

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 梶村真吾

脊椎動物の初期発生は、緻密な遺伝プログラムによって支配されると同時に、様々な環境要因によっても大きく影響を受ける。環境中の酸素濃度は初期発生に影響を及ぼす大きな要因の1つである。細胞の分化や増殖の促進作用をもつ IGF (insulin-like growth factor) は脊椎動物の初期発生に不可欠な因子であるが、IGF 結合タンパク質(IGF-binding protein, IGFBP)の1つ、IGFBP-1 は IGF に結合することで IGF の作用を制御し、低酸素下における IGFBP-1 の上昇が胚の発生と成長の抑制因子として関与することが示唆されている。近年のゲノム情報の解読によって、IGF システム (IGF, IGF 受容体、IGFBPs) は脊椎動物全般に進化上よく保存されていることが明らかになり、ゼブラフィッシュを用いた比較内分泌・生理学的アプローチは、魚類のみならず脊椎動物一般に普遍的な生理機構の知見をもたらすことができると考えられる。そこで、本研究ではゼブラフィッシュ胚を脊椎動物の初期発生の1つのモデルとして用い、初期胚の発生環境における低酸素がどのように感知され、IGF システムを介して脊椎動物の胚発生と成長に影響するのかを検討した。

1. IGFBP-1 は低酸素に起因する胚発生と成長遅滞の誘起に重要な因子である。

ゼブラフィッシュ初期胚を低酸素(0.5mg/l O₂)に24時間曝すと、正常酸素濃度(6-7mg/l O₂)と比較して、胚の発生と成長が著しく遅滞した。その際、低酸素下において IGFBP-1 の遺伝子発現とタンパク量が特異的に増加したが、リガンド(IGF-1,2)や受容体、その他の IGFBPs に有意な変化は見られなかった。そこで、特異的に上昇する IGFBP-1 が低酸素に起因する胚発生と成長遅滞にどのように関与しているかを明らかにするため、まず IGFBP-1 に特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴを微量注入し、正常酸素下ならびに低酸素下において内因性 IGFBP-1 をノックダウンした。正常酸素下では、IGFBP-1 のノックダウンによる明らかな表現型は観察されなかったが、低酸素下において IGFBP-1 をノックダウンすると、低酸素により惹起される発生と成長の遅滞がおよそ60%改善された。次に、低酸素下で内因性 IGFBP-1 をノックダウンした胚に、外因的に IGFBP-1 を過剰発現させると発生と成長が遅滞した。また、IGFBP-1 の過剰発現は正常酸素下においても発生と成長の遅滞を誘起することから、IGFBP-1 はゼブラフィッシュ胚の低酸素による発生と成長の遅滞を誘起する重要な因子であることが示唆された。

さらに IGFBP-1 の作用機序を明らかにするため、胚由来の細胞株 (zf4) を用いて IGFBP-1 の細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。IGF-1, -2(100ng/ml)の添加により zf4 細胞株の細胞増殖は有意に増加したが、IGFs と等モル量の IGFBP-1 を加えると IGFs による細胞増殖

はおよそ 60% 抑制された。この IGFBP-1 による IGF 依存的な細胞増殖能の抑制は、過剰量の IGFs を加えることにより濃度依存的に消失した。以上の結果から、低酸素環境により特異的に誘導される IGFBP-1 は IGF と複合体を形成し、IGF 依存的な細胞増殖を抑制することで低酸素に起因する発生と成長遅滞に関与すると考えられる。

2 . 低酸素は、HIF-1 経路を介して IGFBP-1 の発現を誘導する。

低酸素が IGFBP-1 の発現を誘導する分子機構の解明の端緒として、まず IGFBP-1 遺伝子上流域約 3kb を単離した。IGFBP-1 の上流域には 13 個の HIF-1 結合配列、hypoxia-response element (HRE) が存在した。HIF-1 は α, β サブユニットから成るヘテロダイマーの転写因子であり、CBP/p300 との共役により低酸素下において標的遺伝子の発現を制御することが知られている。ゼブラフィッシュにおいても、HIF-1 α, β サブユニットは共に胚発生過程においてほぼ全ての細胞で発現していたが、低酸素下において発現が上昇した。さらに、培養細胞系ならびに個体レベルにおいて、HIF-1 α の過剰発現は IGFBP-1 遺伝子の発現を誘導した。以上から、ゼブラフィッシュの初期発生過程において、低酸素による IGFBP-1 の遺伝子発現誘導は HIF-1 を介することが明らかとなった。

次に、HIF-1 がどのような分子機構で IGFBP-1 の遺伝子発現を誘導するのかを明らかにするために、ゼブラフィッシュ IGFBP-1 遺伝子のプロモーター領域に存在する HRE の様々な欠損変異体・点変異体を作成し、ゼブラフィッシュ肝臓由来の培養細胞株 (ZFL) ならびにヒト肝細胞株 (HepG2) を用いてシスエレメントの同定を行った。その結果、13 個存在する HRE のうち唯一つの HRE (-1090/-1086) に HIF-1 が物理的に結合することが、HIF-1 を介した低酸素による IGFBP-1 遺伝子発現の誘導には必要であることが明らかとなった。また、上記の知見を個体レベルにおいても検証された。

以上の結果、低酸素環境により惹起される IGFBP-1 の上昇は IGF 依存的な細胞増殖を抑制し、これが低酸素に起因する胚発生と成長遅滞の重要な原因の 1 つであること、また初期発生時において低酸素環境は転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 を介して IGFBP-1 の発現を誘導することを細胞および個体レベルで明らかにした。

本研究は、ゼブラフィッシュを用いた発生学・遺伝学的アプローチを内分泌学に取り入れることにより、HIF-1 経路を介して低酸素下で誘導される IGFBP-1 が初期発生時における低酸素環境への適応メカニズムの一つとして重要な役割を果たすことを明らかにしたものであり、学術上、応用上寄与するところが大きい。よって審査委員一同は本論分が博士(農学)の学位論文として価値あるものと認めた。