

博士（薬 学） 二階堂 昌 孝

学 位 論 文 題 名

ゼブラフィッシュ初期形態形成における
骨形成タンパク質の役割

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の体を構築する様々な組織や器官は、きわめて初期の発生段階においてどの領域から何が形成されるかが決定されている。筆者はゼブラフィッシュをモデル動物としてこの現象の分子機構の解明を行うために研究を行った。

1990年、Kimmelらはゼブラフィッシュの初期発生時の予定運命図を作製し、様々な組織、器官の原基は将来の背腹の軸に沿って規定されていることを示した。このことは、背腹軸に沿って極性を持って発現する遺伝子が器官原基の配置の決定機構を司る可能性が高いことを示している。このような遺伝子の中で、筆者は、胚の腹側領域で強く発現していることが他の脊椎動物で知られていた骨形成タンパク質（bone morphogenetic protein, BMP）に注目することとした。

まずゼブラフィッシュ初期胚期のcDNAライブラリーから、アフリカツメガエルBMPとの相同意を指標としてゼブラフィッシュ *bmp-2*、*bmp-4*を単離した。これらの発現時期と領域を解析した結果、両遺伝子とも実際背腹のパターン形成が行われている原腸胚期の胚の腹側領域に外胚葉（中枢神経や、表皮へと分化する領域）、中胚葉（脊索、筋肉、血球などを形成する領域）共に強い発現が認められた。

次に単離した遺伝子がゼブラフィッシュ生体内において腹側組織の形成に関わっていることを示すためには、発現が腹側に限局していることに加え、実際これらにコードされるタンパク質が腹側組織の形成を促すかどうかも確認する必要がある。そのために、予想されるmRNAを合成し胚に微量注入することで過剰発現実験を行った。今回単離された遺伝子にコードされるBMPタンパク質がもし腹側組織の形成を促すなら、このような処理をした胚では全ての組織は腹側化するはずである。その結果、まず中胚葉に関しては、最も背側の構造である脊索の形成が阻害されていた。この結果を分子レベルでも確認するために、中胚葉の背腹軸に沿って局在する発現パターンを示すいくつかの遺伝子の発現変化を検討したところ、脊索に発現する *no tail (ntl)* は、形態変化を反映してその発現が抑制され、逆に、腹側中胚葉領域に発現する *evel* などは背側領域までその発現領域が拡張していた。これらのこととは中胚葉が腹側化したことを見ていると考えられる。これら発現パターンと過剰発現実験の結果から、まず中胚葉において、今回単離したゼブラフィッシュ *bmp-2,4* は初期胚期の発現領域において腹側中胚葉組織を誘導し逆に背側中胚葉形成を抑えることで、中胚葉に背腹の極性を形成するのに関わっている遺伝子であることが結論づけられた。

次に、外胚葉領域においても同様にBMPが腹側領域の決定に関わっているかどうかを過剰発現実験により検討した。外胚葉領域は中胚葉とは異なり、その背腹の極性の決定が中胚葉の背腹の極性に依存している。そのため、中胚葉形成に関する実験で用いた単純な過剰発現実験では、外胚葉の腹側化がBMPの直接の作用であるのか、中胚葉の腹側化による二次的な作用であるのかが区別できない。そこでゼブラフィッシュより新たにBMP受容体を単離し、リガンド非依存的にシグナルを伝える構成的活性化型受容体を作製して解析することとした。受容体はすでに単離されていたマウスのtype I BMP受容体のcDNAをプローブとして単離した。これに対して、これまで他の多くの脊椎動物のTGF- β ファミリーの受容体で行われているように、リン酸化部位近傍のグルタミンをアスパラギン酸に置換することで構成的活性化型受容体を作製し、中胚葉の腹側化活性を指標として確かにBMPシグナルを伝えていることを確認した後、以下のような実験を行った。

まずこの活性化型受容体をコードするmRNAを合成し、これを微量注入して得た過剰発現胚から細胞を採取し、何も処理していない胚の予定外胚葉領域に移植する。こうして得たキメラ胚は、外胚葉領域の構成的活性化型受容体を持った細胞のみが異所的なBMP刺激を受けることになるため、中胚葉の腹側化の影響を無視することができる。この方法で構成的活性化型受容体を背側外胚葉で発現させた胚において、中胚葉の場合と同様、背腹軸に沿って極性のある発現を示す遺伝子の発現を解析したところ、背側から生じる神経領域のマーカー遺伝子である *otx-2* は抑制された。逆に、腹側から生じる表皮領域のマーカー遺伝子である *gata-3* は、同様の条件で誘導されていた。つまり、外胚葉においても、BMPによる腹側化が見られたこととなる。以上のデータをまとめると、外胚葉においてもBMPは中胚葉とは独立してその背腹のパターン形成に関わり、それが発現している腹側で表皮を誘導し、かつ、神経分化を抑制することで背側に神経領域、腹側に表皮、という外胚葉の背腹のパターンの形成を制御していると考えられる。

以上のことから、ゼブラフィッシュにおいてBMPは、胚の腹側領域を規定する遺伝子として作用し胚の背腹軸を決定していることが明らかとなった。この事は、他のモデル動物であるカエルなどを用いた研究でも同時に明らかとなっており、さらには、無脊椎動物であるショウジョウワバエにも類似の分子機構の存在が立証されている。このように、BMPを介した胚の背腹軸形成機構は広く動物界一般に保存されているといえる。またこの保存性を前提とすると、ゼブラフィッシュは、カエルで行われてきたような胚操作とこれまで主にマウスでしか行われてこなかった変異体を利用した解析の両方が可能であることが特徴であるため、この点を生かしてBMPの形態形成に対する役割をさらに詳細に研究すれば、その結果を他のモデル動物に還元することも可能であると期待される。その点からも、今回の研究は貴重な基礎となると予想される。

学位論文審査の要旨

主査教授 栗原堅三

副査教授 横沢英良

副査教授 上野直人

副査助教授 沢田均

学位論文題名

ゼブラフィッシュ初期形態形成における 骨形成タンパク質の役割

脊椎動物の体を構築する様々な組織や器官は、きわめて初期の発生段階でどの領域から何が形成されるかが決定されている。学位申請者、二階堂昌孝はゼブラフィッシュをモデル動物としてこの現象の分子機構を解明するために研究を行った。

1990年、Kimmelらはゼブラフィッシュの初期発生時の予定運命図を作製し、様々な組織、器官の原基は将来の背腹の軸に沿って規定されていることを示した。このことは、背腹軸に沿って極性を持って発現する遺伝子が器官原基の配置の決定機構を司る可能性が高いことを示している。このような遺伝子の中で、申請者は、胚の腹側領域で強く発現していることが他の脊椎動物で知られていた骨形成タンパク質 (bone morphogenetic protein, BMP) に注目した。

まず、ゼブラフィッシュ初期胚期のcDNAライブラリーから、アフリカツメガエル BMPとの相同性を指標としてゼブラフィッシュ *bmp-2*、*bmp-4*を単離した。これらの発現時期と領域を解析した結果、両遺伝子とも実際背腹のパターン形成が行われている原腸胚期の胚の腹側領域の外胚葉（中枢神経や、表皮へと分化する領域）、中胚葉（脊索、筋肉、血球などを形成する領域）共に強い発現が認められることを明らかにした。次に単離した遺伝子がゼブラフィッシュ生体内において腹側組織の形成に関わっていることを示すために mRNAを合成し胚に微量注入することによって過剰発現実験を行った。その結果、中胚葉に関しては最も背側の構造である脊索の形成が阻害されていた。また、脊索に発現する *no tail (ntl)* は、形態変化を反映してその発現が抑制され、逆に、腹側中胚葉領域に発現する *eve1*

などは背側領域までその発現領域が拡張することを見いだした。これらのこととは BMP によって中胚葉が腹側化したことを示している。発現パターンと過剰発現実験の結果から、まず中胚葉において、本研究において単離したゼブラフィッシュ *bmp-2,4* は初期胚期の腹側中胚葉組織を誘導し逆に背側中胚葉形成を抑えることで、中胚葉に背腹の極性を形成するのに関わっている遺伝子であると結論づけられた。

次に、申請者は外胚葉領域においても同様に BMP が腹側領域の決定に関わっているかどうかを過剰発現実験により検討した。外胚葉領域は中胚葉とは異なり、その背腹の極性の決定が中胚葉の背腹の極性に依存している。そのため、中胚葉形成に関する実験で用いた単純な過剰発現実験では、外胚葉の腹側化が BMP の直接の作用であるのか、中胚葉の腹側化による二次的な作用であるのかが区別できない。そこでゼブラフィッシュより新たに BMP 受容体を単離し、そのアミノ酸を置換することによりリガンド非依存的にシグナルを伝える構成的活性化型受容体を作製して解析した。

この活性化型受容体を過剰発現する胚から細胞を採取し、何も処理していない胚の予定外胚葉領域に移植する。こうして得たキメラ胚は、外胚葉領域の構成的活性化型受容体を持った細胞のみが異所的な BMP 刺激を受けることになるため、中胚葉の腹側化の影響を無視することができる。構成的活性化型受容体を背側外胚葉で発現させた胚において、背腹軸に沿って極性のある発現を示す遺伝子の発現パターンを解析したところ、背側から生じる神経領域のマーカー遺伝子である *otx-2* は抑制され、腹側から生じる表皮領域のマーカー遺伝子である *gata-3* は誘導されていた。すなわち、外胚葉においても BMP は中胚葉とは独立して背腹のパターン形成に関わり、それが発現している腹側で表皮を誘導し、同時に神経分化を抑制することで背側に神経領域、腹側に表皮、という外胚葉の背腹のパターンの形成を制御していると考えられる。

これら一連の研究により、ゼブラフィッシュにおいて BMP は、胚の腹側領域を規定する因子として作用し胚の背腹軸を決定していることが明らかとなった。これらの知見は発生生物学の中でも高く評価され国際学術誌に発表されている。ゼブラフィッシュは、胚操作と変異体を利用した遺伝学的解析の両方が可能であることが特徴であるため、本研究は今後の初期胚パターン形成に関する研究の貴重な礎となるものと考えられる。

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、学位申請者二階堂昌孝は博士（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。