

論文内容の要旨

論文題目 : Analysis of *Six* gene function of the mouse urogenital development
in the *Six1/Six4* double-deficient mice

(*Six1/Six4* 二重遺伝子変異マウスを用いたマウス泌尿生殖器形成における
Six 遺伝子の機能解析)

氏名 小林 寛基

発生学の中心的課題は、未分化な器官原基がどのようにして、複雑かつ高度に専門化された組織を形成していくかという点である。遺伝子欠損マウス作成技術の確立によって哺乳動物での *in vivo* における遺伝子の機能解明が大きく進展し、発生学上の課題の解決につながる遺伝子が明らかになりつつある。しかし、遺伝子の多くは、構造の類似したサブタイプが存在し、ファミリーを形成している。そして、ファミリーの中の他の遺伝子により、機能が補償されている事も少なくない。その為、一つの遺伝子の欠損マウスでは、異常な表現型が生じない場合や、その遺伝子の機能が十分に明らかにされてない場合がある。また逆に、ファミリー内の遺伝子間で、*in vitro* における機能が類似し生体における発現領域が重なっていても、*in vivo* における機能は異なる事もある。そのような場合、対象となる複数の遺伝子を同時に欠損させたマウスを作成し解析することで、*in vivo* における遺伝子間の機能の違いが明らかになったり、新たな機能が発見されたりする事がある。

腎臓及び性腺を含む泌尿生殖器は、沿軸中胚葉と側板中胚葉の間に形成される中間中胚葉から発生する。哺乳類では、腎臓は間充織の上皮への転換で特徴づけられる三つの段階（前腎、中腎、後腎）をへて発生する。最初に形成される腎臓である前腎は、体節と表皮外胚葉からのシグナルによって分化が開始し、中間中胚葉前方領域の細胞をウォルフ管とネフロンへとという上皮組織へと分化させる事で生じる。中腎は、尾側方向へ総排泄腔に向けて伸張したウォルフ

管によって、凝集した近傍の間充織に上皮転換が誘導され、ネフロンがウォルフ管にそって連なった中腎細管が形成されることで生じる。最後に、後腎（成体における腎臓）は後肢の後ろ側に位置するウォルフ管の部分から分岐した尿管芽が、凝集した後腎間充織へと誘導されることから始まる。後腎間充織に引寄せられた尿管芽の分岐と後腎間充織の腎上皮細胞への転換を伴う分化が双方向誘導的相互作用によって連続的に生じる結果、最終的に多数のネフロンからなる腎臓が形成される。

性腺は、中腎の腹側の側方表面が肥厚化して生じ、中腎に由来する体細胞と尿膜基部の胚体外中胚葉から腸管を介して移動してくる生殖細胞から構成されている。そして、性腺はあらゆる器官原基の中で、雄性または雌性の二種類の器官を発生しうる性質を有している。つまり、性分化によって両方への分化能を有する一種類の原基から、二つの器官のうち的一方、精巣または卵巣が形成される。Y染色体上に存在する *Sry* 遺伝子（sex-determining region of Y）の発現によって、雄の性腺は精巣への分化が確定される。一方、Y染色を有さず、*Sry* の発現を生じない雌の性腺では卵巣へと分化が進行する。

Six 遺伝子はショウジョウバエにおいて複眼の形成に必要である *sine oculis* 遺伝子の脊椎動物におけるホモログであり、特定の DNA 配列への結合に必要である保存されたシックスドメインとホメオドメインによって特徴づけられている。*Six* 遺伝子は、ヒトとマウスでは *Six1-Six6* 遺伝子迄の六種類のサブタイプが同定され、*Six* 遺伝子ファミリーを形成している。*Six3* 遺伝子と *Six6* 遺伝子は主に頭部に発現し、前脳及び目の発生に必須であり、*Six5* 遺伝子は白内障に関係している。また、*Six2* 遺伝子は *Six1* の下流で、腎形成において間充織の未分化維持に関わっていることが報告されている。

Six 遺伝子ファミリーのうち *Six1* と *Six4* 遺伝子は、発生期の体節を含め非常に類似した発現パターンを示している。また、*Six1* と *Six4* は *in vitro* において筋形成に関与する *myogenin* プロモーターの *MEF3* サイトに結合し、供転写活性因子である *Eya* と結合して、プロモーター活性を正に制御する事が知られている。これらの知見から、*Six1* と *Six4* 遺伝子は、*in vivo* で機能的に類似であることが予想された。*Six4* 遺伝子欠損マウスは、骨格筋を含め胚発生において全く異常を示さず、継代も可能であったが、この事は類似した発現を示し、標的遺伝子である *myogenin* の転写を同様に活性化できる *Six1* 遺伝子の補填的機能によって説明できた。しかし一方で、*Six1* 遺伝子欠損マウスは内耳、鼻、胸腺、腎臓、骨格筋といった組織の発生に異常を示した。これらの結果は、*Six4* は *Six1* 遺伝子の機能的欠損を補えないが、*Six1* は *Six4* 遺伝子の機能を補える事を示唆し、*in vivo* において *Six1* と *Six4* 遺伝子の機能が異なることを示唆していた。

ところで、腎発生に関して *Six1* 遺伝子欠損マウスは異常を示すが、その表現型には個体間の差が大きいため、*Six4* 遺伝子が機能的に重複している可能性が示唆された。そこで、泌尿生殖形成に関して *Six1* 遺伝子及び *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスを解析することで、*in vivo* における

Six1 と *Six4* 遺伝子の機能の違い及び、あらたな *Six* 遺伝子の *in vivo* における機能の解明につながると考え、研究を行った。

私はまず、*Six1* と *Six4* は腎形成間充織においても共発現していることを示した。また、腎臓領域において *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスを調べた結果、*Six1* 遺伝子欠損マウスと異なり、全ての個体で腎臓及び尿管が形成されず、それらの原基として発生の後腎形成に重要な二つの構造体である後腎間充織の凝集及び尿管芽も全く形成されないことが分かり、*Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスは *Six1* 遺伝子欠損マウスと比べて重篤に後腎形成が阻害されていることが判明した。遺伝子欠損マウスにおける遺伝子発現の変化を *in situ* hybridization 法を用いて調べた結果、尿管芽の引き寄せに関わる *Gdnf* 及び腎形成間充織の分化や *Gdnf* の制御に関わる *Pax2* の後腎間充織における発現が、*Six1* 遺伝子欠損マウスでは若干減少しているが、確認されるのに対し、*Six1/Six4* 二重遺伝子変異マウスでは完全に欠失していた。*Sall1* 遺伝子の発現に関しては、*Six1* 遺伝子の欠損だけではほぼ完全に欠失していた。一方、腎形成において *Pax2* と機能的重複がある事が知られている *Pax8* は、*Six1/Six4* 二重遺伝子変異マウスにおいてのみ発現が欠失していた。以上の結果から、*Six1* と *Six4* 遺伝子は協調的に後腎発生に関わるが、その機能は同等ではなく、遺伝子発現の制御のレベルで異なる活性を有する可能性が示唆された。一方、中腎領域では、*Pax2* 及び *Pax8* の遺伝子発現の変化は、後腎間充織における *Six1* 遺伝子及び *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスの結果と同様であったが、中腎細管の形成阻害は *Pax2* 遺伝子の欠損だけで引き起こされ得る為、中腎細管の形成に関しては、*Six4* 遺伝子の寄与はほとんどないことが判明した。

次に、腎臓と同様に中間中胚葉から発生する生殖器に注目して解析を行った結果、*Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスは、*Six1* 遺伝子欠損マウスと異なり、高頻度に卵巣と子宮を有する雌の個体が確認された。そこで、核型を調べる為に Y 染色体上にある *Sry* 遺伝子の存在を genomic PCR により調べた結果、核型が XY (*Sry* 陽性) であるにも関わらず、雌の生殖器をもって産まれている個体が *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスで存在している事が判明した。XY 型の *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスの性腺の発生の構造を調べた結果、雄に特徴的である精細管及び内腔上皮下の血管形成が生じていない事が分かった。性腺における遺伝子発現の変化を RT-PCR で調べた結果、*Sry* の下流で雄化に関わる遺伝子の *Sox9* の発現が XY *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスの性腺においても観察された。しかし一方で、*Sox9* の下流の遺伝子である *MIS*、*Cyp26b1*、*P450scc* の発現の減少が観察された。さらに、雌化に関わる *Fst* の発現の上昇が XY *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスで観察された。これらの事から、XY *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスの性腺では、雄への分化ははじまっているが、雄への分化を維持することはできず、雌への分化に切り替わっている事が示唆された。加えて、雌の性腺に特異的に見られる生殖細胞の減数分裂が XY *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスの性腺においても確認された。以上の結果から、XY *Six1/Six4* 二重遺伝子欠損マウスでは、雄の雌化が生じていることが示された。なお、この発見は *Six* 遺伝子

が雄の性分化に関わる事を示した最初の報告である。

私は本研究において、泌尿生殖器形成における *Six1* と *Six4* 遺伝子の *in vivo* における機能の違いを明らかにした。さらに、*Six* 遺伝子が腎形成に必須なだけでなく、従来知られていなかった雄の性決定にも関わる事を初めて示した。これらの結果は、腎発生、性分化といった重要な発生現象の解明の新たな糸口となりうるのではないかと考えられる。