

学位論文題名

ゼブラフィッシュ初期胚体軸形成における
TGF- β スーパーファミリーの役割

学位論文内容の要旨

要旨

初期発生は一つの受精卵から卵割を経て細胞間相互作用により多数の器官を持つ複雑な動物の体を作る過程である。TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子は、細胞間相互を制御する因子として初期発生過程の多くの場面で働いている。なかでもアクティビンと BMP はそれぞれ背側、腹側因子として、初期胚体軸決定に重要な役割を担っている。TGF- β スーパーファミリーのシグナルはタイプ I、タイプ II と呼ばれる二種類の受容体によって伝えられる。リガンドの結合によって、両受容体が複合体を形成し、タイプ II 受容体がタイプ I 受容体を活性化する。次に活性型タイプ I 受容体が細胞内シグナル伝達分子をリン酸化することにより、シグナルが細胞内に伝えられると考えられている。アクティビンタイプ II 受容体 (ActRII) は、アクティビンに特異的受容体として同定され、近年までアクティビン特異的受容体であると考えられてきた。しかし、ActRII が BMP と BMP 特異的タイプ I 受容体存在下で BMP シグナルを活性化できること、また、ショウジョウバエでのホモログである *punt* が *dpp* (BMP) シグナルの伝達に必須であることが明らかになり、ActRII はアクティビンに特異的な受容体ではなく、アクティビン、BMP 共通の受容体として、初期胚の背腹軸決定に重要な役割を担っていることが示唆されるようになってきた。

一方、ゼブラフィッシュは初期発生過程を解析する上で多くの利点を有しており、近年、脊椎動物発生研究のモデル動物として、注目を集めている多卵性小型熱帯魚である。そこで、本研究ではゼブラフィッシュをモデル動物として、体軸形成における TGF- β スーパーファミリーの役割を検討した。

まず初めに、アクティビン、BMP の働きはゼブラフィッシュにおいても保存されているかを、胞胚細胞外植片を用いた実験系により検討した。アクティビンを過剰発現させた胚より中胚葉誘導が起こる以前に内在の中胚葉誘導活性が存在する卵黄部分を外科的に切除して取り除いた胞胚細胞外植片を 3 時間培養し、各種遺伝子マーカーの発現を RT-PCR 法で検出した。その結果、背側中胚葉特異的に発現する *gsc*、中胚葉領域全域に発現する *ntl* などのマーカーの誘導が確認された。さらに、*ntl* は *gsc* よりも低い濃度で誘導されることが確認された。また、同様に BMP (*zbmp2*) を過剰発現させると *ntl* と腹側マーカー *eve1* が誘導され、BMP が腹側中胚葉誘導能を持つことが確認された。このようなアクティビン、BMP による中胚葉誘導パターンはアフリカツメガエルで知られているものと一致しており、中胚葉誘導に対する両者の働きが保存されていることが明らかになった。

さらにアクティビンによる中胚葉遺伝子誘導形式について解析するために、アクティビンを吸着させたビーズを胞胚細胞外植片中に埋め込み、培養することにより、外植片中にアクティビンの濃度勾配を作り、*gsc* と *ntl* の培養時間による発現パターンの変化を解析した。その結果、アクティビンビーズを埋め込まれた外植片中で両遺伝子ともビーズの周囲から発現が始まったが、*gsc* の発現が培養時間を伸ばしてもビーズの周囲に発現し続けるのに対し、4 時間の培養では *ntl* は *gsc* より広い領域で発現するようになり、その後、外植片が

伸長するのにともなってピーズより離れ伸長している部分に発現が局在するようになり、9時間の培養では *gsc* と *ntl* の発現領域は完全に分離してしまった。このような外植片中の両遺伝子の発現領域の変化は初期胚で起こる発現領域の変化と極めてよく類似しており、アクティビンの濃度勾配により、初期胚での両遺伝子の発現が制御されていることが示唆された。

次に、2つのゼブラフィッシュアクティビンタイプ II 受容体遺伝子 *ActRIIa*, *ActRIIb* を卵巣 cDNA から単離し、その初期胚での役割を検討した。両遺伝子の塩基配列を決定した結果、両遺伝子は共に各々の対応するマウス ActRII サブタイプに約 78% のホモロジーを持つ膜一回貫通型 Ser/Thr キナーゼ受容体をコードしていることが明らかになった。さらに、両受容体のアクティビンとの結合能を培養細胞上での結合実験で確認し、両遺伝子は構造的、機能的に ActRII ホモログであることを確認した。

さらに ActRII のゼブラフィッシュ初期胚中での機能を解析する目的で、1 または 2 細胞期の胚に *ActRIIb* 合成 mRNA の微量注入を行うことにより *ActRIIb* の過剰発現実験を行った。その結果、アクティビンを過剰発現した胚と類似した背側化胚が観察され、*ActRIIb* がゼブラフィッシュ初期胚中でアクティビン様シグナルを担っていることが示唆された。しかし、whole-mount *in situ* hybridization 法を用いてマーカー発現の変化を解析した結果、アクティビン過剰発現胚では *gsc* が胚全体に発現し *eve1* が抑制されるのに対し、*ActRIIb* 過剰発現胚では中胚葉誘導期に *gsc* が背側領域でのみ発現領域が拡大しており、*eve1* もまた、背側領域を除く広い範囲に拡大していた。このことから *ActRIIb* 過剰発現胚においてアクティビン以外に BMP シグナルも活性化されていることが示唆された。さらに、これら背腹それぞれのマーカー発現はアクティビン(背、*gsc*)、または BMP(腹、*eve1*) と同時に顕微注入することにより特異的に増強された。また、*ActRIIb* をアクティビン、または BMP 特異的タイプ I 受容体、それぞれと同時に発現させることによって同様に各マーカーが特異的に増強されることが確認された。よって、背腹両方の中胚葉誘導シグナル(アクティビン様、BMP シグナル)が *ActRIIb* を介して、特異的リガンドとタイプ I 受容体により、背腹誘導シグナルそれぞれに区別され伝えられていることが示唆された。

また、細胞内領域欠損型受容体 *dActRIIb* を作成し、初期胚での過剰発現実験を行い、*ActRIIb* が伝達するシグナルとゼブラフィッシュ初期胚中の TGF- β スーパーファミリーの役割を検討した。その結果、*dActRIIb* 過剰発現により、腹側中胚葉の欠損と神経領域の拡大が特徴の *zbmp2* 機能欠損変異体 *swirl* と類似した典型的背側化胚が観察された。このことから *dActRIIb* が初期胚中の BMP シグナルを遮断していることが示唆された。さらに、*dActRIIb* 過剰発現胚にアクティビン、BMP ピーズを挿入することにより、両シグナルに対する効果を検討した。その結果、過剰発現させた *dActRIIb* は中胚葉誘導期には作用を示さないが、後期原腸胚期以降では両ピーズの作用を阻害し、*dActRIIb* は両シグナルを遮断できることが明らかになった。これらのことより、*ActRIIb* が初期胚でアクティビン様、BMP の両方のシグナル伝達に関与していることが明らかになった。また、後期原腸胚期以降の初期胚中ではアクティビンより、BMP が体軸決定に大きな役割を担っていることが示唆された。

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	助教授	沢田均
副査	助教授	松岡一郎

学位論文題名

ゼブラフィッシュ初期胚体軸形成における TGF- β スーパーファミリーの役割

初期発生は受精卵から卵割を経て細胞間相互作用により多数の器官を持つ複雑な動物の体を作る過程であり、古くから多くのモデル動物を用いて研究がなされてきた。近年、TGF- β スーパーファミリーに属する増殖因子であるアクティビンとBMPはそれぞれ背側、腹側因子として、初期胚体軸決定に重要な役割を担っていることが、アフリカツメガエルなどを用いた研究から明らかになっている。学位申請者、長曾秀幸は、初期体軸形成におけるTGF- β スーパーファミリーの役割を、ゼブラフィッシュをモデル動物として研究を行った。

ゼブラフィッシュは初期発生研究のモデル動物として多くの利点を有しているが、その初期発生過程は古くからモデル動物として用いられてきたアフリカツメガエルなどの両生類とは大きく異なって見える。そこで申請者はまず初めに、内在の中胚葉誘導活性を取り除いた胞胚細胞外植片を用いた実験系を確立し、アクティビン、BMPの働きがゼブラフィッシュにおいても保存されているかを検討した。その結果、アクティビン、BMPによる背腹中胚葉の誘導パターンはアフリカツメガエルで知られているものと一致しており、中胚葉誘導に対する両者の働きが保存されていることが明らかになった。さらにアクティビンを吸着させたビーズを用いて、外植片中にアクティビンの濃度勾配を作り、中胚葉特異的遺伝子である *ntl*, *gsc* のアクティビンによる誘導形式について解析した。その結果、外植片中の両遺伝子の発現領域の変化は初期胚で起こる発現領域の変化と極めてよく類似しており、初期胚での両遺伝子の発現がアクティビンにより制御さ

れている可能性を示した。

次に申請者はゼブラフィッシュアクティビンタイプ II 受容体 (ActRII) 遺伝子 ActRIIa、ActRIIb を卵巣 cDNA ライブラリーから単離し、その初期胚体軸決定における役割を検討した。申請者は両遺伝子の塩基配列を決定し、両遺伝子は共に各々の対応するマウス ActRII サブタイプに約 78% のホモロジーを持つ膜貫通型 Ser/Thr キナーゼ受容体をコードしていることや、培養細胞上での結合実験で両受容体がアクティビンと結合することを示し、両遺伝子は構造的、機能的に ActRII ホモログであることを明らかにした。さらに初期胚での ActRIIb と細胞内領域欠損型受容体 dActRIIb の過剰発現実験により ActRIIb が伝達するシグナルとゼブラフィッシュ初期胚中の TGF- β スーパーファミリーの役割について検討した。まず、ActRIIb 過剰発現により、背腹両方の中胚葉誘導 (アクティビン様、BMP) シグナルを活性化すること、また、この背腹シグナルの活性化はそれぞれ特異的リガンドとタイプ I 受容体との共発現により増強されることを示し、ActRIIb を介して、特異的リガンドとタイプ I 受容体により、背腹シグナルそれぞれに区別されて伝えられている可能性を示唆した。また、dActRIIb の過剰発現実験では、dActRIIb が初期胚中でアクティビン、BMP の両シグナルを遮断していることを示した。これらの結果は、ActRIIb が初期胚でアクティビン、BMP の共通の受容体として働いている可能性を強く示唆している。

これらの一連の研究により、申請者はアクティビンと BMP がゼブラフィッシュにおいても初期胚背腹決定に重要な役割を担っており、それらのシグナルが ActRIIb を介して伝えられていることを明らかにした。従来 ActRIIb はアクティビンに特異的な受容体であると考えられていたが、本研究はそれを覆し、アクティビンと BMP に共通に使われる受容体であることを明らかにした。これらの知見は発生生物学の中でも高く評価され、特に ActRIIb の初期胚内におけるシグナル伝達特異性に関する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、学位申請者長曾秀幸は博士 (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。