

学 位 論 文 題 名

脊椎動物の形態形成を支配するシグナル分子制御機構

－中胚葉の背腹形成における BMP-4 と Noggin の役割－

学位論文内容の要旨

すべての脊椎動物の個体発生過程においては、まずからだの前後、背腹、左右の三軸が決定され、これらの基本軸に沿ってその後の複雑な形態形成が展開する。脊椎動物の胚は外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉から構成されるが、中胚葉は発生初期においてすでに将来の背腹軸に沿って明確に部域化しており、背腹軸に沿って体節（将来の骨や筋肉）、腎節（腎臓）、及び側板（腹側の体壁）が整然と配置されている。中胚葉のこのような部域化のしくみを理解する上で、平面的な構造をとりながら発生を進めるニワトリ初期胚は非常に有用な実験動物である。本研究では特に背腹軸に沿った形態形成のしくみの解明を目的とし、トリ胚顕微操作を用いて分子レベルで解析を行った。

1) 腹側中胚葉の決定に関わる分子、BMP-4

背腹軸に沿った中胚葉の部域化がいつどのように決定されるかを調べるために、移植実験を行った。ニワトリ胚とウズラ胚は類似の発生過程をたどり、互いに交換移植してもその後正常に発生を進める（ニワトリ-ウズラキメラ）。又、それぞれの種に特異的な細胞核の形態を示すことから二種の細胞を識別することができるため、細胞標識法として有用である。ウズラ二日目胚の体節板（背）を同時期のニワトリ胚の側板（腹）内へ移植して発生させたところ、移植一日後には体節板由来のウズラ細胞は体節マーカーの発現を停止し、腹側中胚葉マーカーcytokeratinの発現を開始した。この結果から初期体節（背）はまだ決定しておらず、腹側内という環境下においては側板（腹）に分化し得ることがわかった。またこのことは、側板内には中胚葉組織を腹側化させる因子が存在することを意味する。そこで腹側中胚葉の分化を制御する分子を探索する目的で、BMP-4に着目した。BMP-4はTGF- β ファミリーに属する分泌性シグナル分子であり、トリ胚において側板内にのみ特異的に発現する。そこでBMP-4が側板形成を支配している可能性を検証するために、背側中胚葉内にBMP-4を異所的かつ局所的に作用させ、その後の形態形成に及ぼす影響を解析した。まず、導入された遺伝子を効率よく発現する株細胞であるCOS細胞内にBMP-4遺伝子を導入し、BMP-4分子を強制発現させた。次にこれらの細胞を塊状にし（以下BMP-4/COS）、体節板（背）内に移植しBMP-4を作用させた。その結果、体節の形成は著しく阻害され体節の初期マーカーPax3や

MyoDの発現が完全に抑制された。さらにBMP-4の作用を受けた体節細胞を標識するその発生運命を検討したところ、側板中胚葉として分化していた。つまりBMP-4の作用により、体節細胞（背）は側板（腹）に変わったのである。

次に中胚葉形成におけるBMP-4の作用の濃度依存性について検討した。BMP-4/COSと正常COS細胞を様々な比で混合することによって一細胞塊当たりのBMP-4濃度を变化させ、前述と同様に体節内に作用させた。体節（背）は背腹に沿ってさらに細分化しており、その背側領域と腹側領域ではその後の分化過程は異なる。低濃度のBMP-4を作用させた結果、腹側体節マーカーcSim1が体節全域に発現したことから、体節はすべて腹側体節に変換したということが明らかにされた。一方、高濃度のBMP-4により体節は完全に側板に転換した。これらの結果から正常発生において、異なるBMP-4の濃度が中胚葉の異なる部域の形成をコントロールしていることが強く示唆された。正常胚においてはBMP-4 mRNAは側板内で特異的に発現していることを考慮すると、側板内で産生される高濃度のBMP-4分子が側板を、また側板から体節中胚葉に向かって拡散するBMP-4が腹側体節を形成するというしくみが考えられる。

2) 背側中胚葉の決定に関わる分子、Noggin

それでは、背側中胚葉はどのようなしくみで決定されるのであろうか。背側中胚葉への分化に関与する分子を探索する目的で、シグナル分子Nogginに着目した。NogginはBMP-4分子に直接結合してBMP-4のシグナル伝達を阻害することが知られている。そこでニワトリ胚におけるBMP-4の腹側化活性をNogginが抑制することにより、体節が形成されるのではないかという可能性を検証した。まずトリNoggin cDNAをクローニングし、一日胚においてその発現を解析したところ、Noggin mRNAは脊索に加え予定体節領域内で特異的に発現していた。そこでNogginの作用を調べるために、Noggin遺伝子を強制発現させたCOS細胞（Nog/COS）を作製し、この細胞塊を一日胚の側板内に移植することにより、側板に発現している内在性BMP-4の活性を抑えることを試みた。その結果、移植されたNog/COS付近において体節の異所的な形成が認められた。またNogginの作用により側板細胞は体節細胞に変換されたことが細胞を標識することにより明らかとなった。このような異所的な体節は、側板内のBMP-4の活性がNogginにより局所的に阻害されたため形成されたと考えられる。以上の結果から、Nogginは背腹軸に沿った中胚葉の部域化の決定において、BMP-4活性の阻害を介して体節（背側）中胚葉の特異化に関与していることが強く示唆される。

以上の結果から正常発生における中胚葉の形成において、腹側中胚葉に発現している高濃度のBMP-4は側板を形成し、その一方で予定体節(背側)中胚葉内に発現しているNogginは、この領域内のBMP-4活性を局所的に低下させることにより体節を形成するものと考えられる。さらに、側板由来のBMP-4が体節内の背腹極性を確立する。つまりBMP-4とNogginの拮抗作用により、中胚葉の背腹軸に沿った部域化が確立されるというモデルが提唱される。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 横 沢 英 良
副 査 教 授 上 野 直 人
副 査 教 授 栗 原 堅 三
副 査 助 教 授 沢 田 均

学 位 論 文 題 名

脊椎動物の形態形成を支配するシグナル分子制御機構

－中胚葉の背腹形成における BMP-4 と Noggin の役割－

脊椎動物の個体発生は細胞と細胞との間の情報のやりとり、すなわち細胞間相互作用によって制御されており、近年、この相互作用を制御する液性因子の存在についても明らかにされてきた。学位申請者、利根川あかねは、個体発生のなかでもとくに中胚葉全体と将来骨格を形成する体節（somite）における背腹の領域化に注目して研究を行った。

発生過程で大まかに中胚葉になる領域が決定されると、次に中胚葉は将来骨格を形成する体節と側板に部域化される。この部域化は中胚葉のなかに背腹軸に沿ったパターンが形成されることによって生じる。すなわち、中胚葉のなかでも背側は将来体節に分化し、腹側は将来腹側の体壁を形成する側板に分化するという二つの異なる発生運命をたどる。申請者はこの分子メカニズムを明らかにするために、背腹軸に沿って領域特異的に発現する遺伝子に注目し、その機能解析を行った。モデル動物として、胚操作による実験系が確立しているニワトリの初期胚を用い、組織形成を領域特異的に操作することによって、高度に洗練された解析を可能にしている。まず、申請者は BMP-4 mRNA が中胚葉腹側の側板に限局して発現していることから、BMP-4 を背腹パターンを決定する液性因子の候補として、機能解析を行った。BMP-4 を発現する COS 細胞を予定体節領域に移植すると、本来体節を形成すべき領域は側板を形

成することがわかった。また、この BMP-4 による中胚葉の腹側化作用は濃度に依存的であり、高濃度の BMP では側板が、中濃度では腹側体節が、低濃度では背側体節が誘導されることを示した。これらの結果により、申請者は BMP-4 が体節の背腹パターン形成に重要な役割を担っており、腹側で高レベルで発現する BMP-4 が背側に向かって濃度勾配を形成することによって、背腹の領域特異性を決定していることを明らかにした。

つぎに、申請者は体節の中で背腹軸に沿って形成される、活性型（受容体を活性化しうる）BMP-4 の濃度勾配の形成メカニズムについて検討を加えた。申請者は BMP-4 に結合し、受容体の活性化を阻害する Noggin と呼ばれるタンパク性因子の遺伝子が背側体節で発現していることを明らかにした。さらに、Noggin タンパク質を発現する COS 細胞を腹側体節に移植することによって腹側体節が背側化したことから、Noggin が BMP-4 活性を阻害することによって体節内に BMP 活性の勾配を形成している可能性を示した。

これら一連の研究により、申請者は BMP-4 という細胞増殖因子の濃度勾配が体節のパターン形成に重要であることのみならず、その濃度勾配が BMP-4 の阻害因子によって形成されているという可能性を、厳密な移植実験と分子マーカーの遺伝子発現の裏付けにより示した。これらの知見は発生生物学のなかでも高く評価され、その成果は国際学術誌に発表された。

本博士論文における計画の立案、実験方法、結果の考察、および学位論文発表会における質疑応答から、学位申請者利根川あかねは博士（薬学）の称号を受けるに十分な資格を有しているものと判断した。