

審査の結果の要旨

氏名 山崎大輔

本研究は高等動物の形態形成において重要な役割を担っていると考えられる細胞運動を制御する分子機構を解析することを目的とし、マウス遺伝子ターゲットングの系にて、細胞運動に不可欠であるアクチン細胞骨格の再編成を制御する分子 WAVE2 の生理的機能の解析を試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. WAVE2 の遺伝子欠損マウスを作製するため、マウスゲノムシーケンス上での WAVE2 遺伝子の構造を決定し、翻訳開始コドンを含むエキソン配列をネオマイシン耐性遺伝子と置き換えるためのベクターを作製した。このベクターをマウス胚性幹細胞に導入し複数のネオマイシン耐性クローンを得た。それらのクローンのゲノム DNA をサザン解析したところ、部位特異的組み換えを起こしたと考えられるクローンの存在が確認された。それら組み換えクローンをマウス胚盤胞に導入、キメラマウスを作製し、野生型マウスとの交配により WAVE2 ヘテロ欠損マウスを得た。WAVE2 ヘテロ欠損マウスは繁殖力を有し正常であった。WAVE2 ヘテロ欠損マウス同士の交配により WAVE2 ホモ欠損マウスの作製を試みたが、WAVE2 ホモ欠損マウスは胎生 10 日前後で頭部および心臓で浮腫や出血が認められ胎生致死であった。このことから WAVE2 はマウスの初期発生に必須であることが示された。
2. WAVE2 のマウス初期発生期における局在を抗 WAVE2 抗体を用いて検討したところ、WAVE2 は胎生 9.5 日胚において血管や心臓の内皮細胞に強く発現していることが確認された。そこで WAVE2 ホモ欠損マウスの血管を血管内皮細胞のマーカーで染色したところ、18 体節期ではほぼ正常に血管の構

築が起こっていたが、22 体節期ではその血管構築が著しく阻害されていた。このことから *WAVE2* ホモ欠損マウスでは 18 体節期までに起こる血管発生は正常に起こるが、それ以降に起こる血管新生の段階に異常があることが示された。

3. 血管および心臓の電子顕微鏡観察を行ったところ、*WAVE2* ホモ欠損マウスの血管内皮細胞では野生型のそれにくらべて細胞がうすく、野生型ではほとんど認められない間隙が認められた。このような間隙からは血球系の細胞が漏出する様子がしばしば認められ、*WAVE2* ホモ欠損マウスで認められる浮腫や出血の原因となっていることが示された。
4. *WAVE2* ホモ欠損マウスより血管内皮細胞を単離し VEGF で細胞を刺激したときの細胞の形態変化を調べたところ、*WAVE2* を欠損した血管内皮細胞では野生型で認められるアクチンの集積で確認される膜ラフリングの形成が著しく抑制されていた。このことから *WAVE2* は血管内皮細胞におけるアクチン細胞骨格の再編成に必須であることが示された。
5. *WAVE2* を欠損した血管内皮細胞を用いて、マトリゲル上での血管内皮細胞の形態形成を検討したところ、野生型と比較して *WAVE2* を欠損した血管内皮細胞はその形態形成が著しく抑制されていた。そのときの細胞の形態を調べたところ、*WAVE2* を欠損した血管内皮細胞では野生型の細胞で認められる運動する方向に形成される葉状仮足がほとんど認められなかった。このことから *WAVE2* は運動先端でのアクチン細胞骨格の再編成を介して血管内皮細胞の運動を制御していることが示された。

以上、本論文はアクチン細胞骨格の再編成を制御する分子 *WAVE2* の遺伝子欠損マウスの解析から、細胞運動がマウス初期発生期における形態形成において必須の役割を担っていること明らかにした。本研究はこれまで知られていなかった、形態形成において細胞運動が果たす役割の解明に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。