

[ 別紙 2 ]

## 審査の結果の要旨

氏名 五十嵐 瞳

マウスの初期発生では、E3.5に細胞は内細胞塊 (inner cell mass; ICM) と栄養外胚葉に分化する。ICM において原始内胚葉へと分化した細胞からは、E4.5 に壁側内胚葉 (parietal endoderm; PE) と臓側内胚葉 (visceral endoderm; VE) の2種類の胚体外内胚葉が形成される。PE と VE の境界部分は Marginal Zone と呼ばれ、VE から PE への細胞の移動があることが示唆されている。また、E11.5以降、胚体外内胚葉は胎盤側へ陥入し、胎盤内卵黄嚢 (intraplacental yolk sac; IPYS) を形成する。

PE と VE には、*Sox* (Sex-Determining Region on the Y chromosome-related High Mobility Group box) 遺伝子ファミリーの *Sox7* と *Sox17* が発現することが知られている。*Sox7* と *Sox17* は、*Sox18* とともに *SoxF* グループに分類される。*SoxF* グループの遺伝子は胚性内胚葉や心臓、血管の形成に重要であり、相補して機能することが知られている。*in vitro* での解析から、*Sox7* と *Sox17* は胚体外内胚葉の分化や維持に関与することが予想されるが、*in vivo* での解析は十分行われていない。そこで、本研究では *SoxF* グループの遺伝子の胚体外内胚葉における *in vivo* での発現パターンを詳細に解析し (第1章)、*Sox17* 欠損胚と *Sox7* 欠損胚の表現型解析を行った (第2章)。

<第1章> *SoxF* グループ遺伝子の胚体外内胚葉における mRNA の発現を *in situ hybridization* により解析し、*Sox18* の発現はみられないことを明らかにした。次に、SOX17 と SOX7 タンパク質の E7.5 から E18.5 までの局在パターンを免疫染色により解析した。このとき、胚体外内胚葉の構造を維持したまま解析するため、子宮全体を固定する子宮全載法を用いた解析を行った。SOX17 は E7.5 から E18.5 まで PE と placental VE (IPYS) での局在が維持された。一方で、SOX7 は E8.5 以降、胚体外内胚葉での局在が減少した。したがって、E8.5 から妊娠後期まで、*Sox17* が placental VE と PE で重要な機能を担うことが示唆された。

<第2章> *Sox17* 欠損 (*Sox17*<sup>-/-</sup>) 胚と *Sox7* 欠損 (*Sox7*<sup>-/-</sup>) 胚の胚体外内胚葉における表現型解析を行った。E9.5 の *Sox17*<sup>-/-</sup> 胚の VE 基部の細胞数は増加し、PE 側に拡大した。さらに、この拡大した領域では、VE マーカーである HNF4 $\alpha$ 、E-Cadherin (VE の細胞接着因子)、リン酸化エズリン-ラディキシン-モエシン (VE の微絨毛構成タンパク質) の局在が上昇し、

PE マーカーである GATA6 の局在が減少した。なお、*Sox7*<sup>-/-</sup>胚における VE、PE マーカーの局在に異常はみられなかった。したがって *Sox17*<sup>-/-</sup>胚の placental VE では上皮化が進行しており、*Sox17* は placental VE での上皮化を制御することが示唆された。

また、PE においては、*Sox17*<sup>-/-</sup>胚では細胞密度が減少し、細胞増殖率が低下した。なお *Sox7*<sup>-/-</sup>胚では PE の細胞密度に異常はみられなかった。また正常胚の PE 細胞は球形であるが、*Sox17*<sup>-/-</sup>胚の PE 細胞は複数の突起を伸ばす形態異常を示した。さらに *Sox17*<sup>-/-</sup>胚の PE 細胞のタイムラプス撮影により、*Sox17*<sup>-/-</sup>胚の PE 細胞の移動速度が低下していることが明らかとなった。したがって、*Sox17* は PE において細胞増殖、細胞形態の維持と運動性に関与すると考えられた。

さらに、*Sox17*<sup>-/-</sup>胚の VE を培養した結果、正常胚では VE 細胞において、PE マーカーである GATA6 の局在がみられたが、*Sox17*<sup>-/-</sup>胚では GATA6 が局在する細胞領域が減少していた。したがって、*Sox17* は VE から PE への転換に関与する可能性が考えられた。

本研究では *in vivo* で胚体外内胚葉について位置関係を維持した状態で解析した結果、*Sox17* と *Sox7* の発現パターンを詳細に解析することが可能となり、E8.5 以降は *Sox17* が単独で機能することを見出した。さらに、*Sox17*<sup>-/-</sup>胚の胚体外内胚葉での表現型を初めて解析することが可能となり、*Sox17* が VE の上皮化と PE の細胞増殖、細胞形態および運動性、VE から PE への転換に関与することを明らかにした。これらの研究成果は、農学学術上貢献するところが少なくない。よって、審査委員一同は本論文が博士（農学）の学位論文として価値あるものと認めた。