

論文の内容の要旨

論文題目 ジーントラップ法により得られた EphA2 変異マウスの解析

氏名 成瀬 智恵

Eph 受容体型チロシンキナーゼファミリーは、チロシンキナーゼファミリーの中で最多の分子の属するファミリーである。Eph ファミリーのリガンドは ephrin ファミリーとして知られているが、ephrin ファミリーは細胞膜上への結合様式から ephrinA と ephrinB のサブファミリーに分けられている。Eph ファミリーも、それらのリガンドに対する親和性を基に EphA と EphB に分けられる。Eph 受容体と ephrin リガンドは、神経、血管、体節、四肢など、発生過程においてマウス胚の様々な組織に発現し、機能することが知られている。そして、多くの場合、Eph 受容体を発現する細胞と、ephrin リガンド発現細胞は相互排他的に分布することが知られており、*in vitro* で細胞を混在させたときに相互に排斥するよう機能することも確かめられている。最近の研究では、相互排他的な機能だけでなく、Eph 受容体と ephrin リガンドが同一細胞に同時発現している場合や Eph 受容体のアイソフォームが存在する場合には互いの細胞が親和性を持つことが明らかになり、Eph 受容体と ephrin リガンドの役割は、発生過程を理解する上でますます重要性を増してきた。私は、ジーントラップ法により EphA サブファミリーの1つである EphA2 の変異マウスを得た。その結果、EphA2 が尾部における脊索細胞の位置決定に重要な役割を果たすことが明らかになった。マウスにおける Eph ファミリー及び ephrin ファミリーの欠損マウスについてはいくつかの報告があり、その大部分は神経系に欠陥を持つが、脊索形成に Eph ファミリーが関与することを示したのはこの報告が初めてである。

EphA2ヘテロ変異マウスは野生型マウスと区別がつかないが、EphA2ホモ変異マウスは尾部の屈曲、短小化が起こる表現型を示した。成獣の尾部の組織切片標本を作製し観察したところ、ホモ変異体の90%において尾椎が異所的に形成されていることがわかった。尾部の異常の原因を調べるために、尾長及び尾部の形態の異常の起こる時期を調べた結果、胎生12.5日から13.5日の間に形態異常が現れることがわかった。

そこで、胎生12.5日前後での尾部形成におけるEphA2とephrinA1リガンドサブファミリーの働きを調べるために、正常な尾形成における発現パターンを調べたところ、図1A、Eに示すようにEphA2は脊索の先端部に限局した発現を示した。一方、EphA2のリガンドの1つであるephrinA1が図1Cに示すように尾芽に発現していた。EphA2発現細胞とephrinA1発現細胞は隣接していたが、ephrinA1は脊索及び脊索となるべき細胞には発現しておらず、両者の発現部位は重複してはいなかった(図1G)。ところが、EphA2変異マウスにおいては、ephrinA1の発現パターンに変化は見られなかったが(図1D、H)、

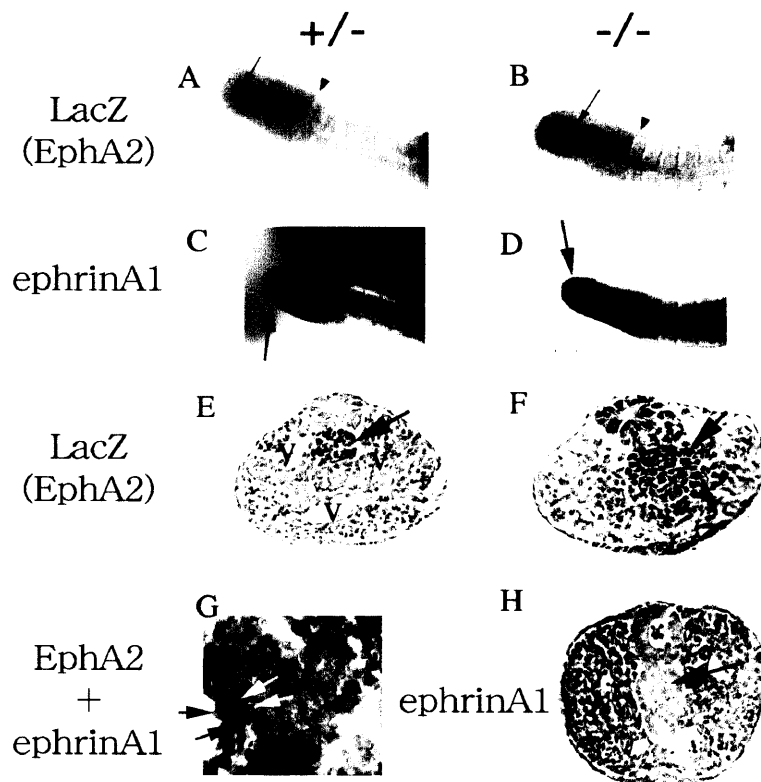


図1 ヘテロ接合体 (+/-) とホモ接合体 (-/-) の尾部におけるEphA2とephrinA1の発現パターンの比較。AからDの矢印は染色された部位を、矢頭は最遠位の体節を示す。E、F、Hの矢印は脊索を示す。Gの黒矢印はEphA2発現細胞を、白矢印はephrinA1発現細胞を示す。説明本文参照。

EphA2を発現すべき細胞が ephrinA1 発現領域である尾芽にまで広がって分布していた (図 1B、F)。この結果は、尾形成においては EphA2 と ephrinA1 の両者の排他的な相互作用が脊索予定細胞の分布を決定している可能性を示唆する。

そこで、脊索形成に異常がないかどうかを脊索細胞の自発的発現遺伝子である Brachyury (T) の発現を指標に調べた。その結果、野生型及びヘテロ接合体では図 2A のように尾の前後軸方向に一直線に伸びている脊索が、ホモ接合体では尾の先端部において二分していた (図 2B)。個体によっては二分した脊索が複雑に曲がり、交叉しているものもあった (図 2C)。さらに、体節から硬節を誘導する Sonic hedgehog と、硬節のマーカーである Pax1 の発現を調べることにより、脊索の異常形成が脊椎の形成に及ぼす影響を調べた結果、Sonic hedgehog の発現部位は脊索の異常に従い彎曲しており (図 2E)、Pax1 により異所的な硬節の形成も認められた (図 2G)。これらのことから、EphA2 変異マウスにおいては、脊索の異常形成が起こり、そのことが直接の原因となって将来脊椎となる硬節の異所的な形成が起こることがわかった。

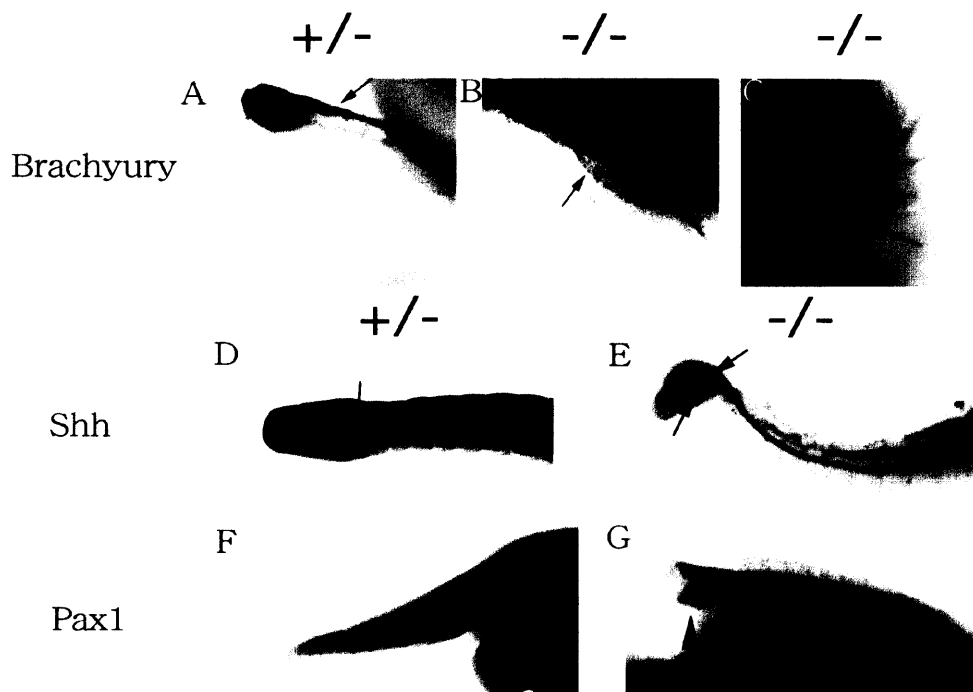


図2 ホモ接合体における脊索の異常形成。AからEの矢印は脊索を示す。Gの矢頭は異所的に形成された硬節を示す。説明本文参照。

以上の結果から、EphA2 と ephrinA1 は尾部の脊索先端において、相互排他的なシグナルを送ることによって、脊索となるべき細胞が尾芽に拡散しないように働いていると考えられる。尾部に形成異常のある変異マウスは、T や curly tail など、数多く知られているが、正常な尾部の形成に、尾部の先端での脊索細胞の正常な分布が必須の条件であることは、それらの解析からはわかっていなかった。この研究から、尾部の正常な形成には、脊索先端に脊索となるべき細胞が凝集していることが必要であり、そのために Eph と ephrin が相互排他的に機能していることが明らかになった。

In vitro の実験により、EphA2 は integrin を介して細胞内にシグナルを送り、細胞骨格を制御することが示唆されている。また、EphA2 は細胞骨格の制御に深く関わる分子である、Focal Adhesion Complex や integrin と関連する FAK と直接結合し、Focal adhesion complex Associated Kinase (FAK) のリン酸化を制御することもわかっている。しかし、*in vitro* あるいは脊索先端において、EphA2 の下流にどんな分子が存在するかは未だに不明である。今後、EphA2 からどのようなシグナル伝達機構によって脊索となる細胞の拡散を抑制することができるのか、検討していく予定である。

また、EphA2 と ephrinA1 の発現は、尾芽が形成された後の尾部脊椎先端だけでなく、胎生 7.5 日胚の体幹部の脊索先端、すなわち結節にも見られる。よって、尾部だけでなく、体幹部においても、脊索細胞の分布に関わる機能を持つと考えられる。EphA2 のみの欠損マウスでは、体幹部には異常が認められなかったが、これは、他の Eph ファミリーが機能を代償しているためと考えられる。実際、EphA ファミリーの中では EphA4 も脊索の先端部に発現しているという報告がある。今後、EphA2 と EphA4 のダブルノックアウトマウスを作製し、脊索形成における Eph ファミリー全体としての機能を調べていく予定である。