

学位論文題名

SYT 遺伝子欠失マウスの作製と解析

学位論文内容の要旨

Synovial sarcoma translocation protein (SYT) 遺伝子は、滑膜肉腫に特徴的な染色体相互転座 t(X;18)(p11.2;q11.2) として 1986 年に Limon et al., Turc-Carel et al. によって初めて報告され、1994 年には Clark et al. によって染色体の切断点近傍に単離された遺伝子の名称である。その結果 t(X; 18) においては 18 番染色体上に位置する SYT 遺伝子と、X 染色体上の synovial sarcoma X break point (SSX) 遺伝子の相互転座によるキメラ遺伝子 SYT-SSX が形成されることが判明した。

SYT は 387 アミノ酸からなる分子量約 57kDa の蛋白で、既知の蛋白との相同性は認められず、明らかな機能は不明である。SYT の N 末端 54 アミノ酸 (20-73AA) は哺乳類、魚類、植物、線虫など、多くの種で保存された領域であることが判明し SYT N-terminal homology (SNH) 領域と名づけられた。中央部から C 末端にかけて、QPGY 領域と呼ばれる約 200 アミノ酸はグルタミン (Q)、プロリン (P)、グリシン (G)、チロシン (Y) に富む特徴的な配列を有する。QPGY 領域の役割も現在不明であるが、クロマチンリモデリング複合体のサブユニットのひとつである p250, brm associating factor (BAF250) の一部に高い相同性を有すると報告されている。SYT は SH2 及び SH3 領域結合配列を有すると報告されているが、現在まで結合蛋白は確認されていない。

SYT に直接結合する分子としては、現在のところ human homologue of *brahma* (hBRM), BRG1, p300, AF10 の 4 つの分子が報告されており、いずれもクロマチンリモデリングに密接に関与している。これら 4 つの結合蛋白はいずれも、SNH を含む SYT の N 末端 50 アミノ酸と結合し、SYT はクロマチンリモデリング複合体と相互作用することにより染色体構造を改変し、転写調節に関与する分子である可能性が示唆されるが、その詳細な機能は依然として不明である。

本研究では、SYT の生理機能を個体レベルで解析することを目的として、ヒト SYT 遺伝子のマウスホモログである mSYT 遺伝子欠失マウスの開発を行った。

mSYT 遺伝子のエクソン 1 の 5'側約 1.7kb から、エクソン 1、エクソン 2 までの領域をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを構築し、これを用いて定法に従いヘテロ欠失マウスを作製した。さらにヘテロ欠損マウス同士の交配によりホモ欠失マウスの作製を試みた。

生後 3 週齢のマウスの尾から DNA を抽出し、119 個体で PCR 及びサザンブロット法にて遺伝子型を決定した所、ホモ欠失マウスは認められなかった。またヘテロマウスには肉眼上異常は認められず、生殖能力も著変なかった。以上の結果より mSYT 遺伝子ホモ欠失マウスは胚性致死であることが示唆された。

次に mSYT 遺伝子ホモ欠失マウスが発生のどの段階で致死となるのかを確かめるためにヘテロマウス同士を交配させ、発生のような段階で胚を採取し解析した。致死となる時期の推定は、ホモ欠失胚の有無、吸収胚の有無、1 腹あたりの胚の個数、各胎仔を容れる子宮間の大小不同の有無を基準とし総合的に判定したところ、胚齢 10.5 日前後で致死となることが示唆された。

胚齢 11.5 日の外表所見として野生型、ヘテロ欠失胚の間には明らかな差異は認められなかったが、mSYT ホモ欠失胚は野生型、及びヘテロ欠失胚に比して明らかに小型であり、発育遅延が認められ、また頭部神経管の閉鎖不全が見られた。組織学的にも野生型、ヘテロ欠失胚の間には明らかな差異は認められなかったのに対して、mSYT ホモ欠失胚では、外表所見と同様に頭部神経管が終脳から延髄レベルまで完全に開存したままであり、その他の所見としては心筋形成の遅延、肝細胞板及び造血巣の成熟遅延が顕著なほか、いずれの器官においても約 0.5 日程度の分化段階の遅延が見られた。

本研究において作製した mSYT 遺伝子ホモ欠失マウスは胚性致死であり、SYT は初期発生において必須の分子であることが示された。生後 3 週齢のマウス 119 固体の遺伝子型決定の結果では、野生型とヘテロ欠失マウスの数比は雌雄ともほぼ 1:1 であり、mSYT は haploinsufficiency を呈する可能性が示唆されるため、今後より発生後期の段階において mSYT ヘテロ欠失マウスのうち lethal となるものが存在するかどうかについて詳細な解析を行う必要がある。

頭部神経孔の閉鎖は胚齢 9 日で起こり、正常のマウス胚では 9.5 日齢には全数で閉鎖が完了する。また神経管閉鎖不全はいくつかのノックアウトマウス、トランスジェニックマウスで見られる障害であり、神経管閉鎖不全に関わる遺伝子群も多数報告されているが、その詳細な発症機序は現在までのところ不明である。ホモ欠失マウスにおいて胚全体に発育遅延が見られるとしても、11.5 日齢で閉鎖不全が見られることは mSYT の欠失による表現型である可能性が高い。しかしながら中枢神経系の発生障害が初期発生段階において致死の原因となることは考えにくい。ため致死の要因となる他の障害の存在が考えられる。ホモ欠失胚は 10.5 日齢前後で致死となり、13.5 日齢では吸収胚も含めてホモ欠失胚が認められないことから、8.5 日齢前後で何らかの致死障害をきたしていることが推察される。この時期において、形成障害により致死となりうる器官としては、血球、血管、心臓など循環器系が挙げられる。

SYT ホモ欠失マウスでは、11.5 日齢のホモ欠失胚にて、肝臓の成熟遅延は見られるものの、造血巣の形成を認め、3 系統いずれの血球系も肝類洞内及び血管内に認められることから致死の原因となる障害をきたしている可能性は低いと考えられた。

血管に関しては 11.5 日齢のホモ欠失胚にて、大動脈の形成は野生型と形態学上明らかな差異は認められなかった。しかし、卵黄囊の血管網の成熟障害の可能性は残されており、今後血管内皮細胞のマーカーである内皮細胞接着分子(PECAM-1)などによる卵黄囊の免疫染色を施行し検討する必要がある。

心臓に関しては、ホモ欠失胚において 9.5 日齢では野生型に比べて心筋細胞が低形成であり、その結果心臓の収縮性が低下した為と思われる内腔の拡張が見られた。また 11.5 日齢では野生型に比して肉柱の低形成が認められた。しかしながら心不全を示唆する心嚢水腫のような所見は見られなかった。今後心筋細胞の増殖に障害があるか、もしくは何らかの機序により心筋細胞のアポトーシスの亢進が見られないかを MIB-1, Ki-67 などによる増殖マーカーの免疫染色、TUNEL 染色を用いて検討する必要がある。その上で、各発生段階に関わる転写因子群の発現パターンの変化や、SYT との相互作用について、*in situ* hybridization 法などにより解析を進めていきたい。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 畠 山 鎮 次
副 査 教 授 筒 井 裕 之

学 位 論 文 題 名

SYT 遺伝子欠失マウスの作製と解析

Synovial sarcoma translocation protein (SYT)遺伝子は、滑膜肉腫に特徴的な染色体相互転座 t(X;18)(p11.2;q11.2)として 1986 年に初めて報告され、1994 年には染色体の切断点近傍に単離された遺伝子の名称である。その結果 t(X; 18)においては 18 番染色体上に位置する SYT 遺伝子と、X 染色体上の synovial sarcoma X break point (SSX)遺伝子の相互転座によるキメラ遺伝子 SYT-SSX が形成されることが判明した。SYT は 387 アミノ酸からなる分子量約 57kDa の蛋白で、N 末端 54 アミノ酸は哺乳類、魚類、植物、線虫など、多くの種で保存された領域であることが判明し SYT N-terminal homology (SNH)領域と名づけられた。中央部から C 末端にかけて、QPGY 領域と呼ばれる約 200 アミノ酸はグルタミン (Q)、プロリン (P)、グリシン (G)、チロシン (Y)に富む特徴的な配列を有する。SYT に直接結合する分子としては、現在のところ human homologue of *brahma* (hBRM), BRG1, p300, AF10 の 4 つの分子が報告されており、いずれもクロマチンリモデリングに密接に関与している。これら 4 つの結合蛋白はいずれも、SNH を含む SYT の N 末端 50 アミノ酸と結合し、SYT はクロマチンリモデリング複合体と相互作用することにより染色体構造を改変し、転写調節に関与する分子である可能性が示唆されるが、その詳細な機能は依然として不明である。

本研究では、SYT の生理機能を個体レベルで解析することを目的として、ヒト SYT 遺伝子のマウスホモログである mSYT 遺伝子欠失マウスの開発を行った。mSYT 遺伝子のエクソン 1 の 5'側約 1.7kb から、エクソン 1、エクソン 2 までの領域をネオマイシン耐性遺伝子で置換したターゲティングベクターを構築し、これを用いて定法に従いヘテロ欠失マウスを作製した。さらにヘテロ欠失マウス同士の交配によりホモ欠失マウスの作製を試みた。生後 3 週齢のマウスの尾から DNA を抽出し、119 個体で PCR 及びサザンブロット法にて遺伝子型を決定した所、ホモ欠失マウスは認められなかった。以上の結果より mSYT 遺伝子ホモ欠失マウスは胚性致死であることが示唆された。次に mSYT 遺伝子ホモ欠失マウスが発生のどの段階で致死となるのかを確かめるためにヘテロマウス同士を交配させ、発生のような段階で胚を採取し解析したところ、胚齢 10.5 日前後で致死となることが示唆された。

胚齢 11.5 日の mSYT ホモ欠失胚は野生型、及びヘテロ欠失胚に比して明らかに小型であり、発育遅延が認められ、また頭部神経管の閉鎖不全が見られた。組織学的にも mSYT ホモ

欠失胚では、外表所見と同様に頭部神経管が終脳から延髄レベルまで完全に開存したままであり、その他の所見としては心筋形成の遅延、肝細胞板及び造血巣の成熟遅延が顕著なほか、いずれの器官においても約 0.5 日程度の分化段階の遅延が見られた。

本研究において作製した mSYT 遺伝子ホモ欠失マウスは胚性致死であり、SYT は初期発生において必須の分子であることが示された。生後 3 週齢のマウス 119 固体の遺伝子型決定の結果では、野生型とヘテロ欠失マウスの数比は雌雄ともほぼ 1:1 であり、mSYT は haploinsufficiency を呈する可能性が示唆された。

口頭発表に当たり、副査の畠山（鎮）教授より mSYT 遺伝子の alternative splicing variant の発現量の差異、mSYT 遺伝子欠失マウスにおける deletion 部位以外の転写の確認を Northern 解析などでの確認の有無、mSYT ヘテロ欠失マウスの成体での表現型の有無、mSYT と頭部神経管閉鎖に関わる因子群との相互作用について等に関する質問があった。また副査の筒井教授より chamber maturation に defect を示す表現型の詳細についての質問があった。最後に主査の長嶋教授より mSYT ホモ欠失マウス初期胚における心拍の有無、ヘテロ欠失マウスにおける haploinsufficiency の詳細について、成体での表現型検討のための conditional targeting knockout 技術導入の可否などに関する質問があった、これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は遺伝子欠失マウスの作成、解析により SYT 遺伝子が初期発生に必須の分子であることを明らかにした点で優れていると判断され、今後の SYT 遺伝子産物の生理機能を明らかにする上で貴重な示唆を与えたものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。