

氏名	わか はら たか し 若 原 隆 史
学位(専攻分野)	博 士 (薬 学)
学位記番号	薬 博 第 614 号
学位授与の日付	平 成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学 位 規 則 第 4 条 第 1 項 該 当
研究科・専攻	薬 学 研 究 科 生 命 薬 学 専 攻
学位論文題目	ゼブラフィッシュの胸びれ形成に關与する新規分泌性タンパク質 fibin の役割
論文調査委員	(主 査) 教 授 伊 藤 信 行 教 授 中 山 和 久 教 授 竹 島 浩

論 文 内 容 の 要 旨

分泌性因子は細胞間のシグナル伝達において重要な役割を果たすタンパク質であり、胎生期の組織形成・機能維持に対して多様な生理活性を発揮することが報告されている。そのため、このような分泌性因子に関する研究は複雑な形態形成のしくみの理解に留まらず、病気の解明・ヒト疾患モデル動物の作成等を促し、創薬基盤研究の足掛かりとなることが期待される。これまで分子生物学的な手法による遺伝子の機能解明には、ある表現型に着目しその原因遺伝子を同定するといった順遺伝学的なアプローチが主流であった。しかしながら先に遺伝子を同定した後に、機能阻害実験や機能亢進実験を通して対象遺伝子の機能を解析する逆遺伝学的なアプローチも非常に重要である。近年大規模なゲノムプロジェクトの成果により DNA データベースの拡充が進んだため、データベース上で機能未知な新規遺伝子を探索・同定することが可能になった。そこで当研究室では逆遺伝学の重要性に着目し、逆遺伝学的なアプローチによる分泌性因子の研究を精力的に行っている。そして、これまでに生体内で重要な機能を有する幾つかの新規分泌性因子を同定している。また当研究室では数年前からゼブラフィッシュを実験動物として用いた研究を行っている。ゼブラフィッシュは、胚が透明・発生速度が速い・哺乳動物と同等の器官が存在する等の遺伝学・発生学に適した特徴を有する他、モルフォリノ (MO) による標的遺伝子の機能阻害が簡便に行えることから、目的遺伝子の迅速な機能解析が期待できる優れたモデル動物として注目されている。

今回著者は、新規分泌性タンパク質をコードしていると思われるマウス遺伝子をデータベースより同定した。その後著者は相同性検索によりこの遺伝子の ortholog にあたるゼブラフィッシュ遺伝子を同定し、本遺伝子の機能解析を行った。その結果、本遺伝子がゼブラフィッシュ胚の胸びれ形成の初期過程において必須の役割を果たしていることを見出し、本遺伝子を Fibin (Fin bud initiation factor) と命名した。

ゼブラフィッシュ fibin の同定、発現部位の解析および fibin の生体内における役割の検討

著者が同定した Fibin は、既知のタンパク質と構造上の類似性を示さないユニークな分子であり、そのアミノ末端には分泌性因子に特徴的なシグナル配列が存在していた。そこで著者は Fibin が分泌性因子であることを検討するため、サル腎臓由来の COS7細胞にマウス Fibin を発現させた。その結果培養上清において Fibin が検出されたことから、Fibin が分泌性因子であることが明らかとなった。その後著者は、ゼブラフィッシュ胚を用いて fibin の機能解析を行った。まず著者は fibin mRNA の発現部位の同定を行った。その結果 fibin はゼブラフィッシュ胚の発生初期 (10時間胚～30時間胚) において胸びれ予定領域付近の側板中胚葉・前脳・後脳・体節・脊索・尾芽に強い発現を示した。次に著者は生体内での fibin の機能を検討するために fibin mRNA の翻訳開始部位に結合する MO (fibin MO1) を受精卵に導入することで fibin knock-down 胚を作製し、その表現型を観察した。その結果、顕著な表現型として胸びれの形成不全が認められた。また著者は fibin MO1 で得られた表現型が fibin の機能阻害による特異的な現象であることを証明するため、fibin MO1 とは異なる部位に結合する MO (fibin MO2) を作製し、fibin MO2 においても fibin MO1 と同様の表現型が得られることを確認した。さらに著者は25塩基から成る fibin MO1 のうち5塩基を別の塩基に置換した Control MO を作製し、この Control MO で

は何ら異常を示さないことを確認した。これらの結果より *fibin* がゼブラフィッシュの胸びれ形成に必須の遺伝子であることが示唆された。

胸びれ形成過程における *fibin* の役割の検討

ゼブラフィッシュ胚の胸びれは哺乳動物の前肢に相当する器官で、その形成過程も哺乳動物と類似している。この前肢は、古くから形態形成の研究における良いモデル器官として精力的な研究が進められている。胸びれの大部分は側板中胚葉由来の細胞から構成され、胸びれ形成開始時には予定領域の細胞に転写因子 *tbx5* が誘導されてくる。この *tbx5* は胸びれの運命決定に必要な遺伝子で、*tbx5* の変異体では胸びれの形成不全が起こることが報告されている。また *tbx5* の発現誘導には、胸びれ予定領域付近に存在する体節中胚葉からのレチノイン酸 (RA) シグナルや中間中胚葉からの Wnt シグナル (*wnt2b*) が必要であることが明らかにされている。著者は *fibin* が胸びれ形成過程において上記の因子と何らかの関係を有するのではないかと考え、下記の実験を行い *fibin* との関係について検討した。

まず筆者は *fibin* knockdown 胚では胸びれ予定領域における *tbx5* の発現が消失もしくは減少することを見出した。また著者は *tbx5* knockdown 胚においては胸びれ予定領域における *fibin* の発現が減少しないことを確認した。さらに著者は、胸びれ予定領域における *tbx5* の発現に先立って *fibin* がその近傍の側板中胚葉に発現し始めることを明らかにした。これらの結果から *fibin* は胸びれ形成において *tbx5* の上流因子として機能することが分かった。次に著者は RA シグナル阻害剤で処理した胚や *wnt2b* knockdown 胚において *fibin* の胸びれ領域での発現が消失していることを確認した。この結果から、*fibin* が RA 及び *wnt2b* の下流因子として機能することが分かった。

以上の結果より今回著者が同定した *fibin* は、ゼブラフィッシュ胚の胸びれ形成において必須の役割を果たしていることが明らかとなった。さらに詳細な研究の結果、*fibin* は RA や *wnt2b* の下流因子として機能し、*tbx5* の発現誘導・発現維持に関わっていることが明らかとなった。また *fibin* はマウス胎児の前肢芽に高発現していることから、哺乳動物の前肢形成においても同様の役割を果たしていることが示唆される。本研究が四肢形成機構の解明に繋がるだけでなく、このような形態形成の研究が再生医療などの分野に応用されることが期待される。

論文審査の結果の要旨

分泌性因子は細胞間のシグナル伝達において重要な役割を果たすタンパク質であり、胎生期の組織形成・機能維持に対して多様な生理活性を発揮することが報告されている。そのため、このような分泌性因子に関する研究は複雑な形態形成のしくみの理解に留まらず、病気の解明・ヒト疾患モデル動物の作成等を促し、創薬基盤研究の足掛かりとなることが期待される。これまで分子生物学的な手法による遺伝子の機能解明には、ある表現型に着目しその原因遺伝子を同定するといった順遺伝学的なアプローチが主流であった。しかしながら先に遺伝子を同定した後に、機能阻害実験や機能亢進実験を通して対象遺伝子の機能を解析する逆遺伝学的なアプローチも非常に重要である。近年大規模なゲノムプロジェクトの成果により DNA データベースの拡充が進んだため、データベース上で機能未知な新規遺伝子を探索・同定することが可能になった。一方、ゼブラフィッシュは、胚が透明・発生速度が速い・哺乳動物と同等の器官が存在する等の遺伝学・発生学に適した特徴を有する他、モルフォリノ (MO) による標的遺伝子の機能阻害が簡便に行えることから、目的遺伝子の迅速な機能解析が期待できる優れたモデル動物として注目されている。

申請者は新規分泌性タンパク質をコードしていると思われるマウス遺伝子をデータベースより同定した。さらに、申請者は相同性検索によりこの遺伝子の ortholog にあたるゼブラフィッシュ遺伝子を同定し、本遺伝子の機能解析を行った。その結果、本遺伝子がゼブラフィッシュ胚の胸びれ形成の初期過程において必須の役割を果たしていることを見出し、本遺伝子を *Fibin* (Fin bud initiation factor) と命名した。

申請者が同定した *Fibin* は、既知のタンパク質と構造上の類似性を示さないユニークな分子であり、そのアミノ末端には分泌性因子に特徴的なシグナル配列が存在していた。そこで申請者は *Fibin* が分泌性因子であることを検討するため、サル腎臓由来の COS7 細胞にマウス *Fibin* を発現させた。その結果培養上清において *Fibin* が検出されたことから、*Fibin* が分泌性因子であることが明らかとなった。その後著者は、ゼブラフィッシュ胚を用いて *fibin* の機能解析を行った。まず申請者は *fibin* mRNA の発現部位の同定を行った。その結果 *fibin* はゼブラフィッシュ胚の発生初期 (10時間胚~30時間胚) に

において胸びれ予定領域付近の側板中胚葉・前脳・後脳・体節・脊索・尾芽に強い発現を示した。次に申請者は生体内での fibin の機能を検討するために fibin mRNA の翻訳開始部位に結合する MO (fibin MO1) を受精卵に導入することで fibin knockdown 胚を作製し、その表現型を観察した。その結果、顕著な表現型として胸びれの形成不全が認められた。また著者は fibin MO1 で得られた表現型が fibin の機能障害による特異的な現象であることを証明するため、fibin MO1 とは異なる部位に結合する MO (fibin MO2) を作製し、fibin MO2 においても fibin MO1 と同様の表現型が得られることを確認した。さらに申請者は25塩基から成る fibin MO1 のうち5塩基を別の塩基に置換した Control MO を作製し、この Control MO では何ら異常を示さないことを確認した。これらの結果より fibin がゼブラフィッシュの胸びれ形成に必須の遺伝子であることが示唆された。

ゼブラフィッシュ胚の胸びれは哺乳動物の前肢に相当する器官で、その形成過程も哺乳動物と類似している。この前肢は、古くから形態形成の研究における良いモデル器官として精力的な研究が進められている。胸びれの大部分は側板中胚葉由来の細胞から構成され、胸びれ形成開始時には予定領域の細胞に転写因子 *tbx5* が誘導されてくる。この *tbx5* は胸びれの運命決定に必要な遺伝子で、*tbx5* の変異体では胸びれの形成不全が起こることが報告されている。また *tbx5* の発現誘導には、胸びれ予定領域付近に存在する体節中胚葉からのレチノイン酸 (RA) シグナルや中間中胚葉からの Wnt シグナル (*wnt2b*) が必要であることが明らかにされている。申請者は fibin が胸びれ形成過程において上記の因子と何らかの関係を有するのではないかと考え、下記の実験を行い fibin との関係について検討した。

申請者は fibin knockdown 胚では胸びれ予定領域における *tbx5* の発現が消失もしくは減少することを見出した。また著者は *tbx5* knockdown 胚においては胸びれ予定領域における fibin の発現が減少しないことを確認した。さらに申請者は、胸びれ予定領域における *tbx5* の発現に先立って fibin がその近傍の側板中胚葉に発現し始めることを明らかにした。これらの結果から fibin は胸びれ形成において *tbx5* の上流因子として機能することが分かった。次に申請者は RA シグナル阻害剤で処理した胚や *wnt2b* knockdown 胚において fibin の胸びれ領域での発現が消失していることを確認した。この結果から、fibin が RA 及び *wnt2b* の下流因子として機能することが分かった。

以上の結果より fibin は、ゼブラフィッシュ胚の胸びれ形成において必須の役割を果たしていることが明らかとなった。さらに詳細な研究の結果、fibin は RA や *wnt2b* の下流因子として機能し、*tbx5* の発現誘導・発現維持に関わっていることが明らかとなった。また fibin はマウス胎児の前肢芽に高発現していることから、哺乳動物の前肢形成においても同様の役割を果たしていることが示唆される。本研究が四肢形成機構の解明に繋がるだけでなく、このような形態形成の研究が再生医療などの分野に応用されることが期待される。

よって、本論文は博士(薬学)の論文として価値のあるものと認める。さらに、平成19年3月1日に論文内容とそれに関連した事項について試問を行った結果、合格と認定した。