

(論文内容の要旨)

ゼブラフィッシュは初期発生の研究に優れた多くの利点を持ち、血管の発生過程は脊椎動物の間でよく保存されている。申請者は初期発生における血管形成の新たな分子メカニズムを解明することを目的として、化学変異原である N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) を用いたミュータジェネシスと、血管内皮細胞特異的に EGFP を発現するトランスジェニックラインを用いて、血管形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の探索を行ってきた。その中で単離してきた変異体 (*ko095* 変異体) は、節間血管構造が維持できず異常に分枝する表現型を示した。ポジショナルクローニングにより *ko095* 変異体の原因遺伝子を同定した結果、tRNA^{Ser} に serine を結合させる機能をもつタンパク質翻訳に必須の酵素: seryl-tRNA synthetase (*sars*) に変異があることが明らかとなった。野生型の *sars* mRNA を *ko095* 変異体の初期胚へ注入すると血管形成異常は改善され、さらに酵素活性が消失した *sars* 点変異体 (T429A) の mRNA 注入でも血管形成異常が改善されたため、*ko095* 変異体でみられる血管形成異常は *sars* 分子がもつ酵素活性以外の機能喪失によることが示唆された。*sars* の作用点を検討するため、*ko095* 変異体を用いて Transplantation assay を行ったところ、*sars* は体節部から血管形成を制御しており、血管に対して細胞非自律的に作用することが明らかとなった。最近、Dll4 (血管内皮細胞特異的に発現する Notch リガンド) シグナルが血管形成に重要であり、血管内皮細胞における Vascular endothelial growth factor 受容体 (VEGFR-2, VEGFR-3) の発現を負に制御することが報告されている。*ko095* 変異体の血管形成異常は *dll4* シグナル阻害でみられる形態異常と非常に類似していた。さらに、*ko095* 変異体の血管形成異常は VEGFR 阻害剤で顕著に改善し、アンチセンスオリゴヌクレオチドである *vegfr* モルフォリノの注入によっても改善を認めた。また血管形成異常がおこる時点において、ゼブラフィッシュ胚から RNA を回収し定量的 RT-PCR を行ったところ、変異体は野生型と比較して、体節で発現する *vegfa* の mRNA 発現が顕著に増大していた。さらに変異体に対して酵素活性を消失した T429A mRNA を注入すると、*vegfa* mRNA の発現は低下することが明らかとなった。本研究から、*sars* が Ser-tRNA 合成酵素活性以外の新たな機能を有し、血管形成の過程において重要な役割を果たしていることを明らかとした。またその機能は、*vegfa* mRNA 発現を負に調節して血管新生を制御していると考えられた。

(論文審査の結果の要旨)

申請者は初期発生における血管形成の新たな分子メカニズムを解明することを目的として、化学変異原である N-ethyl-N-nitrosourea (ENU) を用いたミュータジェネシスと、血管内皮細胞特異的に EGFP を発現するトランスジェニックラインを用いて、血管形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体の探索を行った。本研究は、単離されたクローンのうち、節間血管構造が維持できず異常に分枝する表現型を示す変異体、*ko095* 変異体、に関する研究である。ポジショナルクローニングにより *ko095* 変異体の原因遺伝子を探索した結果、tRNA^{Ser} にセリンを共有結合させる seryl-tRNA synthetase (以下 *sars* と略する) に変異が見出された。野生型の *sars* mRNA を *ko095* 変異体の初期胚へ注入すると血管形成異常は改善された。同様の実験を、酵素活性が消失した *sars* 点変異体 (T429A) で行っても *ko095* 変異体の血管形成異常が改善されたため、*ko095* 変異体でみられる血管形成異常は *sars* 分子がもつ seryl-tRNA synthetase 酵素活性以外の機能喪失によることが示唆された。*sars* の作用点を検討するため、*ko095* 変異体を用いて移植実験を行ったところ、*sars* は体節部から血管形成を制御しており、血管に対して細胞非自律的に、すなわち、パラクライン的に作用することが明らかとなった。最近、血管内皮細胞特異的に発現する Notch リガンドである Dll4 からの Notch シグナルが血管内皮細胞における血管内皮細胞増殖因子受容体 (VEGFR-2, VEGFR-3) の発現を負に制御することが報告されている。*ko095* 変異体の血管形成異常は *dll4* シグナル阻害による形態異常と非常に類似していたので、以下に、Notch および VEGFR シグナルとの関連性を検討した。*ko095* 変異体の血管形成異常は VEGFR 阻害剤で顕著に改善し、アンチセンスオリゴヌクレオチドである *vegfr* モルフォリノの注入によっても改善を認めた。また血管形成異常がおこる時点において、ゼブラフィッシュ胚から RNA を回収し定量的 RT-PCR を行ったところ、変異体は野生型と比較して、体節で発現する血管内皮増殖因子 *vegfa* の mRNA 発現が顕著に増大していた。さらに変異体に対して seryl-tRNA synthetase 酵素活性を消失した T429A mRNA を注入しても、*vegfa* mRNA の発現が低下することが明らかとなった。すなわち、*sars* が Ser-tRNA 合成酵素活性以外の新たな機能を有すること、これは *vegfa* の発現を負に制御することを明らかにしたものである。

以上、本論文の研究は発生過程における血管形成機構の研究について重要な貢献をするものである。よって、本論文は博士 (生命科学) の学位論文として価値あるものと認めた。

なお、平成 21 年 7 月 1 日論文内容とそれに関連した口頭試問を行った結果、合格と認めた。