

論文要旨

Genetic Requirement of *taln1* for Proliferation of Cranial Neural Crest Cells during Palate Development

口蓋形成期の頭蓋神経堤細胞 (CNCC) 増殖における *taln1* の遺伝学的必要性

先天性奇形の多くは頭蓋顔面に現れる。頭蓋神経堤細胞 (CNCC) は胚の発生初期において複数の細胞プロセスを通して頭蓋顔面構造を形成するが、摂動現象による CNCC 細胞プロセスの乱れが頭蓋顔面の奇形の大きな原因と考えられている。

CNCC 細胞プロセスにおいて、細胞と細胞外マトリックス (ECM) の付着による細胞間の双方向性相互作用が頭蓋顔面の組織形成において重要な役割を果たすが、インテグリンがこの中心的な役割を果たしている。

Tln はインテグリンが仲介するシグナル伝達に関与する主要な細胞内骨格タンパク質の 1 つであり、具体的には、Tln が細胞内部のアクチン骨格とインテグリンの β サブユニット経由で ECM を繋ぎ、シグナルを伝達している。

脊椎動物の多くは *Tln* の 2 種類のアイソフォーム (*Tln1* と *Tln2*) を有しており、*Tln1* が胚発生に重要な役割を果たしているが、頭蓋顔面の組織形成における *Tln1* の役割はこれまで殆ど解明されていなかった。従って、本研究では、ゼブラフィッシュを用いて *tn1* の役割を解明し、頭蓋顔面部における先天性奇形を遺伝学的に予防するきっかけにしたいと考えた。

ゼブラフィッシュは頭蓋顔面形成に関わる分子的因子を研究するための有力な脊椎動物モデルであり、その篩板がヒトの一次口蓋に類似していて、ヒトの頭蓋顔面形成に関わる多くの遺伝子を保有している。

ゼブラフィッシュにおける *tln1* の役割を解明するために、*tln1* 欠損変異体と（本来の *tln1* を有する）野生型のゼブラフィッシュとを比較した。さらに、*tln1* 欠損変異体に mRNA を投与して *tln1* を部分的に回復させたレスキュー変異体を作り、これとの比較も行った。

実験の方法は論文本体に記述したとおりだが、主要なポイントは以下のとおりである。

- (1) *tln1* の遺伝子発現パターンを Whole-mount RNA In Situ Hybridization 法によって観察した。
- (2) ジェノタイピングによって遺伝子型を識別した。
- (3) qRT-PCR 法によって *tln1* の量的変化を観察した。
- (4) アルシアンブルー染色によりメッケル軟骨と口蓋の形状とサイズを観察した。
- (5) 共焦点レーザー顕微鏡と透過型電子顕微鏡を用いて頭蓋骨格筋とサルコメア構造の形状とサイズをそれぞれ観察した。
- (6) Pulse chase 法と EdU 法によって口蓋の CNCC 増殖を観察した。

得られた結果をまとめると、以下のとおりである。

- (1) *tln1* は胚発生の極めて初期の段階に出現した。受胎後 48 時間で *tln1* は頭蓋顔面に強く出現して、72 時間までに上顎と下顎に分かれた。ここから、*tln1* が頭蓋顔面構造の発達に重要な役割を果たしていると考えられた。
- (2) *tln1* の欠損が頭蓋顔面の軟骨と骨格筋に異常を引き起こした。具体的には、*tln1* 欠損変異体の軟骨染色において、*tln1* の欠損がメッケル軟骨の著しい未発達と口蓋の短縮を引き起こすことが観察された。
- (3) 頭蓋顔面の筋肉は全ての型において確認されたが、*tln1* 欠損変異体では異なる筋肉構造の間の緊張が増加した。また、変異体における頭蓋顔面の骨格筋ではサルコメア構造の破壊が観察された。

(4) *tln1* 欠損変異体の口蓋形成において CNCC の増殖への影響がみられた。CNCC は運動・増殖・細胞死を行うことにより頭蓋顔面軟骨（特に口蓋）を形成するが、*tln1* の欠損において口蓋の短縮がみられた。*tln1* 欠損変異体においても細胞運動と細胞死のプロセスに異常はみられなかったが、Pulse chase 法において *tln1* 欠損変異体で CNCC 増殖に異常がみられた。また、Edu 法において *tln1* 欠損変異体の口蓋における増殖細胞は野生型の口蓋に比べて 50% 近く減少した。ここから、*tln1* 欠損変異体の CNCC 増殖における異常が変異体の口蓋短縮に影響していると考察された。

tln1 は腎臓・心臓・血管系の発達段階においてインテグリンが仲介する細胞的事象で重要な役割を果たすとされてきたが、頭蓋顔面形成における *tln1* の役割はこれまで明らかにされてこなかった。本研究によって、*tln1* が頭蓋顔面の軟骨の形成と骨格筋の維持に不可欠であり、口蓋形成における CNCC 増殖に *tln1* の機能が必要であることが分かった。

頭蓋顔面の発達における *tln1* の遺伝学的必要性が示されたことから、ヒトにおける *TLN1* 変異の表現型と口腔顔面裂奇形を関連づけることが可能と考えた。今後の遺伝子シーケンシング技術の向上によって頭蓋顔面の発達に重要な遺伝子の機能が整理できれば、さらなる病態の理解や早期診断につながると期待される。