

氏 名	さくら ぎ まこと 櫻 木 誠
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 2959 号
学位授与の日付	平 成 18 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	医 学 研 究 科 脳 統 御 医 科 学 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	Functional Analysis of Chick ONT1 Reveals Distinguishable Activities among Olfactomedin-Related Signaling Factors (ONT1 との比較による Olfactomedin 関連分泌因子群の活性の多様性の解析)
論文調査委員	(主 査) 教 授 影 山 龍 一 郎 教 授 金 子 武 嗣 教 授 伊 藤 壽 一

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物の組織発生は、分泌性因子によって媒介される様々な細胞間相互作用によって制御されていることが知られている。Olfactomedin family は最近明らかになった細胞外タンパク質群である。以前の研究では、そのうちの1つである Tiarin が両生類中枢神経組織の背側部分の発生を制御することが明らかにされた。また、別の報告では、Olfactomedin family 因子 Noelin はニワトリ胚背側に発現し神経堤細胞発生を促進することが明らかにされた。しかしこれまでに Olfactomedin family 因子の作用機序に関する知見はほとんどなかった。

本研究では、PCR を利用したスクリーニングにより、ニワトリ初期胚に発現する新規 Olfactomedin family 因子 Olfactomedin-Noelin-Tiarin protein 1 (ONT1) を単離した。ONT1 は、ヘンセン結節に発現を開始し、その後に中軸中胚葉、沿軸中胚葉に発現していた。また、神経管が閉じる発生段階においては、中脳前部から後脳までの蓋板に一過性に強く発現していた。

このように神経堤細胞発生の時期に、その発生部位である蓋板に ONT1 は発現することから、中脳部にエレクトロポレーション法による強制発現を行い、ONT1 の神経堤細胞への作用を解析した。ONT1 の強制発現により、神経堤細胞特異的分子マーカーである Sox10, FoxD および Slug が蓋板近傍に異所性に発現した。

さらに、神経管内の細胞を経時的に標識し、神経堤細胞が神経管から遊出する時期を解析した。その結果、ONT1 の強制発現により、遊出期間が延長され、神経堤細胞の発生が促進されていることが判明し、神経堤細胞マーカーの異所性の発現は遊出の延長に伴った現象であることが示された。同様の活性は同じ family に属する Noelin の強制発現の表現型としても報告されている。これらのことは、ONT1 と Noelin が少なくとも一部は共通した活性を持ち、in vivo において ONT1 と Noelin は共に神経堤細胞の発生を量的に制御することを示唆する。

次に、ONT1, Noelin, Tiarin の3因子間の生物学的活性に差異があるのかを検討した。ニワトリ胚での ONT1 の強制発現により、神経堤細胞後期マーカーである HNK-1 の発現は抑制されたが、逆に Noelin および Tiarin の強制発現では異所的発現が誘導された。

さらに、より詳細に活性の差異について検討するために、多数の分化マーカーでの解析が可能であるアフリカツメガエル胚を用いた実験を行った。mRNA の微量注入による外胚葉での強制発現により、3因子の全てが神経マーカー Zic1 の異所的な発現を誘導する活性を共通に有していた。しかし、3因子間で誘導活性に差異が見られる分化マーカーも複数存在した。例えば、ONT1 は神経胚期における神経堤マーカー FoxD3 の発現を誘導し、逆に、Noelin および Tiarin は抑制した。また、Tiarin は尾芽胚期における神経堤マーカー ETS の発現を抑制したが、逆に ONT1 および Noelin は発現を誘導した。また、中枢神経組織に対しては、Tiarin は強い背側化活性を、Noelin は弱い背側化活性を有していたが、他方 ONT1 は背側化活性を示さなかった。このように、同じ実験系での分化マーカーの誘導に関して、3因子は共通する活性と互いに異なる活性を持つことが明らかとなった。

以上により、1) ONT1 が神経堤細胞発生の促進因子であること、2) Olfactomedin family 因子内に活性の多様性が存在すること、が本研究によって示された。Olfactomedin family 因子間の活性の相違は単一の受容体のみによるシグナル伝達では説明しがたい現象であり、このことから Olfactomedin family 因子への応答系の多様性が示唆された。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の組織発生制御には、分泌性因子が媒介する細胞間相互作用が重要な働きをしている。近年単離された Olfactomedin family 因子は、こうした分泌性因子の一例であるが、その作用機序には未だ不明な点が多い。

本学位申請者は、ニワトリ初期胚に発現する新規 Olfactomedin family 因子、ONT1 を単離し、その活性を解析した。ONT1 は神経堤が発生する時期に、中脳前部から後脳までの蓋板に一過性に発現していた。電気穿孔法による中脳部での ONT1 の強制発現は、初期神経堤マーカーを異所性に発現させた。また、細胞標識実験によって神経堤産生の延長が示され、ONT1 が神経堤細胞発生の促進因子であることが明らかになった。同様の活性は同ファミリーに属する Noelin でも報告されている。

次に、ONT1 と、同ファミリーに属する Noelin, Tiarin の間の活性の差異を検討した。ニワトリ胚での強制発現により、前二者間に神経堤細胞後期マーカーの発現制御に差異が認められた。さらに、三因子のアフリカツメガエル胚での強制発現実験によって、神経および神経堤分化制御の活性に多様性が認められた。これらは Olfactomedin family 因子への応答系の多様性を示唆した。

以上の研究は分化制御シグナルの多様性の解明に貢献し、発生メカニズムの理解に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成18年1月24日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。