

学位論文

Doctor's Thesis

Danforth's short tail マウスの原因遺伝子座近傍に位置する

椎間板発生に必要であるマウス新規遺伝子 *Sickle tail* (*Skt*) の解析

(A novel murine gene, *Sickle tail* (*Skt*), linked to the *Danforth's short tail* (*Sd*) locus, is required for normal development of the intervertebral disc.)

仙波 圭

Senba Kei

熊本大学大学院医学研究科博士課程
外科系専攻整形外科学

指導：高木 克公 教授

山村 研一 教授

2005年度

Danforth's short tail マウスの原因遺伝子座近傍に位置する椎間板発生に必要なマウス新規遺伝子 *Stickle tail* (*Sk1*) の解析

仙波 圭
2005年度

Danforth's short tail マウスの原因遺伝子座近傍に位置する椎間板発生に

必要であるマウス新規遺伝子 *Sickle tail* (*Skt*) の解析

(A novel murine gene, *Sickle tail* (*Skt*), linked to the *Danforth's short tail* (*Sd*) locus,

is required for normal development of the intervertebral disc.)

目次

①要旨

- 1) 学位論文の骨格となる参考 *tail* 遺伝子と変異マウスの解析

⑤実験方法

- 1) 変異マウスの作製
- 2) 骨格標本の作製
- 3) DNA と cDNA のクローニング
- 4) RT-PCR 法
- 5) ノーザンブロット法
- 6) 組織内における β -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) 活性の検出
- 7) *Skt* 発現ベクターの作成とトランスフェクション法
- 8) ウェスタンブロット法による解析
- 9) 免疫染色法

⑥実験結果

- 1) *Sickle tail* 変異マウスの作製
- 2) トラップベクター挿入部位の同定

- 3) *Sickle tail* 遺伝子の同定
- 4) RT-PCR 法、ノザンブロット法解析
- 5) *Skt^{Gt}* マウスにおける脊椎の形成と β -*geo* 遺伝子の発現解析
- 6) *Skt^{Gt/Gt}* と *Sd* 変異成体マウスにおける組織学的解析
- 7) 抗 *Skt* 抗体を使用した *Skt* 蛋白解析
- 8) *Et14^{lacZ}*、*Sd* と *Skt* の関係について

⑦考察

- 1) *Skt* 遺伝子の構造、発現パターン、機能について
- 2) *Skt^{Gt}*、*Et14^{lacZ}*、*Sd* 変異マウスの関係

⑧結語

⑨参考文献

要旨

【目的】脊椎椎間板髄核は胎生期の脊索より発生する。これまで、椎間板髄核の形成に関与する遺伝子はいくつか報告がなされているが、その形成メカニズムについて十分理解されているとはいえない。今回、ジーントラップ法により、マウスにおいて椎間板髄核の発生に必要である脊索及び椎間板髄核特異的に発現する新規遺伝子*Sickle tail* (*Skt*)を同定し、その挿入変異マウスの表現型を解析したので報告する。

【方法】ES細胞を用いたジーントラップ法により得られたマウス新規遺伝子*Skt*の遺伝子構造及び発現パターンを調べた。同時にトラップした遺伝子の挿入変異マウスを作製し、その表現型を調べた。

【結果】ジーントラップ法により同定した新規遺伝子*Skt*は、胎生期では脊索及び中腎、成体では、椎間板髄核特異的に発現していることがわかった。そのトラップベクターによる挿入変異により得られた成体のホモ接合体変異マウス (*Skt*⁶ⁱ) は、尾椎において椎間板髄核の縮小及び消失、並びに椎間板線維輪の形態異常を示した。また、興味深いことに、*Skt*遺伝子の遺伝子座を調べたところ、自然発生で得られた尾椎の大半が消失し、全脊椎椎間板髄核が消失する、

いまだその原因遺伝子が単離されていない *Danforth's short mouse* (*Sd*) の原因遺伝子座が近傍にあることがわかった。その遺伝的距離を交配による組み換え率の結果により調べた所、トラップベクター挿入位置と *Sd* 原因遺伝子座の遺伝的距離は 0.95cM であることがわかった。*Sd*、*Skt*^{6t} のダブル変異マウスを交配にて作成したところ、その表現型はより重篤になり、より上位の尾椎が減少する表現型を示した。

【考察】 *Skt* 遺伝子が示す胎生期及び成体内での発現パターンとその遺伝子変異で示された表現型解析により、*Skt* 遺伝子が椎間板の発生に関与している事が示された。また、椎間板の線維輪と髄核の発生は別々の器官より発生するが、*Skt* 変異マウスの解析結果では、髄核の発生異常により線維輪の発生にも影響を与えることが考えられた。*Skt* 遺伝子は *Sd* 原因遺伝子座の近傍に位置していたが、*Sd* 遺伝子座と *Skt* 遺伝子は遺伝的に分離ができることより対立遺伝子とは考えられなかった。*Sd* の原因遺伝子と *Skt* 遺伝子は、そのダブル変異マウスの表現型解析より相互作用していることが示唆された。

【結論】我々は、脊索、椎間板髄核に特異的に発現するマウス新規遺伝子、*Skt* を同定した。その挿入変異マウスの表現型解析により *Skt* 遺伝子は椎間板の発

生に関与していることに加えて、*Skt* 遺伝子はその遺伝子座近傍に位置する *Sd*

との原因遺伝子とともに脊椎形成に関与していると考えられた。

ABSTRACT

We established the mutant mouse line, B6;CB-*Skf*^{GtAyu8021MEG} (*Skf*^{Gt}), through gene-trap mutagenesis in embryonic stem cells. The novel gene identified, called *Sickle tail* (*Skf*), is composed of 19 exons and encodes a protein of 1352 amino acids. Expression of a reporter gene was detected in the notochord during embryogenesis and in the nucleus pulposus of mice. Compression of some of the nuclei pulposi in the intervertebral discs (IVDs) appeared at embryonic day (E) 17.5, resulting in a kinky-tail phenotype showing defects in the nucleus pulposus and annulus fibrosus of IVDs in *Skf*^{Gt/Gt} mice. These phenotypes were different from those in *Danforth's short tail* (*Sd*) mice in which the nucleus pulposus was totally absent and replaced by peripheral fibers similar to those seen in the annulus fibrosus in all IVDs. The *Skf* gene maps to the proximal part of mouse chromosome 2, near the *Sd* locus. The genetic distance between them was 0.95 cM. The number of vertebrae in both [*Sd* +/+ *Skf*^{Gt}] and [*Sd* *Skf*^{Gt}/+ +] compound heterozygotes was less than that of *Sd* heterozygotes. Furthermore, the enhancer trap locus *Et14*^{lacZ}, which was

previously reported to be an allele of *Sd*, was located in the third intron of the *Skf* gene.

学位論文の骨格となる参考論文①関連論文および、

参考論文②その他の論文のリスト

参考論文

①関連論文

1. Semba K, Araki K, Li Z, Matsumoto K, Suzuki M, Nakagata N, Takagi K, Takeya M, Yoshinobu K, Araki M, Imai K, Abe K, and Yamamura K.
A novel murine gene, *Sickle tail (Skt)*, linked to the *Danforth's short tail (Sd)* locus, is required for normal development of the intervertebral disc
Genetics. 2005 Oct. 3 (in press)

②その他の論文

1. Noguchi H, Kaname T, Sekimoto T, Senba K, Nagata Y, Araki M, Abe M, Nakagata N, Ono T, Yamamura K, Araki K.
Naso-maxillary deformity due to frontonasal expression of human transthyretin gene in transgenic mice.
Genes Cells. 7(10):1087-98. 2002

2. Nitta Y, Yoshida K, Satoh K, Senba K, Nakagata N, Peters J, Cattanach

BM.

Spontaneous and radiation-induced leukemogenesis of the mouse small eye mutant, Pax6(Sey3H).

J Radiat Res. 45(2):245-51. 2004

謝辞

熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野において、熊本大学大学院医学研究科・臓器形成分野・山村研一教授と同整形外科学講座・高木克公前教授の御指導の下、本研究を行いました。多くのご指導を頂き、深く感謝致します。

また、熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野・荒木喜美助教授と熊本大学遺伝子実験施設・荒木正健助教授には、日々の実験研究から論文作成まで幅広い御助言を頂きました。熊本大学動物資源開発研究センター・資源開発分野・中潟直己教授には凍結受精卵の移植に御協力頂き、技術開発分野・鈴木操助教授にはトランスジェニックマウス作製において御協力頂きました。熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野・実験補助員の中田三千代さんには実験に際して御協力を頂きました。また熊本大学発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野、熊本大学医学部整形外科学講座の皆様には有形無形の多くの御協力、御支援を受けました。

心より感謝致します。

略語一覧

a. a. : Amino acid ; アミノ酸

cDNA : Complementary DNA

cM : Centimorgan ; センチモルガン

Da : Dalton

DNA : Deoxyribonucleic acid ; デオキシリボ核酸

E : Embryonic day

ES cell : Embryonic stem cell

Etl14^{lacZ} : The enhancer trap line-4^{lacZ}

HE : Haematoxylin & eosin staining.

MOPS : 3-(N-morpholino) propanesulfonic acid

PBS : Phosphate-buffered saline

PCR : Polymerase chain reaction ; ポリメラーゼ連鎖反応

RNA : Ribonucleic acid ; リボ核酸

RT-PCR : Reverse transcriptase - Polymerase chain reaction

Sd : Danforth's short tail マウス

Sk1 : Sickie tail 遺伝子

Sk1^{ct} : B6;CB-Sk1^{GtAyu8021 IMEG}

X-P : X-ray photograph

5'RACE : 5' rapid amplification of cDNA ends

3'RACE : 3' rapid amplification of cDNA ends

研究の背景と目的

1) 遺伝子トラップ法の背景

ヒトゲノムプロジェクトが完了して5年が経過した。他種生物のゲノムプロジェクトも同時に進められ、各種ウイルス、大腸菌、酵母、線虫、マウス、ラット、チンパンジーなどは既に解読されている。しかし、遺伝子の塩基配列、アミノ酸配列が明らかになったとしても、その遺伝子、タンパクの役割が明らかになるわけではない。ゲノムプロジェクトなどにより得た情報を有益なものとするには、まずその遺伝子、タンパクの機能を知らなければならない。そのために、遺伝子機能の解析に突然変異体を利用することは、大腸菌、酵母、ショウジョウバエからマウス、ヒトまで種を問わず有用な手段である。特にヒトにおける遺伝子機能解析には、同じ哺乳類であり実験動物としての遺伝学的データが蓄積されたマウスの利用が重要になってくる。これらの変異体の中には興味深い表現型を示すものが含まれており、その変異遺伝子を同定することで哺乳類の生体機能に重要な遺伝子を単離することができる。マウスにおいては胚操作技術と胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞) の開発により、相同組み換えを利用したいわゆる標的遺伝子組み換えによりノックアウトマウス

が作出可能である (Capecchi, 1989)。ノックアウトマウスの作製は、既知遺伝子の解析には都合がよいが、次々と明らかになるすべての遺伝子についてノックアウトマウスを作出することは不可能である。遺伝子トラップ法は標的遺伝子組み換えを行う技術を基礎に開発され、効率よく変異体を作成すると同時に遺伝子の単離も容易に行うことができる。ES 細胞において、ある遺伝子座にベクターが挿入されることにより変異が起き、その遺伝子座がベクターのレポーター遺伝子で標識されることが遺伝子トラップの本質的な原理である。そのベクターが挿入された ES 細胞クローンからマウスを作成すると、変異がベクターにより標識されているため、そのマウスが変異をヘテロにもつものかホモにもつものか容易に解析できるので、胚性致死変異の解析にも適応できる。つまり遺伝子トラップを大規模に行うことで、標的遺伝子組み換えによるノックアウトマウス作成よりも効率的に変異マウスを樹立でき、またレポーター遺伝子による標識を利用して、ポジショナルクローニングよりも簡単に遺伝子を単離できる。

2) 遺伝子トラップ法の歴史

哺乳類に遺伝子トラップ法を最初に応用したのは Gossler らである (Gossler,

1989)。彼らはショウジョウバエで行われていたエンハンサートラップ法をマウスに応用した。レポーター遺伝子として *lacZ* を用い、マウスヒートショックプロテイン *hsp68* のプロモーターを用いたベクターでエンハンサートラップ法を、プロモーター無しのスプライスアクセプターを用いたベクターでプロモータートラップを行った。樹立したトラップクローンから7ラインのキメラマウスを作製し、それぞれに *lacZ* の発現がみられることを確認し、マウスで遺伝子トラップが可能であることを示した。

また Friedrich らは様々なベクターの改良を行い、*lacZ*、*neo*、*geo*、レトロウイルスを組み合わせた6種類のトラップベクターでプロモータートラップを行った (Friedrich, 1991)。プロモーターを持たない *geo* とスプライスアクセプターとの組み合わせ ES 細胞で発現している遺伝子を効率よくトラップできることが示唆された。日本でも竹内らがプロモーターを持たない *neo* と IRES を応用したベクターを用い、*jyumonji* という遺伝子を単離した (Takeuchi, 1995)。その変異マウスは神経管形成不全を示し、*jyumonji* 遺伝子の発現パターンとも完全に一致した。我々の教室 (臓器形成分野) ではスプライスアクセプター、プロモーターを持たない β -*geo*、IRES の組み合わせに加え、genomic DNA

回収を効率よく行う目的に Cre-loxP システムを応用したトラップベクター、pU-3, pU-8, pU-17, pU-21 を用いて遺伝子トラップを行い、それにより各種変異マウスラインを樹立している (<http://egtc.jp/show/index> にて公開)。

現在、世界各国で大規模なジーントラップ法を用いた遺伝子解析、それに続いて遺伝子変異マウスを用いた表現型解析が行われている。我々が今までに用いてきたトラップベクターにおいて、*β-geo* を用いることで X-gal 染色によりその発現を容易に検出でき、スプライスアクセプター、IRES、*β-geo* を組み合わせたトラップベクターを用いることで、その挿入部位より下流の遺伝子機能を破壊することができる。現在、我々が使用しているトラップベクターは、gain of function mutation を可能にするために、変異 lox-Cre システムを適用している (Araki, 1999 & 2005)。この変異 lox-Cre システムを導入したトラップベクターを用いた機能獲得による遺伝子機能解析を可能としたシステムを、可変型遺伝子トラップ法と名付け、変異マウスラインを産出し、特に興味深いレポーター遺伝子の発現パターン、表現型を呈したマウスラインを中心に解析を進行させている。

3) 脊索と脊椎、椎間板の発生

胚性期において脊索は脊椎形成において体節、神経管のパターン形成においてシグナルセンターとして重要な役割をもつ(Ang and Rossant 1994; Wilson *et al.* 1995; Chiang *et al.* 1996)。加えて、脊索は中軸骨格：脊椎形成の中心的な役割を持つ。E10.5-11.5、脊索の誘導が腹側体節より椎板に分化する。椎板は脊索、神経管の周囲に移動し脊索、神経管を取り囲むように連続して分節化していない脊索周辺に筒状構造を形成する。その後、中軸中胚葉は密な尾側領域、疎な頭側領域で分節状パターンを形成する。E12.5 から E15.5 の間に、密な領域の一部は頭側移動し椎間板線維輪を形成する。椎間板線維輪は線維性の外側部と軟骨性の内側部より形成される。残った密な領域は疎な尾側領域と融合し、椎体原基の軟骨を形成する。椎体内にある脊索細胞は椎間板領域へ移動する(Theiler 1988; Aszodi *et al.* 1998; Rufai *et al.* 1995)。脊索細胞は増殖し椎間板の中心に椎間板髄核と呼ばれるゼラチン質の組織を形成するため肥大してくる。その後、この椎間板髄核は軟骨性の椎間板線維輪内側組織と線維性の椎間板線維輪外側組織により取り囲まれる。これら2つの組織により椎間板が形成される(Langman 1969)。成体において、この椎間板髄核は中軸骨格の機械的負荷に対するショック吸収機能としての役割を持つ(Inoue and

Takeda 1975)。脊椎の異常は体節、脊索、神経管の異常により引き続き起こされる。しかし、椎間板形成に関するメカニズムについてまだほとんどわかっていない。

4) *Danforth's short tail* マウスと *Et14^{lacZ}* マウス

これまで、中軸骨格形成に関して、脊椎発生に異常を呈する変異体（図表 1）、椎間板発生に異常を呈する変異体（図表 2）や、脊椎形成に関係する多くの遺伝子（図表 3）がマウスにおいて報告されている。

その中で、*Danforth's short tail* (*Sd*) やエンハンサートラップラインである *Et14^{lacZ}* といった変異マウスが報告されている。*Sd*, located 変異マウスは中軸骨格と泌尿器系の発生に異常を持つ自然発生により得られた semi-dominant 変異マウスである (Dunn *et al.* 1940)。その原因遺伝子座はマウス chromosome 2 の近位部に位置している事がわかっている (Lane and Birkenmeier 1993; Alfred *et al.* 1997)。早期胚において脊索細胞の減少による椎板の形成異常を来し、椎体数の減少を引き起こす。脊索の構造も縮小、断片化し、成体における尾椎の減少による尻尾の短縮といった表現型を呈する。ホモ接合体の *Sd* はヘテロ接合体よりその表現型は重篤な尾椎の短縮と、出生

図表 1

脊椎異常を呈するマウス報告年 : mutation name(略語)、(報告者)

1930 : <i>Pudgy</i> (<i>pu</i>) (Mohr)	1963 : <i>Curly Tail</i> (<i>ct</i>)
1933 : <i>Flex-Tail</i> (<i>f</i>) (Hunt)	(Gruneberg)
1934 : <i>Shaker Short-Tail</i> (<i>sst</i>)	1963 : <i>Loop Tail</i> (<i>Lp</i>)
(Dunn)	(Gruneberg)
1935 : <i>T</i> (Chesley)	1963 : <i>Splotch</i> (<i>Sp</i>) (Gruneberg)
1940 : <i>Danforth's short tail</i> (<i>Sd</i>)	1963 : <i>Congenital Hydrocephalus</i>
(Dunn)	(<i>ch</i>) (Gruneberg)
1942 : <i>Screw-Tail</i> (<i>sc</i>)	1969 : <i>Porcine Tail</i> (<i>pc</i>)
(MacDowell)	(MacNutt)
1947 : <i>Undulated</i> (<i>un</i>) (Wright)	1973 : <i>Urogenital Syndrom</i> (<i>us</i>)
1951 : <i>Hook</i> (<i>Hk</i>) (Holman)	(Lane)
1952 : <i>Bent-Tail</i> (<i>Bn</i>)	1974 : <i>Rachiterata</i> (<i>rh</i>)
(Garber, Gruneberg)	(Varnum and Stevens)
1954 : <i>Tail-Kinks</i> (<i>Tk</i>)	1975 : <i>Amputated</i> (<i>am</i>) (Green)
(Gruneberg)	1975 : <i>Malformed Vertebrae</i> (<i>Mv</i>)
1956 : <i>Crooked Tail</i> (<i>Cd</i>)	(Theiler)
(Theiler)	1985 : <i>Rib-Vertebrae</i> (<i>rv</i>)
1956 : <i>Fused</i> (<i>Fu</i>)	(Theiler and Varnum)
(Theiler and Gluecksohn)	1996 : <i>Rbt</i> (<i>Rabo torcido</i>)
1956 : <i>Kinky</i> (<i>Ki</i>)	(Hustert)
(Theiler and Gluecksohn)	1997 : <i>Knotty tail</i> (<i>Knt</i>) (Matsuura)
1959 : <i>truncate</i> (Theiler)	2000 : <i>Tail-short Shionogi</i> (<i>Tss</i>)
1958 : <i>Diminutive</i> (<i>dm</i>)	(Tsukahara)
(Stevens and Mackensen)	2001 : <i>Loop-Tail</i> allele (<i>Lp</i> ^{<i>MIJus</i>})
1960 : <i>Rib Fusion</i> (<i>Rf</i>)	(Kiber)
(Mackensen and Stevens)	2005 : <i>scoliosis</i> (<i>sco</i>) (Adham)
1961 : <i>Tail-Short</i> (<i>Ts</i>) (Deol)	

図表 2

脊椎椎間板形成に異常を呈する原因遺伝子（報告年、報告者）

<i>Pax1/9</i>	(1988, Deutsch; 1995, Neubuser; 1995, Peters; 1995, Ebensperger)
<i>Sox5/Sox6</i>	(2003, Smith)
<i>Jun</i>	(2003, Behrens)
<i>Col2a1</i>	(1998, Aszodi)
<i>Col9a1</i>	(1996, Kimura)
<i>Epiphycan/Biglyca</i>	(2005, Hুরুkawa)

図表 3

脊椎形成に関する遺伝子(報告年、報告者)

<i>Bmp5</i> (1999, Solloway)	<i>Meox1</i> (1993, Mankoo)
<i>Brachury</i> (1991&1996, Herrmann)	<i>Mesp1</i> (1996, Saga)
<i>Cer1</i> (1998, Biben)	<i>Mesp2</i> (1997, Saga)
<i>Dll1</i> (1995, Bettenhausen)	<i>Notch1</i> (1992, Reaume)
<i>Dll3</i> (1997, Dunwoodie)	<i>Notch2</i> (1995, Williams)
<i>EphA2</i> (2001, Naruse-Nakajima)	<i>Paraxis</i> (1996, Burgess)
<i>EphA4</i> (1992, Nieto)	<i>Pax1&9</i> (1988, Deutsch; 1995, Neubuser; 1995, Peters; 1995, Ebensperger)
<i>Fgf8</i> (1999, Solloway)	<i>PS1</i> (1997, Wang)
<i>Fgfr1</i> (1992, Yamaguchi)	<i>Rbpsuh</i> (1992, Smith)
<i>Foxc1</i> (1993, Sasaki)	<i>Sna</i> (1992, Smith)
<i>Foxc2</i> (1996, Kaestner, 1999, Furumoto)	<i>Shh</i> (1996, Chiang)
<i>Hes1</i> (2000, Jouve)	<i>Tbx6</i> (1996, Chapman)
<i>Hes5</i> (1997, Pompa)	<i>Tbx18</i> (2001, Kraus)
<i>Hnf3β</i> (1993, Ang)	<i>Tcf15</i> (1995, Burgess)
<i>Hox</i> cluster	<i>Terra</i> (1999, Meng)
<i>Jag1</i> ()	<i>Twist</i> (1995, Fuchtbauer; 1997, Gitelman)
<i>Lfng</i> (1998, Zhang)	<i>Uncx4.1</i> (1997, Mansouri)
<i>Lmo4</i> (1998, Kenny)	<i>Wnt3a</i> (1994, Takada; 1997, Yoshikawa)
<i>Ltap</i> (2001, Kiber)	

後 24 時間以内に泌尿器系の異常が原因で死亡する。これまで *Pax8* (Koseki *et al.* 1993)、*Notch1* (Swiatek *et al.* 1994) は *Sd* の原因遺伝子候補として考えられた時期があったが遺伝研究の結果より除外された。*LacZ* 遺伝子をレポーター遺伝子として持つエンハンサートラップライン、*Et14^{lacZ}* が *Sd* の原因遺伝子座近傍に挿入されている事が報告された。その *Et14^{lacZ}* は、そのレポーター遺伝子が脊索、中腎中胚葉、apical ectoderm ridge に発現する (Korn *et al.* 1992; Maatman *et al.* 1997; Zachgo *et al.* 1998)。*Et14^{lacZ}* のホモ接合体の表現型は kinky tail を呈し、*Sd* 変異マウスとの交配実験により相乗作用を示す事が観察された。遺伝的に *Et14^{lacZ}* は *Sd* と 0.75 cM 離れていたが、興味深い事に染色体位置関係が *cis* と *trans* によりその *Sd* マウスの表現型に対する作用が違ってくる事が示された (すなわち、*Et14^{lacZ}* が *Sd* と *cis* の染色体位置を持つ場合には *Sd* の表現型は軽くなり、*Et14^{lacZ}* が *Sd* と *trans* の染色体位置を持つ場合には *Sd* の表現型は重篤になる)。このことは、*Et14^{lacZ}* は *Sd* 原因遺伝子の *cis* 制御領域をトラップしている事が示唆され、*Sd* 変異は gain-of-function mutation であることが強く示された (Zachgo *et al.* 1998)。しかし、この *cis* 領域、およびトラップされている遺伝子は同定されていない。

5) Sickie tail 遺伝子と変異マウスの解析

今回の研究で、我々は ES 細胞を使用したジーントラップ法により得られた新しい変

異マウスを報告する。この変異マウスは椎間板の異常により尾椎において kinky tail を呈するため *Skt^{6t}* と命名した。我々はこの *Skt^{6t}* がトラップしている遺伝子を同定することに成功した。胚性期に脊索、中腎に発現し、成体では脊索の遺残である椎間板髄核に発現するこの同定した遺伝子を *Sickle tail (Skt)* と名付けた。興味深いことに *Skt* 遺伝子はマウス染色体 2 番の近位、特に *Sd* の原因遺伝子座の近傍に位置していることがわかった。加えて、*Et14^{lacZ}* のトラップベクターの挿入位置は *Skt* 遺伝子の第 3 番イントロンに挿入されていることがわかった。*Skt^{6t}* と *Sd* 変異マウスの交配実験を行った所、*Sd* の表現型が相加的に重篤になった。今回の研究は、可変型遺伝子トラップ法により得られた胚性期に脊索、成体の椎間板髄核で特異的に発現するマウス新規遺伝子 *Sickle tail*、加えて *Skt* 変異マウス、*Skt* 遺伝子座の近傍に位置する *Sd* マウスとの関係を調べたのでその解析結果を報告する。

実験方法

1) 変異マウスの作製

pU-8 トラップベクターを用いたジーントラップ法は荒木等により報告されている (Araki *et al.* 1999)。ジーントラップクロンの ES 細胞と ICR (Charles River) の桑実胚を用いたアグリゲーション法によりキメラマウスを作製し、C57BL/6 (CLEA) の雄と交配し F1 ヘテロ接合体を得た。Danforth's short tail (*Sd*) マウスはジャクソン研究所 (Bar Harbor, ME, USA) より購入し、胚移植により繁殖させた。*Sd* +/+ *Skt*^{Gt} マウスは *Sd* +/+ + マウス (C57BL/6 genetic background) と C57BL/6 genetic background を持つ *Skt*^{Gt/Gt} マウスと交配させる事により作製した。これにより、*Sd* 変異と *Skt*^{Gt} 変異が同一染色体に位置しているマウス [*Sd Skt*^{Gt} /+ +; *cis* configuration] を 1 匹得る事が出来た。*Sd* マウスは外観にてその genotype を判断し、*Skt*^{Gt} は genome PCR 法にて genotyping をした。wild-type allele の検出に *Skt* 遺伝子の 14 番目イントロンに位置する GTS プライマー (5'- CCACCCCTACATGTGTCTTT -3') と GTA プライマー (5'- CGAGTAAGTAACATCCCTCC -3') を使用し、これにより 339bp の PCR 産物を得る事により検出することができた。trapped allele の検出には Z1 プライマー (5'- GCGTTACCCAACTTAATCG -3') と Z2 プライマー (5'- TGTGAGCGAGTAACAACCCG -3') を使用し、これにより 320bp の PCR 産物を得る事により検出することができた。

2) 骨格標本の作製

尾椎の骨格標本を作成するためアリザリンレッド染色を施行した。尾部の皮膚を剥がし95%エタノールにより3日間固定した。1日間1% KOHにより組織をきれいにした後、アリザリンレッド染色を1日間骨が赤く染色されるまで施行した。続いて、2% KOHで過剰なアリザリンレッド色素を除去しグリセロールに置換した(Hogan *et al.* 1994)。マウス脊椎の椎体数を同定するため X-P 検査を施行した。我々は *Sd* 変異マウスの椎体数を決定する場合、明らかな異常を示さない椎体を正常とした(その際、わずかな大きさの変化は考慮しなかった)。

3) DNA と cDNA のクローニング

プラスミドレスキュー法によりトラップベクターが挿入された周辺の genomic DNA を回収する事が出来た(Araki *et al.* 1999)。5' rapid amplification of cDNA ends 法(5' RACE)システム (Invitrogen, Carisbad, CA)を用いて 5' RACE によりトラップした遺伝子の cDNA の一部を同定する事が出来た。Sepasol-RNA I (NACALAI TESQUE, Kyoto, Japan)を用いて B6:CB-Skt^{GtAyu80211MEG} gene-trapped ES より total RNA を抽出した。poly A (+) RNA の精製には oligo dT column (TAKARA BIOMEDICALS, Shiga, Japan)を使用した。逆転写酵素、ReverScript (Wako, Osaka, Japan)とトラップベクター内にあるスプライスアクセプター配列に設置した SA13 プライマー (5' - TCTGAAACTCAGCCTTGAGC-3')

を使用し、poly A(+) RNA1 µg より First strand cDNA を生成した。terminal deoxynucleotidyl transferase (Invitrogen)を使用して dCTP tailing を施行し、生成した cDNA を QIAquick Nucleotide Removal Kit (QIAGEN)を用いて精製した。最初の PCR はスプライスアクセプター配列に設置した SA10 プライマー(5'-AGCAGTGAAGGCTGTGCCA -3') と アンカープライマー (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTACGGGiiGGGiiGGGiiG -3') (Invitrogen, Carisbad, CA)を使用し施行した。nested PCR は#63 プライマー (5'-GCTTGTCCTCTTTGTTAGGG-3') と アンカープライマー内にある配列に設置した amplification プライマー (5'-GGCCACGCGTCGACTAGTAC-3') を使用し施行した。増幅された PCR 産物の配列確認は Big Dye Terminator Cycle Sequencing (Perkin Elmer, Foster City, CA)を使用したダイレクトシーケンス法にて施行した。

4) RT-PCR 法

Thermoscript RT-PCR システム(Invitrogen)を用いて RT-PCR 法を施行した。Skt 遺伝子内に a—f のセンス、アンチセンス合わせて6種類のプライマーを設定した。各々のプライマー配列は、プライマーa, 5'-TCACCATGAAGATGCTGGAG-3'; p プライマーb, 5'-CTACAGTAAGCACTCGCTGAC-3';プライマーc, 5'-ACTCCTCAGCCTTGATGAAC-3';プライマーd, 5'-GTGGTGTAAGTCCTGATCC-3';プライマーe, 5'-GCCACCTTAAAGACACTAGG-3';プライマーf, 5'-TGAGGAGGAAGAGGTAGTAG-3' とした。PCR 法の条件は Taq polymerase 0.5 units 使

用し、94° 1 min, 55° 2 min, 72° 2 min 30 サイクルとした。

5) ノザンプロット法

ノザンプロット法は、ES 細胞、胚、成体各臓器より抽出した total RNA と poly A (+) mRNA と、0.7% の MOPS 付加変性アクリルアミドアガロースゲルと positively charged ナイロンメンブラン (Roche) を使用して施行した。ベーキングは 80° 1 時間施行後、プレハイブリ施行し DIG RNA Labeling and Detection Kit (Roche) によりラベルした *Skt* 遺伝子特異的 RNA プローブと *lacZ* RNA プローブ (Roche) にてハイブリダイゼーションを施行した。

6) 組織内における β -ガラクトシダーゼ (*lacZ*) 活性の検出

Allen 等 (1988) の方法により Whole-mount X-gal 染色を施行した。サンプルは固定液 (1% formaldehyde, 0.2% glutaraldehyde, and 0.02% NP-40 in phosphate-buffered saline (PBS)) にて室温にて 0.5 時間固定後、PBS にて 2 回洗浄する。その後、X-gal 染色液 (5 mM potassium ferricyanide, 5 mM potassium ferrocyanide, 2 mM MgCl₂, 0.5% X-gal in PBS) にて 30° にて overnight で染色した。その後、2 回 PBS で洗浄し、4% paraformaldehyde にて後固定を施行した。透明化のため、エタノールステップ (25%, 50%, 70% 100% and 100%, それぞれ 1 時間反応) にて脱水後、benzylalcohol/benzylbenzoate (1:2) により検体を透明化した。成体の組織は 4% paraformaldehyde in PBS にて固定後、

10 μm の切片を作成し X-gal 染色液にて 30°にて overnight で染色した。X-gal 染色後、ファーストレッドによりカウンター染色を施行した。椎間板の組織標本を作成するため Whole-mount X-gal 染色を施行した検体を 3.7% formaldehyde/PBS にて組織を固定し、Plank - Rychlo 溶液にて脱灰した。通常の手技にてパラフィン包埋後、8 μm の厚さの切片にて組織標本を作成しファーストレッドによりカウンター染色を施行した。

7) *Skt* 発現ベクターの作成とトランスフェクション法

Skt 遺伝子の open reading frame (ORF) 全長を決定するために Thermoscript RT-PCR システムを用いた RT-PCR 法を施行した。*Skt* 遺伝子の開始コドンの上流に設置した ORFS1 プライマー (5' - ACCGGAGTGGAGACTAGTTG-3') と、終止コドンの下流に設置した ORFA1 プライマー (5' -TGCATGAGGCCTTGAACGATACAG -3') を使用して、初回 RT-PCR を施行した。続いて、nested PCR を同様に設置した ORFS2 プライマー (5' - TTTCTGCGAGCTTCCGAAC - 3')、ORFA2 プライマー (5' - ACCTTGCTCCTAATAGGATCTGGC-3') を使用して施行した。PCR 条件は、LA Taq polymerase (TAKARA BIOMEDICALS, Shiga, Japan) を使用し、94° 1 min, 58° 1 min, 72° 3 min で 25 サイクル施行した。この条件により 4.1 kb の PCR 産物を得る事が出来たため、pGEM-T vector (Promega, Madison, WI) にサブクローニングした。この cDNA の ORF を sequencing により配列が内在性の配列とすべて一致していることを確認後、この full ORF を持つ cDNA を pCAGGS expression vector (Niwa *et al.* 1991) に

挿入した。この *Skt* 遺伝子強制発現ベクターを LipofectAMINE Reagent (Invitrogen) を使用したリポフェクション法により BMT10 培養細胞 (Gerard and Gluzman 1985) にトランスフェクションを施行した。

8) ウェスタンブロット法

BMT10 培養細胞と成体マウスの尾椎椎間板髄核 40 椎間板分を 2×サンプルバッファ (100 mM Tris HCl pH 6.8, 4% SDS, 12% β -mercaptoethanol, 20% glycerol) にてホモジナイズした。蛋白抽出物を 6.0% のポリアクリルアミドゲルにて泳動後、ナイロンメンブラン (Immobilon, MILLIPORE) へトランスファーし、抗 *Skt* 抗体と ECL detection system (Amersham, Arlington Heights, IL) を使用してシグナルを検出した。

9) 免疫染色法

椎間板の組織標本作成のため尻尾を 4% paraformaldehyde in PBS で固定後、0.24 M EDTA·2Na, 0.22 M EDTA·4Na 溶液にて 48 時間かけて脊椎を脱灰した後、パラフィン包埋した。椎間板の組織標本を抗 *Skt* 抗体と Enzyme Immunoassays, Hybridoma Screening and Western Blots (Vector Laboratories, Burlingame, CA) を使用したアビジン-ビオチン複合体法により免疫染色を施行した。カウンター染色としてヘマトキシリン染色を施行した。

実験結果

1) *Sickle tail* 変異マウスの作製

トラップ ES クローンは pU-8 トラップベクターを使用したジーントラップ法により作製された (Araki *et al.* 1999)。得られた 8 つのキメラマウスのうち 3 マウスラインがジャームラインキメラであった。ヘテロ接合体マウスは外観上特に異常を認めず、fertile であった。そのホモ接合体マウスの約半数 (35/66) が kinky tail を示した (Figure 1A and Table 1)。尻尾の表現型を *Sickle tail* (*Skt*) と命名し、その変異マウスラインを B6:CB-*Skt*^{GtAyu8021IMEG} と命名した。この変異マウスは出生後 2 週間より 20th-25th 尾椎に局限した表現型を示し、尾椎が短縮、彎曲する (Figure 1B)。それと対照的に *Sd* ヘテロ接合体変異マウスは尻尾が平均第 6 番尾椎まで短縮する (Figure 1B and 7A)。XP 検査を施行したが、*Skt*^{Gt/Gt} 変異マウスは他の骨格に特に異常を認めなかった (data not shown)。

2) トラップベクター挿入部位の同定

トラップベクター挿入部位の情報を得るために、トラップベクター挿入部位周辺に隣接する genomic DNA を回収した。トラップベクターの配列をプローブとし、*Skt*^{Gt} マウスより抽出した DNA を用いて施行した Southern blot 法解析により、*Skt*^{Gt} ラインはトラップベクターは 1 つのみ挿入されている事がわかった。トラップベクター挿入に際し

て *Sk^{t6i}* ラインの genomic DNA は、挿入部位において 3 bp 欠失したのみであることがわかった (data not shown)。これらの情報により genomic DNA を使用した PCR 法によりヘテロ接合体同士を交配させて得られた仔の genotype ができるようになった。

3) *Sickle tail* 遺伝子の同定

Sk^{t6i} ラインがどんな遺伝子をトラップしているか調べるために、5' RACE 法と 3' RACE 法を施行した。それらの配列と 100%ホモロジーを持つ expressed-sequence tags (EST) の配列と組み合わせたところ open reading frame (ORF) をもつ配列であることがわかった。この配列は 5930 (accession number: AB125594) の塩基数を持ち、1352 amino acids、147 kDa の蛋白をコードしている事がわかった (Figure 2A)。この遺伝子の名前を *Sk^t* と命名した。Lupas's algorithm (Lupas and Dyke 1991) を使用してこの蛋白の持つモチーフ、ドメインを予想したところ、N 端近辺に proline-rich 領域 (amino acid residues 298-364) 、中央部に coiled-coil 領域 (amino acid residues 626-656) を持つ事がわかった。ATG コドンのポジションは 559-561 番目にあった。この ATG コドンの周辺に Kozak 配列 (Kozak 1996) を持っていた。すなわち、ATG コドンの直下に G、3 塩基上流に A を持っていた。BLAST サーチにて *Sk^t* cDNA はまだ、解析が十分されていないヒト蛋白、*KIAA 1217* (accession number AB033043) 配列と 80.6% のホモロジーを有していた。*Sk^t* cDNA 配列を The public Mouse Genome Resources

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/mouse/>)にて比較した所、*Skf* 遺伝子は 300 kb のゲノム領域に 19 エクソンより構成されており、その第 2 番エクソンに ATG コドンが位置していた (Figure 2B)。トラップベクターは *Skf* 遺伝子の第 14 番イントロンに挿入されており *Skf* 蛋白の 998 アミノ酸配列以下を欠失させていた (Figure 2A and B、矢頭)。*Skf^{Gt}* 変異マウスの転写物解析より 2 つの転写産物が β -*geo* と融合配列を形成している事がわかった。1 つ目は *Skf* 遺伝子の 1st -14th エクソンをもつ *Skf*-a 配列と融合している配列であり、2 つ目は *Skf*-a 配列の第 13 番エクソンを 33 bp 欠失している *Skf*-b 配列と融合している配列であった (Figure 2B)。どのケースにおいても、*Skf^{Gt}* 変異 allele より産生される *Skf* 転写物は、C 端の 355 アミノ酸 (15th-19th エクソンを欠失する事で発生) が欠失する変異を起こしていた。

4) RT-PCR 法、ノザンブロット法解析

E10.5 の wild-type、*Skf^{Gt/Gt}* 胚 を使用して RT-PCR 法にて *Skf* 遺伝子の発現を調べた。トラップベクター挿入位置より上流にプライマー a, b を使用して RT-PCR 法に施行したところ両検体とも *Skf* 転写産物を検出できた (Figure 3A)。次に、トラップベクター挿入位置を挟んで上流、下流に設置したプライマー c, d を使用した RT-PCR と、トラップベクター挿入位置より下流に設置したプライマー e, f を使用した RT-PCR を施行しところ、*Skf^{Gt/Gt}* 胚のみ *Skf* 転写産物を検出できなかった (Figure 3B and C)。これより、*Skf^{Gt/Gt}*

胚では 15th-19th エクソンをもった *Skt* mRNA は欠失していることがわかった。*Skt* mRNA の大きさを調べるため、*Skt* 特異的プローブを使用してノザンブロット法を施行した (Figure 2B)。Figure 3D に示すように wild-type ES 細胞検体では 8-kb の major バンドと 6.5-kb の minor バンドを認めた。wild-type 胚では 8-kb と 6.5-kb バンドを認めたが、非常に弱いシグナルであった。驚く事にノザンブロット法解析では wild-type の成体における各臓器では 5.5-kb, 6.5-kb, 7.0-kb, 8.0-kb といった 4 つの大きさの違う mRNA が検出された。成体の脳組織では弱い 7.0-kb バンドと強い 6.5-kb バンドを認め、心臓組織では 7.0-kb と 5.5-kb のバンドを認め、精巣組織では 7.0-kb のバンドを認め、肺組織では 8.0-kb と 5.5-kb のバンドを認め、消化管組織では 8.0-kb のバンドを認めた (Figure 3D)。続いて、*Skt* 遺伝子と β -*geo* 配列の融合 mRNA を調べた (Figure 3E)。*Skt*^{Gt/+} ES 細胞を使用したノザンブロット法解析で、*Skt* と *lacZ* のプローブを使用し両方とも 10.5-kb の β -*geo* 配列の融合 mRNA を検出できた。しかし、内在性 *Skt* 転写産物と比較してそのシグナル強度は弱かった。*Skt*^{Gt/+}、*Skt*^{Gt/Gt} 成体の脳組織でも、*Skt* と *lacZ* のプローブの両方とも 10.5-kb、9.5-kb の β -*geo* 配列との融合 mRNA を検出でき、両者転写産物とも β -*geo* 配列と融合 mRNA を形成している事が示された (Figure 3E)。この結果は、*Skt* 遺伝子には alternative splicing variation が存在する事とトラップベクター挿入位置より上流でその splicing variation が発生している事が示された。

ノザンブロット法解析では、wild-type 成体の心臓組織では 7.0-kb、5.5-kb の 2 つの転写産物が存在することが示された。しかし、*Sk^t* 成体の心臓組織では *lacZ* プローブを使用したノザンブロット法解析で 9.5-kb バンドのみしか検出されなかった (data not shown)。この結果は、心臓組織では *Sk^t* 遺伝子はトラップベクター挿入位置より下流でその 7.0-kb と 5.5-kb 転写産物をつくり出す splicing variation をきたしている事を示している。ノザンブロット法解析では、*Sk^t* 遺伝子配列のもっとも大きい配列は 8-kb の大きさをもつ転写産物であり、実際クローニングした cDNA は 5930 塩基 (accession number: AB125594) で構成されている。この配列より翻訳される蛋白の大きさは 147-kDa であり、尾椎椎間板髄核組織より抽出蛋白で抗 *Sk^t* 抗体にて検出された内在性 *Sk^t* 蛋白の大きさとほぼ同じ大きさを示した (lane 4 in Figure 6A)。これより、メッセージの大きさとクローニングした cDNA 配列の大きさは違うが、*Sk^t* の full length ORF は、この 5930bp 配列の中にすべて入っていると考えている。8-kb mRNA は 5930 塩基の *Sk^t* cDNA に加えて 5'&3'側の UTR (untranslated region) にまだ同定されていない UTR 配列を持つことが推測される。今後の解析でその *Sk^t* 配列の未決定配列を調べる必要があるとなっている。

5) *Sk^t* マウスにおける脊椎の形成と β -*geo* 遺伝子の発現解析

Sk^t 早期胚より新生仔まで、脊椎発生を経時的に X-gal 染色を含めて組織学的解析

により調べた (E8.0, E8.5, E9.0, E9.5, E10.5, E11.5, E12.5, E13.5, E14.5, 15.5, E16.5, E17.5, E18.5, E19.5, 新生仔, 2-週齢仔)。E8.0 以前では、 β -geo 遺伝子は、胚で発現していません、chorion にのみ発現していた (Figure 4A)。E8.5 (Figure 4B)、E9.0 (Figure 4C) では、脊索でもっとも強く β -geo 遺伝子が発現していた。E11.5 胚においては、脊索と中腎に強く β -geo 遺伝子が発現していた (Figure 4D-F)。E11.5 胚組織における他組織での β -geo 遺伝子の発現は、epithalamus sulcus, roof of the neopallial cortex, lens vesicle, inner layer of retina, heart (atrium, ventricle), surface of hepatic primordium, infundibulum, surface ectoderm, hind gut, mesenchyme of the limb bud (data not shown) で認められた。 $Skf^{Gt/Gt}$ 胚は E16.5 まで脊椎、椎間板において特に異常は認めないが、E17.5 より尾椎椎間板のいくつかで wild type 胚 (Fig. 4G and H) で認めない 椎間板原基が押しつぶされた様な形態を示すようになる (Fig. 4I and J)。 $Skf^{Gt/Gt}$ の新生仔では、椎間板髄核における X-gal 陽性細胞は辺縁によってしまい椎体の並びが undulated になる (Figure 4M and N)。この時、椎間板のサイズは wild type と比べて小さくなっている。2-week-old $Skf^{Gt/Gt}$ マウスでは X-gal 陽性細胞は椎間板髄核内で辺縁によっており、椎間板髄核組織は小さくなり正常な椎間板を形成できていない (Figure 4Q and R)。 $Skf^{Gt/+}$ 胚、マウスでは特に異常を認めず、椎間板髄核組織内での X-gal 陽性細胞塊は椎間板の中心部に位置している (Figure 4G, K and O)。X-gal 染色は 5th-7th

尾椎以上における椎間板髄核組織でその染色強度は減弱するため、*Sk^t^{Gt/Gt}* における尾椎尖端の椎間板の表現型と尾椎がもっとも発現強度が強いといった *Sk^t* 遺伝子の発現部位と相関があるように示唆された。

6) *Sk^t^{Gt/Gt}* と *Sd* 変異成体マウスにおける組織学的解析

Sk^t^{Gt/Gt} 成体マウスでは、*β-geo* 遺伝子は corpus callosum in brain, uriniferous tubules in kidney, cardiac muscle, Sertoli's cells in testis, basal cells & outer root sheath of hair follicles in skin といった多くの組織で発現している (data not shown)。正常成体マウスでは、椎間板髄核組織は椎間板の中心部に位置している (Figure 5A, D, G and J)。しかし、*Sk^t^{Gt/Gt}* 変異マウスの尾椎では、細胞内の空胞形成が少なくなった椎間板髄核細胞が細胞塊を形成し、椎間板の辺縁に片寄っているのを認めた (Figure 5H and K)。しかし、上位椎間板髄核組織では明らかな異常を認めなかった (Figure 1B and E)。*Sd* 変異胚、新生仔の脊索、椎間板発生における組織学的解析は以前 Paavola (1980)、Theiler (1988) によりそれぞれ報告されているが、*Sd* 変異成体マウスにおける椎間板についての異常に関しての詳細はこれまで報告が無いため、*Sd*^{+/+} 変異マウスにおける全脊椎と椎間板の組織学的検査を施行した。驚く事に、*Sd* 変異成体マウスにおける椎間板髄核は全て消失しており、それに置き換わるように全脊椎の椎間板の中心は椎間板線維輪に似た線維組織により置き換わっていた (Figure 5C and F)。

僅かに尾椎椎間板において変性した椎間板髄核組織の遺残を認める個体もあった (Figure 5I and L)。*Skt^{Gt/Gt}* マウスは 20th-25th 尾椎に局限した kinky tail を呈する (Figure 1B) ことに加えて、正常マウスで椎間板において椎間板髄核、椎間板線維輪組織の境界は明瞭であるのに (Figure 5M and N)、*Skt^{Gt/Gt}* マウスでの 5th-25th 尾椎レベルの椎間板においては椎間板髄核、椎間板線維輪組織の境界が不明瞭になる (Figure 5O and P)。*Skt^{Gt/Gt}* マウスにおける椎間板髄核の異常に加えて椎間板線維輪の発生も線維輪の低形成による菲薄化、尾椎椎体への接着不良といった異常を呈する (Figure 5Q and R)。*Skt^{Gt/Gt}* 変異マウスでありながら、kinky tail を呈さないマウスにおいても同様な椎間板の異常を示すかどうか調べた (Table 1)。驚く事に、正常表現型を示した *Skt^{Gt/Gt}* 変異マウスにおいても全例、椎間板髄核の偏移と、椎間板線維輪の菲薄化といった異常を示し (Figure 5S)、その表現型は kinky tail を呈したマウスの表現型と同じであった (Figure 5Q and R)。10 世代 C57BL/6 へ交配し backcross しても、この椎間板の尾椎の表現型を認めた。以上より、*Skt^{Gt/Gt}* 変異マウスにおける表現型は椎間板における異常であり、これは、*Sd* マウスとは明らかに違う表現型である。

7) 抗 Skt 抗体を使用した Skt 蛋白解析

我々は抗 Skt 抗体を作成した。尾椎椎間板髄核組織より抽出した蛋白、CAG プロモーターにより BMT10 細胞に Skt 蛋白を強制発現させ得られた蛋白、作成した抗 Skt 抗体を

使用して施行した western blot 法解析により、予想された *Skt* 蛋白の大きさである 147-kDa とほぼ同じである 150-kDa の蛋白を検出する事が出来た。untreated BMT10 細胞、mock BMT10 細胞より抽出したサンプルからは、バンドの検出はされなかった (Figure 6A)。このことは *Skt* cDNA 内にある 559-561 番塩基の ATG、4615-4617 番塩基の TAA がそれぞれ *Skt* の開始コドン、終止コドンであるという予想と一致した。この事より、*Skt*^{Gt/+} マウスでは *Skt* 蛋白が減少しており、*Skt*^{Gt/Gt} マウスでは *Skt* 蛋白が検出以下に低下している事が推測された (Figure 6A)。この抗 *Skt* 抗体を使用して尾椎椎間板組織に対して免疫染色を施行した所、wild-type マウスの椎間板髄核細胞は染色陽性である (Figure 6B-a and c) が、*Skt*^{Gt/Gt} マウスの椎間板髄核細胞は染色陰性であった (Figure 6B-b and d)。その拡大図では主に椎間板髄核細胞の細胞質でその染色領域を認め、*Skt* 蛋白は細胞質に局在していることが示唆された。しかしながら、我々は *Skt* 蛋白に対する N 端検出用抗体を作成することが出来なかったため *Skt*^{Gt/Gt} マウス内で truncated 蛋白が作られているかどうか確認出来なかった。

8) *Et14*^{lacZ}、*Sd* と *Skt* の関係について

Skt 遺伝子の発現パターンと *Skt*^{Gt} mutant 変異マウスの表現型は *Et14*^{lacZ} 変異マウスの表現型と非常に似ている (Zachgo *et al.* 1998)。加えて、以前報告された *Et14*^{lacZ} トラップベクター挿入近傍の genome 配列情報より (Maatman *et al.* 1997)、*Et14*^{lacZ} トラ

ップベクターの挿入は *Skt* 遺伝子の第 3 イントロンである事がわかった (Figure 2B)。

また、*Et14^{lacZ}* トラップベクターと *Skt^{6t}* トラップベクターの挿入部位は 237 kb 離れていた。*Skt^{6t}* と *Sd* の遺伝的距離とその相互作用を調べるために、まず *Skt^{6t}* マウスと *Sd* マウスを交配し *trans* 型ダブルヘテロ接合体を得た [*Sd* +/+ *Skt^{6t}*; *trans* configuration]。これらの *trans* 型ダブルヘテロ接合体 [*Sd* +/+ *Skt^{6t}*; *trans* configuration] を wild-type マウスに交配させ、その組み替え率を調べる事で *Skt^{6t}* と *Sd* の遺伝的距離を解析した。

Table 2 で示すように、*trans* 型ダブルヘテロ接合体 [*Sd* +/+ *Skt^{6t}*; *trans* configuration] と wild-type (C57BL/6) マウスとの交配により 249 匹の仔の内、1 匹の *cis* 型ダブルヘテロ接合体 [*Sd Skt^{6t}* /+ +; *cis* configuration]、2 匹の wild-type マウスを得ることが出来た。このことは、*Skt^{6t}* と *Sd* が遺伝的に分離できることを示している。*cis* 型ダブルヘテロ接合体と wild-type マウスとの交配に実験を加え遺伝的距離を計算した所、*Skt^{6t}* と *Sd* の遺伝子座の遺伝的距離は 0.95 cM であった (Table 2)。*trans* もしくは *cis* configuration の染色体上の位置の違いにより *Skt^{6t}* が *Sd* ヘテロ接合体変異マウスの尾椎短縮への影響について調べるために、脊椎数カウント用に X-P 検査をそれぞれのグループで調べた。ヘテロ接合体 *Sd* [*Sd* +/+ +] マウス (n=22) の尾椎短縮の表現型はばらつきがあったが平均第 6 番尾椎まで尻尾が短縮していた (Figure 7A)。*trans* [*Sd* +/+ *Skt^{6t}*] (n=23)、*cis* [*Sd Skt^{6t}* /+ +] (n=10) のダブルヘテロ接合体はともに平均第 2-3 番

尾椎まで尻尾が短縮していた (Figure 7A)。加えて、 $[Sd Skt^{Gt} /+ Skt^{Gt}]$ 新生仔において、*trans* $[Sd +/+ Skt^{Gt}]$ 、*cis* $[Sd Skt^{Gt}/+ +]$ のダブルヘテロ接合体の表現型がより重篤になるか調べた。 $[Sd Skt^{Gt} /+ Skt^{Gt}]$ 新生仔の内、約 80% のマウスが出生後 48 時間で死亡し、出生後 2 週間以内で全マウスは死亡した。 $[Sd Skt^{Gt} /+ Skt^{Gt}]$ 新生仔をアルシアンブルー/アリザリンレッド染色にてその骨格標本を作成したところ $[Sd Skt^{Gt} /+ Skt^{Gt}]$ マウスは *trans* $[Sd +/+ Skt^{Gt}]$ 、*cis* $[Sd Skt^{Gt}/+ +]$ のダブルヘテロ接合体より脊椎が短縮し、平均第 4 番仙椎まで脊椎が短縮していた。このことは、 Skt^{Gt} 変異による *Sd* 表現型への加算的变化と考えられた。 Skt^{Gt} 変異による *Sd* 表現型への作用を病理学的に調べるため *Sd +/+ Skt^{Gt}* と *Sd Skt^{Gt} /+ +* 変異マウスの椎間板の表現型を組織学的比較をおこなった。椎間板における表現型は、*trans* $[Sd +/+ Skt^{Gt}]$ 、*cis* $[Sd Skt^{Gt}/+ +]$ のダブルヘテロ接合体両者とも *Sd +/+ +* 変異マウスの表現型と同じであった。つまり、椎間板髄核組織が完全に消失し、それに置き換わるように椎間板の中心は椎間板線維輪に似た線維組織により置き換わっていた (Figure 7B-a-h)。これらの結果は *Skt* の変異は *Sd* 変異マウスにおける椎間板の表現型には影響を与えないことを示している。加えて、E9.5、E13.5 の *trans* $[Sd +/+ Skt^{Gt}]$ 、*cis* $[Sd Skt^{Gt}/+ +]$ のダブルヘテロ接合体胚の間でその脊索における β -geo の発現パターンに相違を認めなかった (Figure 7C)。*trans* $[Sd +/+ Skt^{Gt}]$ 、*cis* $[Sd Skt^{Gt}/+ +]$ のダブルヘテロ接合体胚は E9.5 (Figure 7C-a and d)

でどちらとも脊索は細くなっていたが、X-gal 染色にて明確に脊索細胞は染色され、E13.5 (Figure 7C-b, c, e and f)での脊索の分断化においても、両ダブルヘテロ接合体胚の間に相違を認めなかった。このことは、*Sd* 変異により *Skf* の発現に影響を与えないことを示している。また、*Skf^{6t}* と *Sd* はその染色体位置の違いによっても表現型を変えないことを示している。

考察

我々は尾椎椎間板に異常をきたす劣性の表現型を呈する新しいジーントラップライン、B6;CB-Skt^{GtAyu8021IMEG}を作製した。トラップベクターはマウス第2染色体近位端に位置し、*Sickle tail* 遺伝子の第14番イントロンに挿入されていた。この遺伝子座は *Danforth's short tail* の原因遺伝子座近傍に位置していることがわかった。加えて、*Sd* の対立 allele と以前報告されたエンハンサートラップ法にて得られた *Et14^{lacZ}* のトラップベクターが *Sickle tail* 遺伝子の第3イントロンに挿入されていた。

1) *Skt* 遺伝子の構造、発現パターン、機能について

トラップにて得られた *Skt* 配列はジーントラップクローン ES 細胞より単離した。*Skt* 遺伝子は、N 末端部に proline-rich 領域 (298-364 a. a.)、中心部に coiled-coil ドメイン (626-656 a. a.) を持つ 1,352 アミノ酸よりなる蛋白をコードする 19 エクソンにより構成されている。proline-rich 領域は多くの蛋白で認められるがいまだその役割は解明されていないが、proline-rich 領域はチトクローム P450s の適正な折りたたみ構造に関して重要であることが示された (Kusano *et al.* 2001a; Kusano *et al.* 2001b)。よって *Skt* 蛋白の proline-rich 領域も蛋白構造の折りたたみにおいて似たような機能を持つのでは無いかと推測している。Crick、Pauling、Corey により 1952 年、1953 年

に報告されたように coiled-coil モチーフはケラチン、ミオシン、フィブリノーゲンといった線維性蛋白においてダイマー、ヘテロマー、3 重合体を形成する構造を提供する (Lupas, 1996)。それらはトロポミオシンといった制御構成体にスカフォールドを提供する。我々の解析では *Skt* 蛋白は細胞質に局在するため *Skt* 蛋白は制御構成体にスカフォールドを提供する構造蛋白では無いかと推測している。トラップベクターが *Skt* 遺伝子の第 14 番イントロンに挿入されており、*Skt* 蛋白の coiled-coil 領域、proline-rich 領域より下流に挿入されることで、トラップベクター内の β -geo 配列が *Skt-a*, *Skt-b* (*Skt-a* の第 13 番エクソンの 33bp が欠損) の 2 種類 *Skt* 配列と融合メッセージを作っていた (Figure 2B)。ノザンプロット法解析では wild-type allele より転写される内在性 *Skt* メッセージより trapped allele より転写される β -geo 配列との融合メッセージの転写量が少ないことがわかった。この *Skt* 変異マウスの表現型は劣性であるため、トラップベクターの挿入による変異はハイボモルフかヌル変異であり、ドミナントネガティブタイプ変異でないことが推測された。wild-type *Skt* allele より転写される RNA は 4 種類検出されたが、今後その 4 種類の転写物の機能を解明することが必要になるだろう。*Skt* 遺伝子の発現パターンは *Skt* 遺伝子の制御領域により制御されたレポーター遺伝子 β -geo の発現により Xgal 染色にてモニタリングすることが出来る。E11.5 では β -geo の発現は脊索、中腎に高い発現を認めた。*Et14^{lacZ}* ラインでは、*lacZ* レポーター遺伝子

は脊索、中腎の2つの組織で主に発現していた(Zachgo et al. 1998)。どちらのトラップラインでも E8.5 より脊索細胞で初めてその発現を認める。*Et14^{lacZ}* ラインでは、*lacZ* レポーター遺伝子の発現は E14.5 まで椎間板髄核の原基で発現を認めるが、新生仔、成体マウスではその発現を認めなかった。一方、*Sk1^{Gt}* ラインでは椎間板髄核でその発現が持続していた。この結果は *Et14^{lacZ}* がトラップしたエンハンサーは成体マウスにおける椎間板髄核での発現には十分機能していないことが推測される。*Sd* と *Sk1^{Gt}* マウスの表現型の比較をするため脊椎の組織標本を作成したところ、その組織像は違うものであった。*Et14^{lacZ}* マウスに関しては Zachgo et al. (1998)の論文による記載がないためその組織学的表現型は明確にされていない。以前の報告では *Sd* 変異マウスでは脊椎と泌尿器系の発生に異常を呈するため、paraxial、intermediate mesoderm の発生に *Sd* の原因遺伝子の機能があると推測された。加えて、*Sd* マウスは椎体、椎間板の両者に異常を呈する。*Sd* 変異マウスは胚性期 E9.5 より脊索の連続性が無くなり始め、成体マウスにおいて椎間板髄核組織が全てのレベルで完全に消失し、代わりに椎間板線維輪に似た線維組織により充填されていた。*Sd* は椎体数が減少し、尻尾が短縮するか、消失する表現型を示す。しかし、*Sk1^{Gt}* マウスは胚性期 E17.5 より尾椎の一部で椎間板髄核組織が圧壊し周辺部への脱出が発生する。出生前は、wild-type マウスと比較して *Sk1^{Gt}* マウスの椎間板髄核組織のサイズが縮小しているのが認められる。出生後は成体における

椎間板髄核組織は大きくなり、周辺部へ脱出したままになり、これにより kinky tail 表現型の原因となることがわかった。以上のことより、*Sd* 遺伝子は椎板、脊索を含んだ早期中胚葉の形成で作用するが、*Skf* 遺伝子は椎間板髄核の成長、肥大に関する後期発生において作用していることが推測される。これまでに報告された *Jun* コンディショナル変異胚 (Behrens *et al.* 2003)、*Sox5*^{-/-}/*Sox6*^{-/-} 変異胚 (Smits and Lefebvre 2003) における脊索異常を示す変異マウスで、多くのアポトーシスが脊索細胞で発生している事が示されたが、*Skf*^{Gt/Gt} 胚では胚性期 E16.5 から出生仔までの脊索細胞でアポトーシスを認める事は出来なかった。このことは、*Skf*^{Gt} マウスにおける椎間板髄核の圧壊、脱出、髄核細胞の減少が発生する原因が脊索細胞のアポトーシス発生ではないことを示唆している。構造強度を高くするために必要である coiled-coil ドメインを *Skf* 蛋白は含んでいるため、*Skf* 蛋白の減少した椎間板髄核細胞は機械的負荷に対する強度が現弱し、椎間板髄核組織の圧縮や辺縁への脱出をきたしたのであろう。椎間板髄核と椎間板線維輪は発生学的に違う器官より発生しているが、その2つの組織間での相互作用に関してはまだ十分明らかになっていない。*Sd* 変異胚は発生早期に脊索細胞は消失してしまう。Theiler (1988) は、*Sd* ヘテロ接合体マウスの新生仔では椎間板線維輪の形成は低下すると記載している。しかしながら、我々の成体の *Sd* 変異マウスの全脊椎における組織学的解析では椎間板線維輪の形成は低下していなかった。それどころか、出生後の成長

にしたがい椎間板髄核組織の消失した椎間板中心部は線維輪様組織で補われていることが観察された。対して、*Sk^t^{6t}* マウスでは椎間板線維輪は椎間板髄核組織の異常と共に観察された。組織の低形成をきたした椎間板線維輪は *Sk^t* 機能の異常により直接的に生じたのか、間接的に生じたのかわかっていない。

2) *Sk^t^{6t}*、*Et14^{lacZ}*、*Sd* 変異マウスの関係

我々の交配実験で *Sk^t* 遺伝子座と *Sd* 遺伝子座の遺伝的距離は 0.95 cM であった。以下の理由で我々は *Sk^t* 遺伝子が *Sd* 遺伝子ではないと考えている。最初の理由は、抗 *Sk^t* 抗体で検出できる *Sk^t* 遺伝子より作られた蛋白のサイズに関して、今回我々が同定した *Sk^t* 遺伝子の ORF より予想される蛋白のサイズより大きい蛋白が検出されていないことより *Sk^t* 蛋白をコードする遺伝子領域の ORF がこれ以上 *Sd* 候補遺伝子座へ拡大しないことを示している。第2の理由は、Zachgo *et al.* (1998)の報告で、*Sd* 変異は gain of function mutation であることが証明されているにもかかわらず、交配による *trans-cis* テストで *Sd* と *Sk^t^{6t}* が *trans-* もしくは *cis-* configuration にかかわらずその表現型が変化しなかったことである。*Sk^t^{6t}* 変異マウスの表現型は劣性変異を示すため、我々は *Sk^t^{6t}* 変異はハイポモルフかヌル変異であると予想している。*Sd* と *Sk^t^{6t}* が同一遺伝子であるなら、*Sk^t^{6t}* 変異を染色体位置で *trans-* もしくは *cis-* configuration の場合には、*Sd* 原因遺伝子の発現を低下し、その機能を現弱することが予想され、Zachgo *et al.*

(1998)の報告にもあるようにその2種類のダブル変異マウスの表現型に違いが生じることが予想される。つまり、*Skt* 遺伝子が *Sd* 原因遺伝子の一部であるなら、trans configuration ダブル変異マウスは cis configuration ダブル変異マウスより表現型が重篤になるはずである。しかしながら、実際には表現型の違いは認めなかった。

我々は *Et14^{lacZ}* の挿入部位が *Skt* 遺伝子の第3イントロンに挿入されていることを示した。興味深い事に *Hnf3 β* の node/notochord エンハンサー内にあるエレメントとして報告された consensus sequence-3 (CS3) と 93%のホモロジーを持つ配列が *Skt* 遺伝子の第4イントロン、*Et14^{lacZ}* の挿入部位の106 kb 下流に存在する事を認めた(Nishizaki et al. 2001)。*Et14^{lacZ}* マウスの発現パターン(Zachgo et al. 1998)は *Skt^{6t}* マウスの発現パターンと非常に似ており、また、その両者のホモ接合体が示す表現型：尾椎尖端に局限した kinky tail も同様であったため、*Et14^{lacZ}* のレポーター遺伝子も node/notochord consensus sequence-3 の制御下で発現していることが示唆された。Zachgo et al. (1998) は *Et14^{lacZ}* 挿入位置と *Sd* 変異部位との遺伝的距離は 0.75 cM であることを示し、*Et14^{lacZ}* が *Sd* 変異と cis 位置を示す時に *Sd* の持つ表現型を減弱させたと報告した。*Skt* 遺伝子の第4イントロンにある node/notochord consensus sequence-3 が *Sd* のエンハンサーであるなら *Et14^{lacZ}* が *Skt* 遺伝子の第3イントロンに挿入される事でそのエンハンサーの機能を減弱し、*Sd* の表現型を緩和したのかもしれない。*Skt* と *Sd* 蛋白の今後のさら

なる研究が、脊索細胞の発生と椎間板髄核細胞への分化のメカニズムの理解に重要な役割を持つだろう。

結語

今回の研究で、当大学・発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野で行っているジーントラップ法により作製した変異マウスの中で興味深い表現型、レポーター遺伝子の発現パターンを示す変異マウスラインを解析した。このマウスラインは、脊索、椎間板髄核に特異的に発現するマウス新規遺伝子 *Sickle tail* をトラップしており、同時に作製した変異マウスの解析により *Sickle tail* が脊索より椎間板発生に関する機能を持っていることを示すことが出来た。ジーントラップ法は未知の遺伝子の同定に極めて有用であり、同時にその変異マウスを作製し、その表現型解析をすることによりトラップした遺伝子の機能解析が出来うる事を今回の研究成果は示している。

Sickle tail 遺伝子の同定と、その変異マウスの作製により、脊索が胚性期早期に変性する自然発生で得られたいまだ原因遺伝子が不明である *Danforth's short tail* マウスの遺伝子座の近傍に *Sickle tail* 遺伝子の遺伝子座があることより、*Danforth's short tail* の原因遺伝子の解明にチャレンジすることができた。今迄の解析結果では、残念ながら *Danforth's short tail* マウスの原因を同定出来ていない。しかし、*Danforth's short tail* マウスの原因遺伝子と *Sickle tail* 遺伝子が相互作用をしている事を今回の研究で示す事が出来た。今後も *Sickle tail* 遺伝子と *Danforth's short tail* マウス解析を続けることにより、椎間板発生に関する *Sickle tail* 遺伝子のさらなる機能の解明とともに、*Danforth's short tail* マウスの原因解明をしていきたいと考えている。

結語

今回の研究で、当大学・発生医学研究センター・器官形成部門・臓器形成分野で行っているジーントラップ法により作製した変異マウスの中で興味深い表現型、レポーター遺伝子の発現パターンを示す変異マウスラインを解析した。このマウスラインは、脊索、椎間板髄核に特異的に発現するマウス新規遺伝子 *Sickle tail* をトラップしており、同時に作製した変異マウスの解析により *Sickle tail* が脊索より椎間板発生に関する機能を持っていることを示すことが出来た。ジーントラップ法は未知の遺伝子の同定に極めて有用であり、同時にその変異マウスを作製し、その表現型解析をすることによりトラップした遺伝子の機能解析が出来うる事を今回の研究成果は示している。

Sickle tail 遺伝子の同定と、その変異マウスの作製により、脊索が胚性期早期に変性する自然発生で得られたいまだ原因遺伝子が不明である *Danforth's short tail* マウスの遺伝子座の近傍に *Sickle tail* 遺伝子の遺伝子座があることより、*Danforth's short tail* の原因遺伝子の解明にチャレンジすることができた。今迄の解析結果では、残念ながら *Danforth's short tail* マウスの原因を同定出来ていない。しかし、*Danforth's short tail* マウスの原因遺伝子と *Sickle tail* 遺伝子が相互作用をしている事を今回の研究で示す事が出来た。今後も *Sickle tail* 遺伝子と *Danforth's short tail* マウス解析を続けることにより、椎間板発生に関する *Sickle tail* 遺伝子のさらなる機能の解明とともに、*Danforth's short tail* マウスの原因解明をしていきたいと考えている。

参考文献

- ADHAM, I. M., GILLE, M., GAMEL, A. J., REIS, A. AND DRESSEL, R. *et al.*, 2005 The scoliosis (*sco*) mouse: a new allele of *Pax1*. *Cytogenet Genome Res.* 111:16-26.
- ALFRED, J.B., K. RANCE, B. A. TAYLOR, S. J. PHILLIPS, C. M. ABBOTT *et al.*, 1997 Mapping in the region of *Danforth's short tail* and the localization of tail length modifiers. *Genome Research* 7: 108-117.
- ALLEN, N. D., D. G. CRAN, S. C. BARTON, S. HETTEL, W. REIK *et al.*, 1988 Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development. *Nature* 333: 852-855.
- ANG, S. and J. ROSSANT, 1994 *HNF-3 β* is essential for node and notochord formation in mouse development. *Cell* 78: 561-574.
- ARAKI, K., T. IMAIZUMI, T. SEKIMOTO, K. YOSHINOBU, J. YOSHIMUTA *et al.*, 1999 Exchangeable gene trap using the Cre/mutated lox system. *Cell Mol. Biol.* 45: 737-750.
- ASZODI, A., Chan, D., HUNZIKER, E., BATEMAN, J. F. and FASSLER, R., 1998 Collagen II is essential for the removal of the notochord and the formation of intervertebral discs. *J. Cell Biology* 143: 1399-1412.
- BEHRENS, A., J. HAIGH, F. MECHTA-GRIGORIOU, A. NAGY, M. YANIV *et al.*, 2003 Impaired intervertebral disc formation in the absence of *Jun*. *Development* 130: 103-109.
- BETTENHAUSEN, B., HRABE, D. A. M., SIMON, D., GUENET, J. L. AND Gossler, A., 1995 Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of *D111*, a murine gene closely related to *Drosophila Delta*. *Development.* 121:2407-2418.
- BIBEN, C., STANLEY, E., FABRI, L., KOTECHA, S. AND RHINN, M. *et al.*, 1998 Murine cerberus homologue mCer-1: a candidate anterior patterning molecule. *Dev Biol.*

194:135-151.

BURGESS, R., RAWLS, A., BROWN, D., BRADLEY, A. AND OLSON, E. N., 1996 Requirement of the *paraxis* gene for somite formation and musculoskeletal patterning. *Nature*. 384:570-573.

BURGESS, R., CSERJESI, P., LIGON, K. L. AND OLSON, E. N., 1995 *Paraxis*: a basic helix-loop-helix protein expressed in paraxial mesoderm and developing somites. *Dev Biol*. 168:296-306.

CAPECCHI, M. R., 1989 The new mouse genetics: altering the genome by gene targeting. *Trends Genet*. 5:70-76. Review.

CHESLEY, P., 1935 Development of the short-tailed mutant in the house mouse. *J Exp. Zool*. 70:429-459.

CHAPMAN, D. L., AGULNIK, I., HANCOCK, S., SILVER, L. M. AND PAPAIOANNOU, V. E., 1996 *Tbx6*, a mouse *T-Box* gene implicated in paraxial mesoderm formation at gastrulation. *Dev Biol*. 180:534-542.

CHIANG, C., Y. LITINGTUNG, E. LEE, K. E. YOUNG, J. CORDEN *et al.*, 1996 Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function. *Nature* 383: 407-413.

CLEMENTS, D., TAYLOR, H. C., HERRMANN, B. G. AND STOTT, D., 1996 Distinct regulatory control of the *Brachyury* gene in axial and non-axial mesoderm suggests separation of mesoderm lineages early in mouse gastrulation. *Mech Dev*. 56:139-149.

CRICK, F. H., 1952 Is alpha-keratin a coiled coil? *Nature* 170: 882-883.

DEOL, M. S., 1961 Genetical studies on the skeleton of the mouse XXVIII Tail short.

Proc. R. Soc. Lond. 155:78-95.

DEUTCH, U., DRESSLER, G. R. AND GRUSS. P., 1988 *Pax 1*, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. Cell. 53:617-625.

DUNN, L. C., S. GLUECKSOHN-SCHOENHEIMER¹ and V. BRYSON, 1940 A new mutation in the mouse affecting spinal column and urogenital system. J. Hered. 31: 343-348.

DUNN, L. C., 1934 A new gene affecting behavior and skeleton in the house mouse. Proc. Natl. Acad Sci. USA 20:230-232.

DUNWOODIE, S. L., HENRIQUE, D., HARRISON, S. M. AND BEDDINGTON, R. S., 1997 Mouse *D113*: a novel divergent *Delta* gene which may complement the function of other *Delta* homologues during early pattern formation in the mouse embryo. Development. 124:3065-3076.

EBENSPERGER, C., WILTING, J., BRAND-SABERI, B., MIZUTANI, Y. AND CHRIST, B. et al., 1995 *Pax-1*, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos. Anat Embryol (Berl). 191:297-310.

FRIEDRICH, G., SORIANO, P., 1991 Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice. Genes Dev. 5:1513-1523.

FUCHTBAUER, E. M., 1995 Expression of *M-twist* during postimplantation development of the mouse. Dev Dyn. 204:316-322.

FURUMOTO, T. A., MIURA, N., AKASAKI, T., MIZUTANI-KOSEKI, Y. AND SUDO, H. et al., 1999 Notochord-dependent expression of *MFH1* and *PAX1* cooperates to maintain the proliferation of sclerotome cells during the vertebral column development. Dev Biol. 210:15-29.

- GARBER, E. D., 1952 Bent-tail a dominant, sex-linked mutation in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38:876-879.
- GERARD, R. D. and Y. GLUZMAN, 1985 New host cell system for regulated simian virus 40 DNA replication. Molecular & Cellular Biology 5: 3231-40.
- GITELMAN, I., 1997 Twist protein in mouse embryogenesis. Dev Biol. 189:205-14.
- GOSSLER, A., A. L. JOYNER, J. ROSSANT and W. C. SKARNES, 1989 Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes. Science 244: 463-5.
- GREEN, E. L., 1975 Biology of the laboratory mouse. Dover, New York
- GRUNEBERG, H., 1953 Genetical studies on the skeleton of the mouse. VI. *Danforth's short-tail*. Journal of Genetics 51: 317-326.
- GRUNEBERG, H., 1954 Genetical studies on the skeleton of the mouse XV *Tail-kinks*. J Gen. 53:536-550.
- GRUNEBERG, H., 1958 Genetical studies on the skeleton of the mouse. XXII. The development of *Danforth's short-tail*. J. Embryol. Exp. Morphol. 6: 124-148.
- GRUNEBERG, h., 1963 The pathology of development. Blackwell Scientific, Oxford
- HERRMANN, B.G., 1991 Expression pattern of the *Brachyury* gene in whole-mount *TWis/TWis* mutant embryos. Development. 113:913-917.
- HOGAN, B., BEDDINGTON, R., COSTANTINI, F. and LACY, E., 1994 pp379-381. *Manipulating the Mouse Embryo: A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- HOLMAN, S. P., 1952 The *hook-tailed* mouse. A mutation in the mouse affecting the tail and the anus. J Hered. 42:305-306.

HUNT, H. R., MIXTER, R. AND PERMER, D., 1933 *Flexed-tail* in the mouse *Mus musculus*.
Gen. 18:335-366.

HUSTERT, E., SCHERER, G., OLOWSON, M., GUENET, J. L. AND BALLING, R., 1996 *Rbt (Rabo torcido)*, a new mouse skeletal mutation involved in anteroposterior patterning of the axial skeleton, maps close to the *Ts (tail-short)* locus and distal to the *Sox9* locus on chromosome 11. Mamm Genome. 7:881-885.

INOUE, H. AND TAKEDA, T., 1975 Three-dimensional observation of collagen framework of lumbar intervertebral discs. Acta Orthop Scand. 46:949-56.

KAESTNER, K. H., BLECKMANN, S. C., MONAGHAN, A. P., SCHLONDRFF, J. AND MINCHEVA, A. *et al.*, 1996 Clustered arrangement of *winged helix* genes *fkh-6* and *MFH-1*: possible implications for mesoderm development. Development. 122:1751-8.

KENNY, D. A., JURATA, L. W., SAGA, Y. AND GILL, G. N., 1998 Identification and characterization of *LMO4*, an *LMO* gene with a novel pattern of expression during embryogenesis. Proc Natl Acad Sci U S A. 95:11257-11262.

KIBER, Z., UNDERHILL, D. A., CANONNE-HERGAUX, F., GAUTHIER, S. AND JUSTIS, M. J. *et al.*, 2001 Identification of a new chemically induced allele (*Lp^{mlJus}*) at the *loop-tail* locus: morphology, histology, and genetic mapping. Genomics. 72:331-337.

KIBER, Z., VOGAN, K. J., GROULX, N., JUSTICE, M. J. AND UNDERHILL, D. A. *et al.*, 2001 *Ltap*, a mammalian homolog of *Drosophila Strabismus/Van Gogh*, is altered in the mouse neural tube mutant *Loop-tail*. Nat Genet. 28:251-5.

Jouve C, Palmeirim I, Henrique D, Beckers J, Gossler A, Ish-Horowicz D, Pourquie O. Notch signalling is required for cyclic expression of the hairy-like gene HES1

in the presomitic mesoderm. *Development*. 2000 Apr;127(7):1421-9.

KORN, R., M. SCHOOR, H. NEUHAUS, U. HENSELING, R. SONININEN *et al.*, 1992 Enhancer trap integrations in mouse embryonic stem cells give rise to staining patterns in chimaeric embryos with a high frequency and detect endogenous genes. *Mech. Dev.* 39: 95-109.

KIMURA, T., NAKATA, K., TSUMAKI, N., MIYAMOTO, S., MATSUI, Y. *et al.*, 1996 Progressive degeneration of articular cartilage and intervertebral discs. An experimental study in transgenic mice bearing a type IX collagen mutation. *Int Orthop.* 20:177-81.

KOZAK, M., 1996 Interpreting cDNA sequences: some insights from studies on translation. *Mammalian genome* 7: 563-574.

Kraus F, Haenig B, Kispert A. Cloning and expression analysis of the mouse T-box gene *Tbx18*. *Mech Dev.* 2001 Jan;100(1):83-6.

KUSANO, K., N. KAGAWA, M. SAKAGUCHI, T. OMURA and M. R. WATERMAN, 2001a Importance of a proline-rich sequence in the amino-terminal region for correct folding of mitochondrial and soluble microbial p450s. *J. Biochem.* 129: 271-277.

KUSANO, K., M. SAKAGUCHI, N. KAGAWA, M. R. WATERMAN and T. OMURA, 2001b Microsomal p450s use specific proline-rich sequences for efficient folding, but not for maintenance of the folded structure. *J. Biochem.* 129: 259-269.

LANE, P.W. and C.S. BIRKENMEISER, 1993 Urogenital syndrome (*us*): a developmental mutation on chromosome 2 of the mouse. *Mammalian genome* 4: 481-484.

LANE, P. W., 1973 In: *Mouse News Letter* 49:32

LANGMAN. J., 1969 Vertebral Column, pp. 134-135 in *Medical Embryology*, edited by

The Williams & Wilkins Company, Baltimore.

LUPAS, A., 1996 Coiled coils: new structures and new functions. Trends in Biochemical Sciences 21: 375-382.

LUPAS, A. and M. VAN Dyke, 1991 Stock J. Predicting coiled coils from protein sequences. Science 252: 1162-4.

MAATMAN, R., J. ZACHGO and A. GOSSLER, 1997 The Danforth's short tail mutation acts cell autonomously in notochord cells and ventral hindgut endoderm. Development 124: 4019-4028.

MAC DOWELL, E. C., POTTER, J. S., LOANES, T. AND WARD, E. N., 1942 The manifold effects of the screw tail mouse mutation. J Hered. 42:305-306.

MAC NUTT, W., 1969 Developmental anomalies associated with the portine (pr) gene in the mouse. Anat. Rec. 163:340(ab).

MACKENSEN, J. A. AND STEVENS, L. C., 1960 Rib fusions, a new mutation in the mouse. J Hered. 51:264-268.

MANKOO, B. S., SKUNTZ, S., HARRIGAN, I., GRIGORIEVA, E. AND CANDIA, A. *et al.*, 2003 The concerted action of *Meox* homeobox genes is required upstream of genetic pathways essential for the formation, patterning and differentiation of somites. Development. 130:4655-64.

MANSOURI, A., YOKOTA, Y., WEHR, R., COPELAND, N. G. AND JENKIS N. A. *et al.*, 1997 Paired-related murine *homeobox* gene expressed in the developing sclerotome, kidney, and nervous system. Dev Dyn. 210:53-65.

MATSUURA, T., NARAMA, I., OZAKI, K., NISHIMURA, M. AND IMAGAWA, T. *et al.*, 1998 Developmental study on reduction and kinks of the tail in a new mutant *knotty-*

tail mouse. *Anat. Embryol.* 198:91-99.

MENG, A., MOORE, B., TANG, H., YUAN, B. AND LIN, S., 1999 A *Drosophila* *doublesex-related* gene, *terra*, is involved in somitogenesis in vertebrates. *Development.* 126:1259-1268.

MOHR, O. L. AND WRIGHT, C., 1930 Short spine, a new recessive lethal in cattle. *J Genet.* 22:179-297.

NARUSE-NAKAJIMA, C., ASANO, M. AND IWAKURA, Y., 2001 Involvement of *EphA2* in the formation of the tail notochord via interaction with *ephrinA1*. *Mech Dev.* 102:95-105.

NEUBUSER, A., KOSEKI, H. AND BALLING, R., 1995 Characterization and developmental expression of *Pax9*, a *paired-box-containing* gene related to *Pax1*. *Dev Biol.* 170:701-716.

NIETO, M. A., GILARDI-HEBENSTREIT, P., CHARNAY, P. AND WILKINSON, D. G., 1992 A receptor protein tyrosine kinase implicated in the segmental patterning of the hindbrain and mesoderm. *Development.* 116:1137-1150.

NISHIZAKI, Y., K. SHIMAZU, H. KONDOF, and H. SASAKI. 2001 Identification of sequence motifs on the node/notochord enhancer of *Foxa2* (*Hnf3 β*) gene that are conserved across vertebrate species. *Mech. Dev.* 102: 57-66.

NIWA, H., K. YAMAMURA and J. MIYAZAKI. 1991 Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108: 193-200.

PAAVOLA, L. G., D. B. WILSON and E. M. CENTER, 1980 Histochemistry of the developing notochord, perichordal sheath and vertebrae in *Danforth's short-tail (Sd)* and normal C57BL/6 mice. *J. Embryol. Exp. Morph.* 55: 227-245.

PAULING, L. and R. B. COREY, 1953 Compound helical configurations of polypeptide chains: structure of proteins of the alpha-keratin type. *Nature* 171: 59-61.

PETERS, H., WILM, B., SAKAI, N., IMAI, K. AND MAAS, R. *et al.*, 1999 *Pax1* and *Pax9* synergistically regulate vertebral column development. *Development* 126:5399-408.

PETERS, H., DOLL, U. AND NIESSING, J., 1995 Differential expression of the chicken *Pax-1* and *Pax-9* gene: in situ hybridization and immunohistochemical analysis. *Dev Dyn.* 203:1-16.

POMPA, J. L., WAKEHAM, A., CORREIA, K. M., SAMPER, E. AND BROWN, S. *et al.*, 1997 Conservation of the Notch signalling pathway in mammalian neurogenesis. *Development.* 124:1139-1148.

REAUME, A. G., CONLON, R. A., ZIRNGIBL, R., YAMAGUCHI, T. P. AND ROSSANT, J. 1992 Expression analysis of a *Notch* homologue in the mouse embryo. *Dev Biol.* 154:377-87.

RUFAL, A., M. BENJAMIN, and J. R. RALPHS, 1995 The development of fibrocartilage in the rat intervertebral disc. *Anat. Embryol.* 192: 53-62.

SAGA, Y., HATA, N., KOBAYASHI, S., MAGNUSON, T. AND SELDIN, M. F. *et al.*, 1996 , *Mesp1*: a novel basic helix-loop-helix protein expressed in the nascent mesodermal cells during mouse gastrulation. *Development.* 122:2769-2778.

SAGA, Y., HATA, N., KOSEKI, H. AND TAKETO, M. M., 1997 *Mesp2*: a novel mouse gene expressed in the presegmented mesoderm and essential for segmentation initiation. *Genes Dev.* 11:1827-1839.

SASAKI, H. AND HOGAN, B. L., 1993 Differential expression of multiple *fork head related* genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development.* 118:47-59.

SMITS, P. and V. LEFEBVRE, 2003 *Sox5* and *Sox6* are required for notochord extracellular matrix sheath formation, notochord cell survival and development of the nucleus pulposus of intervertebral discs. *Development* 130: 1135-1148.

SMITH, D. E., FRANCO, A. F. AND GRIDLEY, T., 1993 Isolation of *Sna*, a mouse gene homologous to the *Drosophila* genes *snail* and *escargot*: its expression pattern suggests multiple roles during postimplantation development. *Development*. 116:1033-1039. Erratum in: *Development* 1993 117:precedi.

SOLLOWAY, M. J. AND ROBERTSON, E. J., 1999 Early embryonic lethality in *Bmp5*;*Bmp7* double mutant mice suggests functional redundancy within the 60A subgroup. *Development*. 126:1753-1768.

STEVENS, L. C. AND MACKENSEN, J. A., 1958 The inheritance and expression of a mutation in the mouse affecting blood formation, the axial skeleton, and body size. *J Hered.* 49:153-160.

TAKADA, S., STARK, K. L., SHEA, M. J., VASSILEVA, G. AND MCMAHON, J. A., 1994 *Wnt-3a* regulates somite and tailbud formation in the mouse embryo. *Genes Dev.* 8:174-89.

TAKEUCHI, T., YAMAZAKI, Y., KATOH-FUKUI, Y., TSUCHIYA, R., KONDO, S. *et al.*, 1995 Gene trap capture of a novel mouse gene, *jumonji*, required for neural tube formation. *Genes Dev.* 15:1211-1222.

TANIWAKI, T., HARUNA, K., Nakamura, H., Sekimoto, T. Oike, Y. *et al.*, 2005 Characterization of an exchangeable gene trap using pU-17 carrying a stop codon-beta geo cassette. *Dev Growth Differ.* 47:163-172.

THEILER, K., 1956 Storungen der Ursegmentbildung durch mutierte Gene bei der Hausmaus. *Arch Julius Klaus-Stiftung* 31:285-290.

- THEILER, K. AND GLUECKSOHN-WAELSCH, S., 1956 The morphological effects and the development of the *fused* mutation in the mouse. *Anat. Rec.* 125:83-104.
- THEILER, K., 1959 Anatomy and development of the "truncate" (*boneless*) mutation in the mouse. *Am. J Anat.* 104:318-344.
- THEILER, K., VARNUM, D. S., SOUTHARD, J. L. AND STEVENS, L. C., 1975 Malformed vertebrae: A new mutant with the "Wirbel-Rippen Syndrom" in the mouse. *Anat. Embryol.* 147:161-166.
- THEILER, K. AND VARNUM, D. S., 1985 Development of rib-vertebrae: a new mutation in the house mouse with accessory caudal duplications. *Anat. Embryol.* 173:111-116.
- THEILER, K. 1988 Vertebral malformations. *Advances in Anatomy, Embryology & Cell Biology* 112: 1-99.
- TSUKAHARA, K., HIRASAWA, T. AND MAKINO, S., 2000 *Tss* (*Tail-short Shionogi*), a new short tail mutation found in the BALB/cMs strain, maps quite closely to the *Tail-short* (*Ts*) locus on mouse chromosome 11. *Exp Anim.* 49:131-135.
- VARNUM, D. S. AND STEVENS, L. C., 1974 *Rachiterata*: A new skeletal mutation on chromosome 2 of the mouse. *J Hered.* 65:91-93.
- WILLIAMS, R., LENDAHL, U. AND LARDELLI, M., 1995 Complementary and combinatorial patterns of *Notch* gene family expression during early mouse development. *Mech Dev.* 53:357-368.
- WRIGHT, M. E., 1947 *Undulated*: a new genetic factor in *Mus musculus* affecting the spine and tail. *Hered.* 1:137-141.
- WILSON, V., L. MANSON, W. C. SKARNES and R. S. BEDDINGTON, 1995 The *T* gene is

necessary for normal mesodermal morphogenetic cell movements during gastrulation.

Development 121: 877-886.

WONG, P. C., ZHENG, H., CHEN, H., BECHER, M. W. AND SIRINATHSINGHI, D. J. *et al.*, 1997 *Presenilin 1* is required for *Notch1* and *DIII* expression in the paraxial mesoderm. Nature. 387:288-292.

YAMAGUCHI, T. P., CONLON, R. A. AND ROSSANT, J., 1992 Expression of the fibroblast growth factor receptor *FGFR-1/flg* during gastrulation and segmentation in the mouse embryo. Dev Biol. 152:75-88.

YOSHIKAWA, Y., FUJIMORI, T., MCMAHON, A. P. TAKADA, S., 1997 Evidence that absence of *Wnt-3a* signaling promotes neuralization instead of paraxial mesoderm development in the mouse. Dev Biol. 183:234-42.

ZACHGO, J., R. KORN and A. GOSSLER, 1998 Genetic interactions suggested that *Danforth's short tail (Sd)* is a gain-of-function mutation. Developmental genetics 23: 86-96.

ZHANG, N. AND GRIDLEY, T., 1998 Defects in somite formation in *lunatic fringe*-deficient mice. Nature. 394:374-377.

古川孝志、伊藤和生、奴賀賢、萩野利彦、Magnus Hook *et al.*, 2005 *Epiphycan/Biglycan* のノックアウトマウスでは椎間板の変性が加速する。日整会誌 79(8):S932

TABLE 1

Summary of genotyping of 4 week-old mice from *Skt^{Gt}* heterozygote matings

+/+	<i>Gt</i>/+	<i>Gt</i>/<i>Gt</i>	
		kinked	normal*
60	151	35(53%)	31

* All normally looking homozygotes showed deformity of the caudal discs by histological analysis.

TABLE 2

Distribution of the haplotypes among the 315 offspring of the backcross *Sd*

+/+ Skt^{Gt} or Sd Skt^{Gt} /+ + × C57 BL/6

<i>Sd +/+ Skt^{Gt} × C57 BL/6</i>				<i>Sd Skt^{Gt} /+ + × C57 BL/6</i>			
<i>+ +/+ Skt^{Gt}</i>	<i>Sd +/+ +</i>	<i>Sd Skt^{Gt} /+ +</i>	<i>+ +/+ +</i>	<i>+ Skt^{Gt} /+ +</i>	<i>Sd +/+ +</i>	<i>Sd Skt^{Gt} /+ +</i>	<i>+ +/+ +</i>
144	102	1	2	0	0	24	42

Sd, Skt^{Gt} compound heterozygotes generated from crosses with an inbred laboratory strain (C57BL/6)

Figure

Fig. 1
Semba et al.

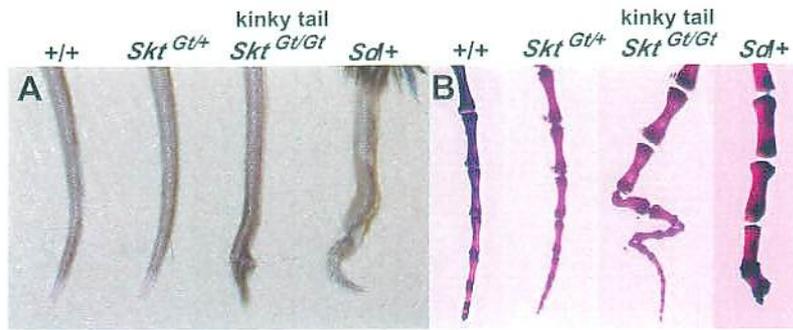


Figure 1. (A) 8-week-old マウスの尻尾の表現型である。 *Skt^{Gt/Gt}* マウスは、 wild-type、 *Skt^{Gt/+}*、 *Sd* ヘテロマウスと比較して kinky tail を呈する。(B) 8-week-old マウスの尾椎のアリザリンレッド染色標本である。 *Skt^{Gt/Gt}* マウスは、 骨格が原因で kinky tail を呈していた。 *Sd* マウスは尾椎が切断されたような、 脊椎が減少する表現型を示した。

伝子のエクソン、イントロン構造を示し、トラップベクターの pU-8 は第 14 番イントロンに挿入されていた。エクソン、イントロンサイズを並記している。

下段： *Skt* 領域より産生される 2 つの転写産物を示す。すくなくとも 2 つの *Skt* 転写産物が存在し、1 つは全エクソンを含んだ *Skt*-a、2 つ目は 13th エクソンを 33bp 欠失した *Skt*-b である。矢印(a, b, c, d, e, f)は RT-PCR に使用したプライマーを示し、Figure 3 A-C でそれぞれの部位の *Skt* 発現を調べるために施行した RT-PCR で使用したプライマーの位置である。black bar はノザンプロット法で使用したプローブの位置である。Open、shaded boxes はそれぞれ pro-rich、coiled-coil 領域を示す。星印は *Skt* 遺伝子のスタート、ストップコドンを示す。Node/notochord エンハンサーである consensus sequence-3 (CS3) は *Skt* 遺伝子領域の第 4 イントロンに存在し、*Et14^{lacZ}* のトラップベクターが挿入された部位より 106 kb 下流に位置していた。

Fig. 3
Semba et

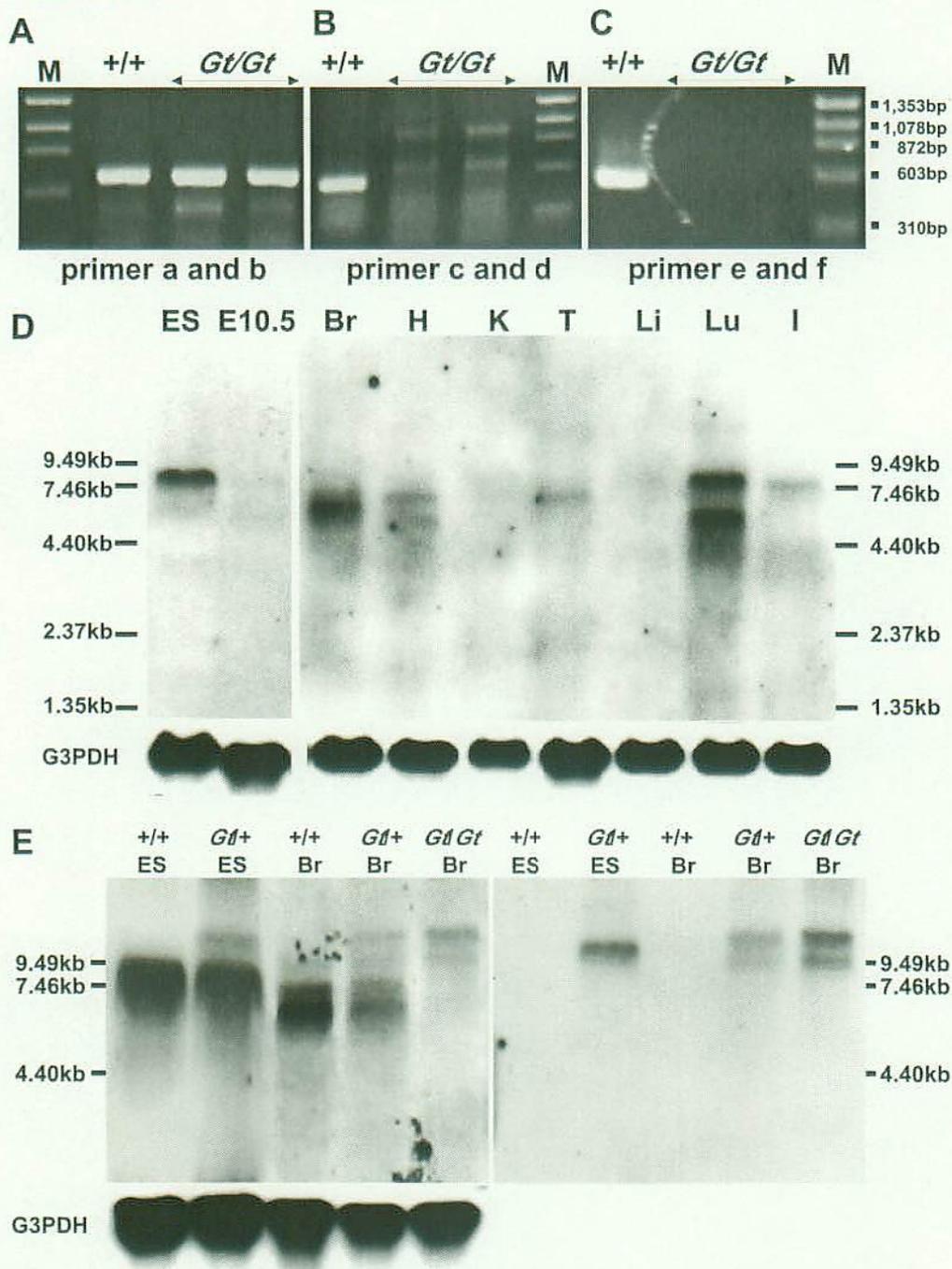


Figure 3. *Skt* 転写産物の解析。(A-C) E10.5 での wild-type (+/+), *Skt*^{Gt/Gt} 胚における *Skt* 遺伝子発現を調べた。トラップベクターの挿入より上流の *Skt* 配

列は wild-type、 $Skt^{Gt/Gt}$ 胚の両者ともで発現していた(A)。トラップベクターの挿入より下流の Skt 配列は $Skt^{Gt/Gt}$ 胚で発現を検出出来なかった(B and C)。M, molecular marker. (D) Skt mRNA を調べるため、wild-type ES 細胞、E10.5 胚、8-week-old マウスと、5'側に位置している Skt specific 特異的プローブを使用したノザンブロット法解析を示す(Figure 2B)。TT2 ES 細胞の total RNA (10 μ g), wild-type E10.5 胚, wild-type マウスの各臓器より抽出した mRNA (5 μ g)、 Skt RNA プローブを使用してノザンブロット法解析を施行した。(E) Skt と β -*geo* との融合配列を調べるためのノザンブロット法解析を示す。TT2 ES 細胞より total RNA (20 μ g), ヘテロ接合体($Gt/+$) ES 細胞, wild-type ($+/+$), ヘテロ接合体 ($Gt/+$)、ホモ接合体(Gt/Gt) 成体脳組織を使用して ノザンブロット法解析を施行した。 Skt RNA プローブ、 $lacZ$ RNA プローブを使用したノザンブロット法解析はそれぞれ左、右に示した。Br, brain; H, heart; K, kidney; T, testis; Li, liver; Lu, lung; I, intestine.

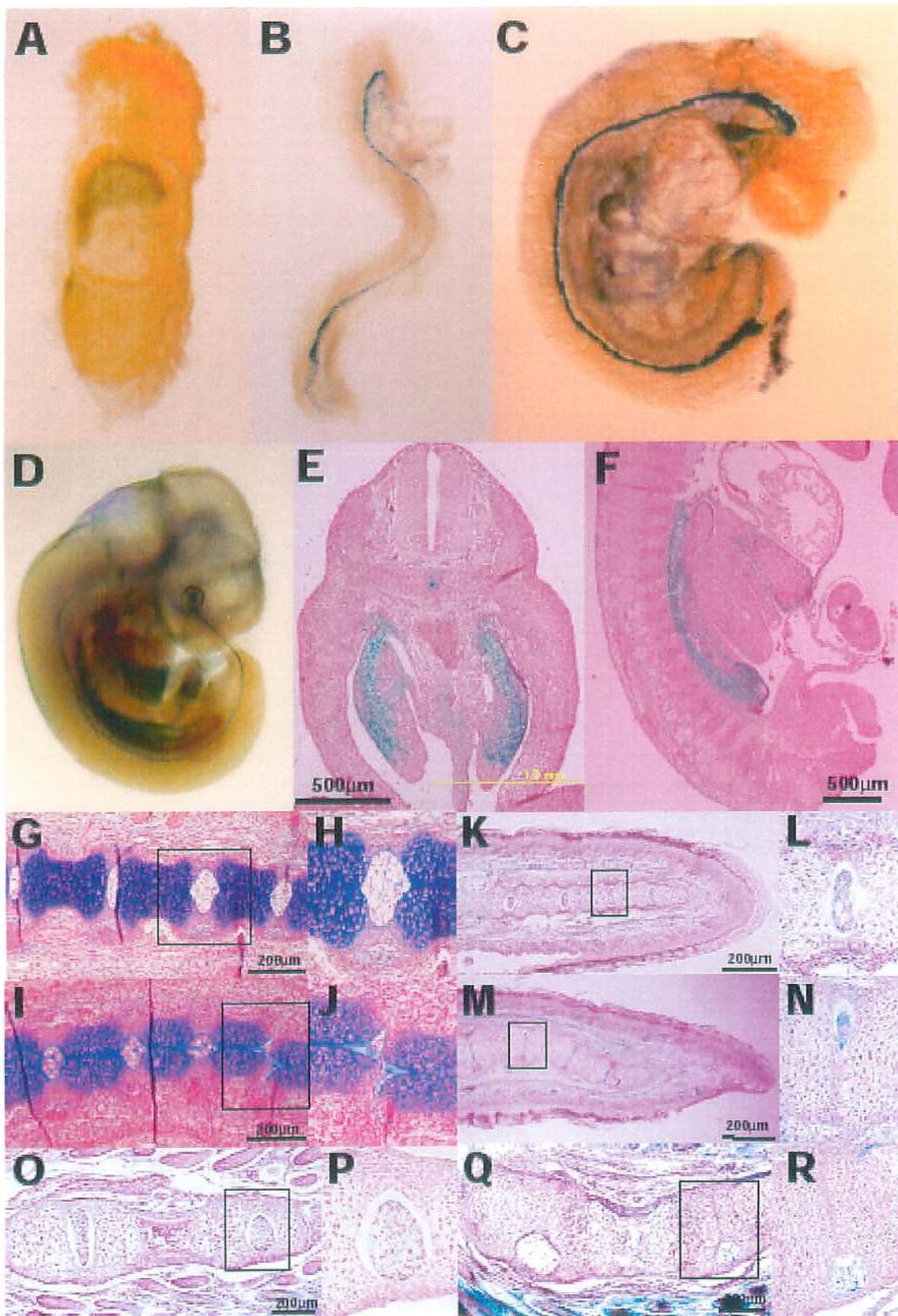


Figure 4. *Sk^t* 変異マウスにおける β -gal expression 発現と組織学的解析。E7.5 胚では X-gal 染色にて chorion にその発現を認めた (A) が、胚の中心線軸には X-gal 陽性領域は認めなかった。E8.5 胚 (B)、E9.0 胚 (C) では、脊索に強く発現を認めた。E11.5 胚 (D-F) では、脊索、中腎で発現を認め、whole-mount X-gal 染色 (D)、全額面 (E)、矢状断 (F) で示す。*Sk^{t/+}* (G and H)、*Sk^{t/Gt}* (I and J) の E17.5 胚における矢状断組織像である。E17.5 の *Sk^{t/Gt}* 胚の尾芽ではいくつかの椎間板原基が押しつぶされている形状を示した (J)。*Sk^{t/+}* (K and L)、*Sk^{t/Gt}* (M and N) 新生マウスの尻尾尖端の矢状断組織像である。*Sk^{t/Gt}* neonate 新生マウスでは尾椎の並びが undulated になっている (M and N)。2-week-old の *Sk^{t/+}* (O and P)、*Sk^{t/Gt}* (Q and R) マウスの尾部尖端の組織像である。2-week-old *Sk^{t/Gt}* マウスの尾部尖端では X-gal 陽性椎間板髓核細胞は椎間板内で辺縁に片寄っているのを認める (Q and R)。(H, J, L, N, P, R) の拡大像はそれぞれ G, I, K, M, O, Q の組織像におけるボックス内を示している。組織像 (G-J) は、アルシアンブルー染色切片であり、組織像 (E, F, K-R) は X-gal 染色切片である。カウンター染色として Nuclear Fast Red 染色をしている。Bars: 200 μ m.

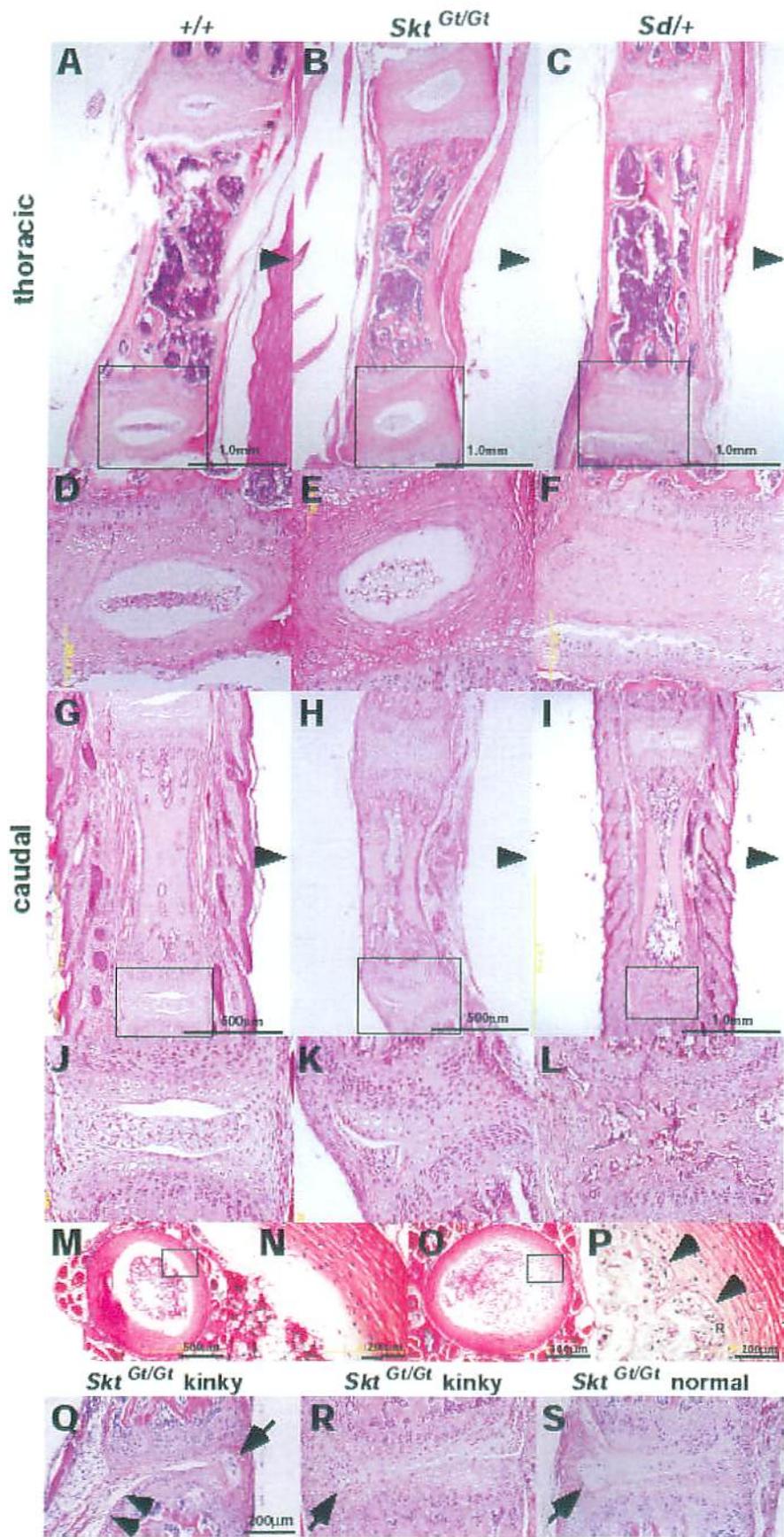


Figure 5. *Sk^{t^{Gt}/Gt}*、*Sd* 変異マウスの椎間板における組織学的解析。8-week-old wild-type (A, D, G, J), *Sk^{t^{Gt}/Gt}* (B, E, H, K), *Sd* ヘテロ接合体マウス (C, F, I, L) の胸椎、尾椎の組織学的解析を示す。(D, E, F, J, K, L) の拡大組織像はそれぞれ A, B, C, G, H, I におけるボックス内の拡大像である。矢頭は背側を示す。wild-type (M, N) , *Sk^{t^{Gt}/Gt}* (O, P) の 8-week-old マウスにおける上位尾椎椎間板の冠状断を示す。(N, P) の拡大組織像はそれぞれ M, O の組織像内のボックス内の拡大像である。図 P の矢頭は椎間板髄核組織と椎間板線維輪組織の境界が密接で不明瞭であることを示している。(Q-S) *Sk^{t^{Gt}/Gt}* 8-week-old マウスにおける第 20th-25th 尾椎椎間板である。*Sk^{t^{Gt}/Gt}* マウスは椎間板線維輪の菲薄化(Q and R)、椎体への接着不良(Q、矢頭)といった椎間板線維輪の形成異常を示す。椎間板髄核の辺縁部への偏移(Q-S、矢印)、椎間板線維輪の低形成といった表現型は kinky マウス(Q and R)、non-kinky マウス(S)においても同様に認められた。

Haematoxylin & Eosin (HE) staining. Bars: 200 μ m.

Fig. 6
Semba et al.

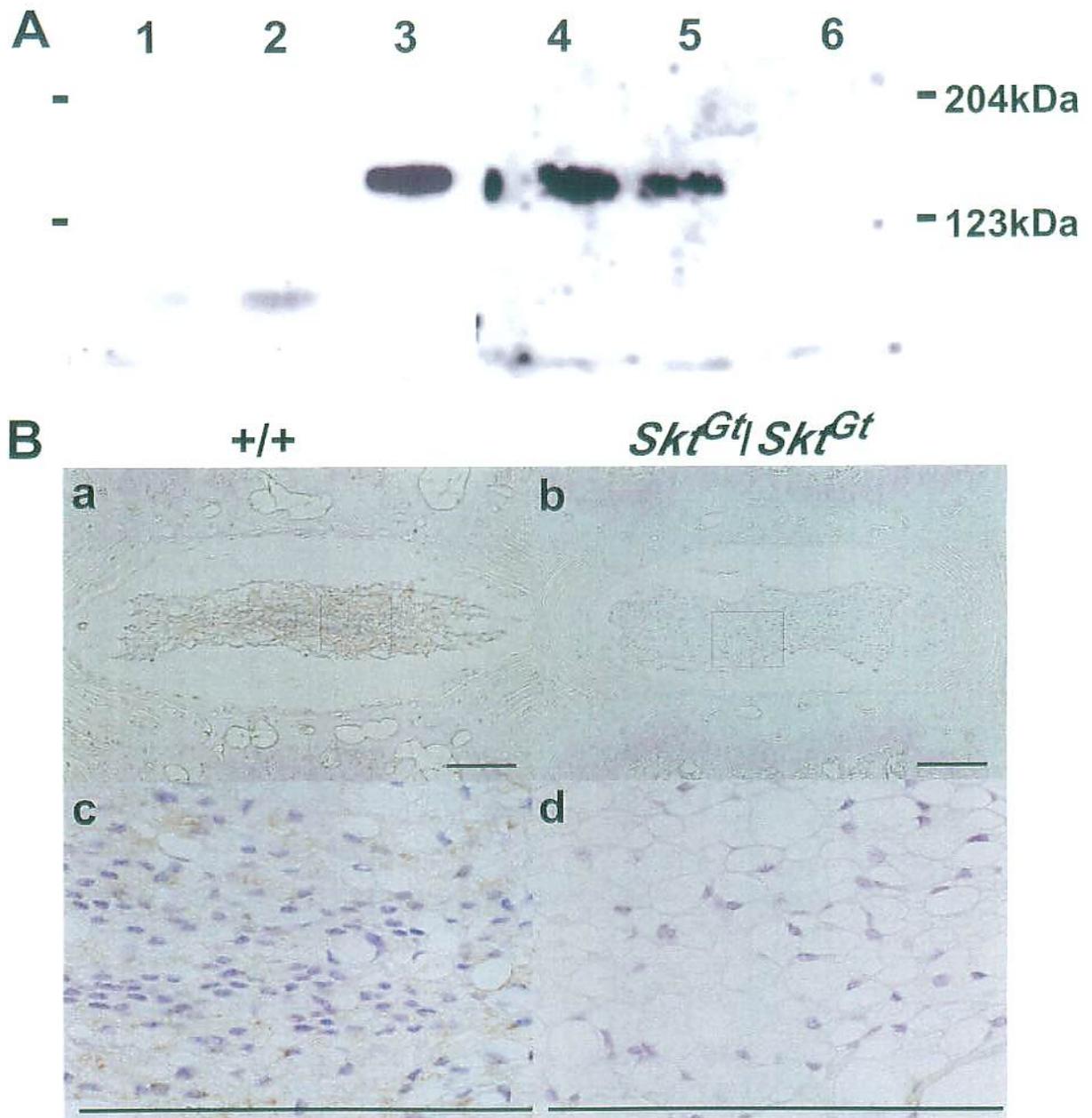


Figure 6. Skt 蛋白の検出。(A) Skt 蛋白を検出するために untreated BMT10 細胞 (lane 1), empty vector をトランスフェクションした BMT10 細胞 (lane 2), Skt expression vector をトランスフェクションした BMT10 細胞 (lane 3), and

尾 8-week-old wild-type マウスの椎椎間板髓核より抽出したサンプル(lane 4), $Sk t^{Gt/+}$ マウス (lane 5)、 $Sk t^{Gt/Gt}$ マウス(lane 6)を使用して western blot 法解析を施行した。予想された Skt 蛋白の大きさ 147-kDa にほぼ一致した 150-kDa 蛋白を lane 3, 4, 5 で検出する事が出来た。Skt 蛋白は $Sk t^{Gt/+}$ マウス(lane 5) で発現量が低下し、 $Sk t^{Gt/Gt}$ マウス(lane 6)では検出感度以下であった。(B) 精製した坑 Skt 抗体と 8-week-old マウスの上位尾椎椎間板を使用した免疫染色を示す。Skt 蛋白は椎間板髓核細胞の wild-type (a and c)の細胞質内で検出され、 $Sk t^{Gt/Gt}$ マウス内(b and d)では検出されなかった。図 a, b におけるボックスはそれぞれ拡大像を示す。Bars: 200 μ m.

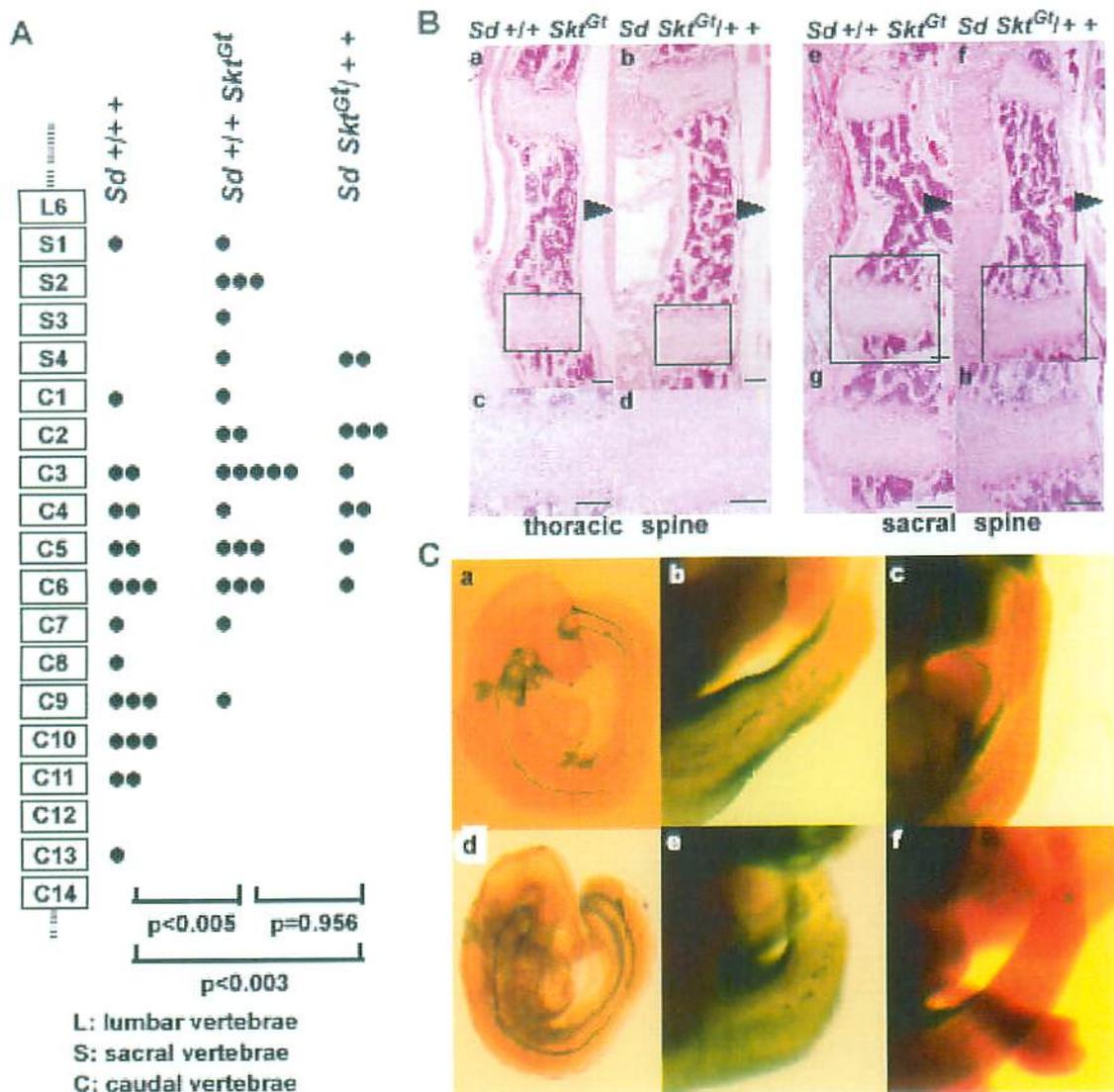


Figure 7. (A) 8-week-old ダブル変異マウスにおける中軸骨格の短縮を図示する。single black dot はそれぞれ 1 検体マウスの残存した脊椎末端を示している。*Trans* と *cis* ダブル変異マウスはヘテロ接合体 *Sd* マウスよりその尾椎短縮の表現型は重篤化した (*trans*, $p < 0.005$; *cis*, $p < 0.003$, *Mann-Whitney U-test*)。 *trans* [*Sd* +/+ + *Skt^{Gt}*] ($n = 23$) と *cis* [*Sd Skt^{Gt}/+* +] ($n = 10$) ダブル変異マウス間では有意差は認めなかった ($p = 0.956$, *Mann-Whitney U-test*)。 (B) *Sd*

+/+ Skt^{Gt} と $Sd Skt^{Gt} /+ +$ 変異マウスにおける脊椎の組織学的解析。胸椎 HE 矢状断組織像 : $Sd +/+ Skt^{Gt}$ (a and c)、 $Sd Skt^{Gt} /+ +$ (b and d) マウス。仙椎 HE 矢状断組織像 : $Sd +/+ Skt^{Gt}$ (e and g)、 $Sd Skt^{Gt} /+ +$ (f and h) マウス。矢頭は背側を示す。(c, d, g, h) の組織像は a, b e, f で示された各々のボックス内の拡大像である。(C) $Sd +/+ Skt^{Gt}$ 、 $Sd Skt^{Gt} /+ +$ 胚の Whole-mount X-gal 染色像である。*trans* ダブル変異胚[$Sd +/+ Skt^{Gt}$]の E9.5 (a) と E13.5 (b and c)、*cis* ダブル変異胚[$Sd Skt^{Gt} /+ +$]の E9.5 (d) と E13.5 (e and f) 内における脊索での β -gal の発現を示した。