二郎, 近藤寿人. 日本分子生物学会 第 23 回大会 神戸, 2000/12/13
- (4) SIP1 (Smad interacting protein 1) is essential for notochord, somite and neural tube formation during mouse development. Maruhashi, M., Van de Putte, T., Nelles, L., Verschueren, K., Huylebroeck, D., Higashi, Y. and Kondoh, H. 14th international congress of developmental biology, Kyoto (Japan), 2001/7/8-12
- (5) ノックアウトマウスを用いた *Zfhx* 転写調節因子 $\delta EF1$ ・ SIP1 の機能の個性と共通性の解析. 三好智也, 丸橋光次, T. Van de Putte, L. Nelles, K. Verschueren, D. Huylebroeck, 近藤寿人, 東雄二郎. 第 24 回日本分子生物学会, 横浜, 2001/12/9

- (6) マウス胚発生過程における体節、神経管および神経冠細胞の発生に果たす *SIP1* 遺伝子の役割. 丸橋光次, T. Van de Putte, L. Nelles, K. Verschueren, D. Huylebroeck, 近藤寿人, 東雄二郎. 第 24 回日本分子生物学会, 横浜, 2001/12/9
- (7) 水晶体特異的な *SIP1* の欠損が眼の発生に及ぼす効果. 好本あき, 東雄二郎, 近藤寿人. 第 24 回日本分子生物学会, 横浜, 2001/12/9

(国外)

- (8) Suppression of polydactyly of *Gli3* mutant (extra toes) by δ *EF1* homozygous mutation. Moribe, H., Takagi, T., Kondoh, H. and Higashi, Y. Mouse Molecular Genetics Meeting. Cold Spring Harbor Laboratory, New York (USA), 2000/8/30-9/3
- (9) *SIP1* (Smad interacting protein 1) is essential for somite and neural tube formation during mouse development. Maruhashi, M., Van de Putte, T., Nelles, L., Verschueren, K., Kondoh, H., Huylebroeck, D. and Higashi, Y., Mouse Molecular Genetics Meeting, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (USA), 2001/8/22-26

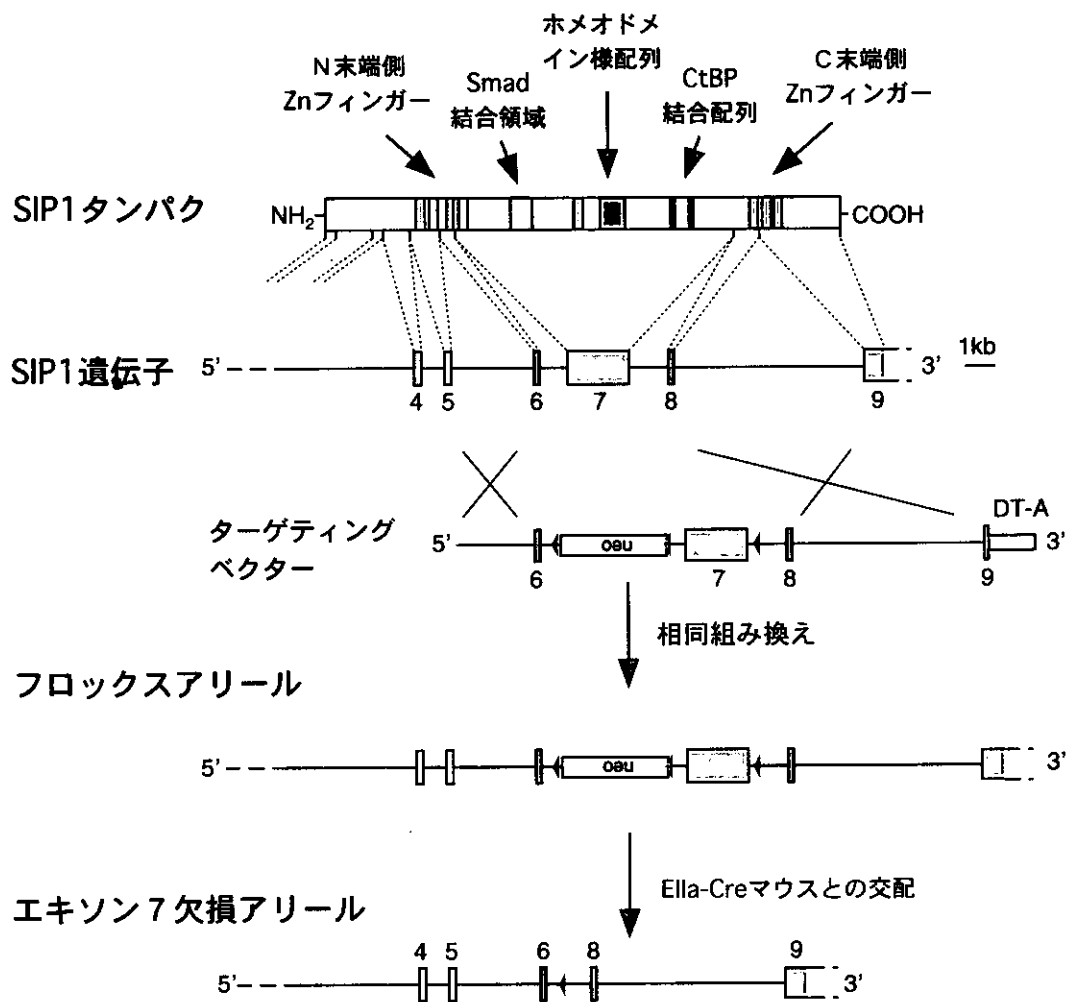


図1 エキソン7欠損 Sip1 遺伝子の作製方法

ターゲティングベクターは positive selection 用の薬剤耐性遺伝子 neomycin (neo) と negative selection 用のジフテリア毒素のA鎖の発現カセット (DT-A) が3'側に挿入されている。また赤三角で示した loxP 配列が neo 遺伝子の両側とエキソン7の下流 (イントロン8) に挿入されている。このターゲティングベクターを electroporation 法を用いて 5×10^7 個 ES 細胞に導入し、5 個の相同組み換え体 ES 細胞クローンを単離した。この中、2 個を用いて独立にキメラマウスを作製した。これらのキメラマウスから生殖系列キメラマウスを単離し、C57BL/6 あるいは ICR 系統の野生型マウスと交配させ、図のフロックスアリールを有するヘテロマウスを得た。さらにこれらを Ella-Cre マウスと交配し、その子孫からエキソン7欠損アリールを持つヘテロ変異マウスを単離し樹立した。

厚生科学研究費（脳科学研究事業）
分担研究報告書

神経堤細胞の発生分化におけるシグナル分子の役割の解析

分担研究者：栗原 裕基

（熊本大学発生医学研究センター胚形成部門細胞識別分野 教授）

研究要旨

神経堤細胞の発生分化におけるシグナル分子の役割についてエンドセリンシステムを中心に解析し、頭部神経堤細胞から鰓弓の外胚葉性間葉細胞や血管平滑筋細胞への分化過程で ET-1→ET-A 受容体経路が HAND などの転写因子の誘導に関与していることが明らかになった。さらに、神経堤細胞のマーキング、単離同定、特異的遺伝子導入のために ET-A 受容体プロモーターに GFP をつないだトランスジェニックマウスを作成し、ET-1 の標的となる神経堤細胞を標識することに成功した。このマウスは ET-1→ET-A 受容体経路のシグナル解析のみならず、神経堤細胞研究に広く応用可能であり、本プロジェクトへの貢献が期待できる。

A. 背景

神経堤細胞は、神経板の陥入過程で神経溝の両縁に生ずる外胚葉由来の細胞集団として発生する。自己再生能と多分化能を有する幹細胞としての性質を備え、その末裔は神経細胞やグリア細胞・皮膚メラノサイト・副腎髄質細胞など多彩である。神経堤細胞は神経管の閉鎖に伴って遊走し、その行き先によって運命が決定される。

頭部神経堤細胞は神経細胞やグリア細胞・皮膚メラノサイトの他、頭頸部や大血管の形成に与る間葉細胞、血管平滑筋細胞へ分化する点で特徴的である。これらの細胞は、鰓弓部に遊走し、間葉系の細胞（ectomesenchymal cell）に分化した後、さらに鰓弓部の骨格系や軟部組織・腺支持組織を形成する。これらは、Meckel および Reichert 軟骨を中心とする骨格系の他、鰓嚢の発達とも関連して、口蓋や舌・歯・腺組織・軟部組織などの構造を形成する。

これら頭部神経堤細胞の発生異常は、総動脈管・大血管転移などの大血管起

始異常、Fallot 四徴症、大動脈弓縮窄・離断、動脈管開存などの先天性心疾患とともに顔面・口蓋・胸腺・副甲状腺の形成異常を合併し、その多くは染色体 22q11 の欠失を伴い、症候の頭文字と染色体の番号を並べて CATCH22 と総称されている。

B. 研究目的

我々はこれまで、ET-1 遺伝子のノックアウトにより、このペプチドが胎生期器官発生において、ET-1 が頭部/心臓神経堤細胞の分化や形態形成に重要であることを見いだした。さらに我々は ET-1 ノックアウトマウスの解析を分子細胞レベルで進めることによって、神経堤細胞から鰓弓および大血管形成への関与のメカニズムを解明する手がかりを得ることを目指した。さらに、ET-1 シグナルの標的となる神経堤細胞の同定と単離できるシステムを開発することにより、神経堤幹細胞の分化誘導機構研究への広い展開を目指した。

C. 結果および考察

(1) ET-1 ノックアウトマウスの解析

ET-1^{-/-}マウスでは鰓弓および鰓弓動脈における神経堤由来の大血管平滑筋・骨・軟骨などの間葉系組織に分化および形態形成異常を認めた。これらの組織において、ET-1 は上皮細胞に、ETA 受容体は神経堤由来外胚葉性間葉細胞に発現が見られた。ET-1^{-/-}胚の大血管平滑筋および鰓弓間充織では dHAND, eHAND, gooseoid などの転写因子の発現が低下～消失しており、さらに大血管における neuropilin-1 の発現が著減していた。dHAND^{-/-}マウスにおいて neuropilin-1 の発現が低下していること、neuropilin-1^{-/-}マウスにおいても大血管形成に同様の異常をきたすことから、ET-1→dHAND→neuropilin-1 のシグナル経路が大血管形成に重要であることが明らかになった。

ET-1 シグナルが神経堤細胞の分化に関与する分子機序を解明するため、第 1 鰓弓において神経堤細胞由来の Meckel 軟骨の形成を中心に解析した。軟骨細胞分化に重要な転写因子 Sox9 の発現は、マウス胚の第 1,2 鰓弓で間葉凝集→Meckel 軟骨形成に先立って限局的に認められたが、ET-1^{-/-}胚におよび ET-1^{-/-} 鰓弓器官培養においてはその発現はびまん性で限局したパターンを作らず、Meckel 軟骨形成も認められなかった。マイクロビーズによる ET-1 添加実験では、ET-1 によっては Sox9 発現は誘導されず、ET-1 は Sox9 自体の発現誘導よ

りも Sox9 陽性細胞の凝集に重要と考えられた。一方、正常胚と ET-1^{-/-}胚由来の鰓弓器官培養のいずれにおいても FGF8 添加によって Sox9 の発現が誘導された。鰓弓上皮における FGF8 の発現パターンは正常胚と ET-1^{-/-}胚とで大きな差はなかった。さらに、抗 FGF8 中和抗体処理により、器官培養における Sox9 発現が阻害された。

ET-1 は頭部/心臓神経堤細胞から血管平滑筋を含めた間葉系細胞への分化に、dHAND, eHAND, gooseoid などの転写因子の活性化を介して関与する。血管平滑筋への分化と血管形成においては、ET-1→dHAND→neuropilin-1 のシグナル経路が重要と考えられ、SemaphorinIII や VEGF165 との相互作用が今後注目される。さらに、神経堤細胞から軟骨への分化・形態形成においては FGF8→Sox9 のシグナル経路との協調作用が示唆された。

(2) ET-1 シグナル標的細胞の同定および単離システムの開発

次に、ET-1 の標的がどの細胞で、それによってどのようなメカニズムで上記の転写因子が活性化するのか、さらにどのようなメカニズムで形態形成に関与するのかが次の課題となる。そのため、我々は頭部/心臓神経堤細胞の ET-1 の機能的受容体が ET-A 受容体 (ETAR) であることに注目し、ETAR 遺伝子プロモーターによって蛍光蛋白 GFP が発現するトランスジェニックマウスを作成した。

GFP の発現は、神経管形成初期より神経外胚葉に発現し、鰓弓においては神経堤細胞の遊走経路に一致して発現が認められた。神経外胚葉における発現は胎生 10 日頃には消失したが、鰓弓における発現は継続した。この発現パターンは、ETAR の *in situ* ハイブリダイゼーションの結果とほぼ一致した。この結果より、ET-1 シグナルの標的細胞は胎生 8.5 日前後の早期の遊走神経堤細胞であり、その時期に何らかの細胞内シグナルが働いて下流遺伝子の発現が制御されていると考えられた。

さらに、成獣マウスでは血管に一致した発現が見られる他、心臓や脳の一部にも発現が認められ、神経外胚葉及び神経堤細胞の他、血管、心臓、脳などからの細胞の単離同定、動態追跡に有用であると考えられる。

D. 結論

本研究により、神経堤細胞が血管平滑筋細胞に分化し大血管形成に関与する過程において ET-1 シグナルの重要性と他の因子との関連が明らかになってき

た。しかし、ET-1によって作動する細胞内シグナルのどの経路がどのようにして神経堤細胞の分化段階を制御するのか、細胞レベルの変化がどのようにして形態の変化につながるのかなど、発生学的に重要な課題が残されている。本研究で作成した ETAR 遺伝子プロモーターを用いたマウスは、その解析に極めて有用である。即ち、神経堤細胞のサブポピュレーションとして ETAR 陽性細胞を同定してその動態を追跡することによって分化及び形態形成に重要なシグナル分子を同定していくことが可能になる。さらにこのマウスを用いることにより、ET-1 以外の分化制御因子に関する研究に広く応用可能であり、本プロジェクトに大きく貢献できるものと期待される。

3. 研究成果の刊行に関する一覧表

原著論文

Yamada, K., Yamada, Y., Nomura, N., Miura, K., Wakako, R., Hayakawa, C., Matsumoto, A., Kumagai, T., Yoshimura, I., Miyazaki, S., Kato, K., Sonta, S., Ono, H., Yamanaka, T., Nagaya, M., Wakamatsu, N.: Nonsense and frameshift mutations in ZFHX1B, encoding Smad-Interacting protein 1, cause a complex developmental disorder with a great variety of clinical features. *Am. J. Hum. Genet.* 69: 1178-1185, 2001.

Yamada, Y., Miura, K., Kumagai, T., Hayakawa, C., Miyazaki, S., Matsumoto, A., Kurosawa, K., Nomura, N., Taniguchi, H., Sonta, S., Yamanaka, T., Wakamatsu, N.: Molecular analysis of Japanese patients with Rett syndrome: Identification of five novel mutations and genotype-phenotype correlation. *Hum. Mutat.* (Online#443) 18: 253, 2001.

Wakamatsu, N., Yamada, Y., Yamada, K., Ono, T., Nomura, N., Taniguchi, H., Kitoh, H., Mutoh, N., Yamanaka, T., Mushiake K., Kato, K., Sonta, S., Nagaya, M.: Mutations in SIP1, encoding Smad interacting protein-1, cause a form of Hirschsprung disease. *Nat. Genet.* 27: 369-370, 2001.

ミニレビュー

若松延昭：てんかんと神経堤障害を呈する知的障害患者の病因遺伝子の決定。
日本神経精神薬理学会誌 21: 63-67, 2001.

4. 研究成果の刊行物・別刷

20010652

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。