

論文の内容の要旨

論文題目 メダカ肝臓形成異常変異体 *hiohgi* (*hio*)の解析

氏名 根岸 崇大

【序】

肝臓は、消化酵素や胆汁の合成を行うことに加え、糖や脂質、アミノ酸の貯蔵や薬物代謝、解毒作用、血糖値など恒常性の維持といった生体内において生命の維持に必須な多数の機能を有する臓器である。肝臓の発生に関わる遺伝子の多くはノックアウトマウスを用いた研究により単離されてきた。しかしながら、この方法では既知の遺伝子についての情報を得ることは可能であるが、肝発生に関わる新規の遺伝子を単離することは困難である。

メダカを始めとする小型魚類は卵生で胚が透明であるため、肝臓や脾臓、胆嚢といった内臓の発生過程を実体顕微鏡下で容易に観察することができる（図 1）。また、多産で毎日産卵し、孵化まで7日前後と発生が速やかに進行することに加え、順遺伝学的なスクリーニングが比較的容易に行えることから、脊椎動物の発生過程を研究するモデル生物として優れた特徴を有していると言える。当研究室では、肝臓の発生において重要な役割を担う遺伝子を同定する目的で、メダカを用いて変異体のスクリーニングを行った。その結果、肝臓の発生や機能に異常を呈する 19 系統の変異体を単離することに成功した。私は、そのうちの 1 つである *hiohgi*

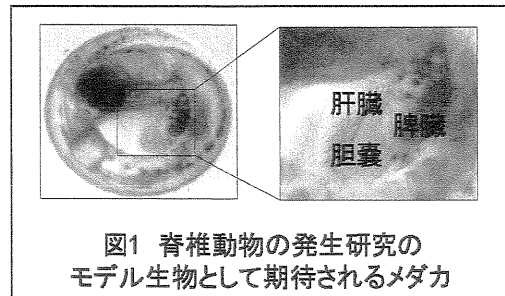


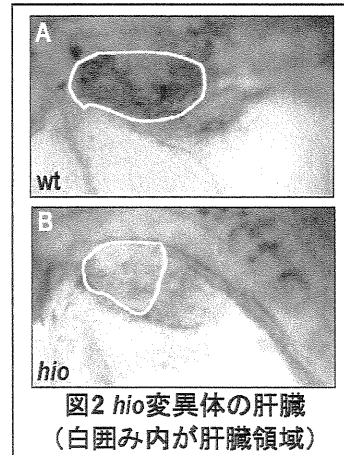
図1 脊椎動物の発生研究の
モデル生物として期待されるメダカ

(*hio*)変異体について、原因遺伝子の同定および表現型の解析を行った。その結果、肝臓の形成において重要な役割を担うシグナル経路について新たな知見を得たので、報告する。

【結果】

1. *hiohgi*変異体は肝臓の形態形成異常及び胸びれ欠失の表現型を呈する

hio 変異体は、実体顕微鏡下での観察により、肝臓のサイズが小さく奇形を呈する変異体として単離された(図2)。肝臓のマーカーである *gata-6* 遺伝子に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行ったところ、*hio* 変異体では、*gata-6* 発現領域のうち肝臓領域が野生型に比べ縮小している様子が観察された。これらのことから、*hio* 変異体は肝臓のサイズが小さい変異体であることが明らかとなった。さらに、*hio* 変異体では胸びれが欠失するというもう1つの表現型が見られた。



2. *hiohgi*変異体の原因遺伝子は *retinaldehyde dehydrogenase type 2*である

hio 変異体の原因遺伝子を同定する目的でポジショナルクローニングを行った。その結果、*hio* 変異体は、*retinaldehyde dehydrogenase type 2*(*raldh2*)遺伝子中にミスセンス変異が存在することが明らかになった。RALDH2を含むRALDHファミリーは、*all-trans* レチノイン酸を合成する反応を触媒する主要な酵素であることが知られている。*hio* 変異体の原因遺伝子が *raldh2* であることを確かめるために以下の2つの実験を行った。まず、野生型胚に対して *raldh2* 遺伝子に対するモルフォリノアンチセンスオリゴ(MO)をインジェクションし、RALDH2の発現を抑制した。その結果、MOをインジェクションした胚において、*hio* 変異体と同様に、肝臓の縮小、胸びれの欠失の両表現型が同時に観察された。次に、*hio* 変異体に野生型 *raldh2* のmRNAをインジェクションし、その表現型が回復するかどうかを検討した。その結果、*raldh2* mRNAをインジェクションした群において、胸びれでは顕著に、また肝臓でも胸びれよりは弱いながらも表現型の出現率の回復が見られた。これらの結果から、*hio* 変異体は *raldh2* のミスセンス変異によりRALDH2の機能を欠失し、その結果、肝臓及び胸びれの形成に異常を呈したものと考えられた。

3. *hiohgi*変異体では胸びれ形成に必須の因子の発現が消失している

ゼブラフィッシュを用いた研究から、胸びれの形成は、体節中胚葉領域でRALDH2により合成されたレチノイン酸が、*wnt2b*、*tbx5* といった遺伝子の発現を誘導し、これらの因子により胸びれの原基が形成されることにより起こるということが報告され

ている。そこで、*hio* 変異体でも同様なメカニズムにより胸びれ形成が不全となっているかどうかを検討した。まず、*raldh2* 遺伝子に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行い、胸びれ原基の形成が行われる時期の野生型胚における *raldh2* の発現を調べた。その結果、受精後 38 時間に、体節中胚葉領域において *raldh2* の強い発現が見られた。次に、レチノイン酸の下流で誘導される胸びれ形成に必須の因子 *tbx5* 遺伝子に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。その結果、受精後 44 時間において、野生型で見られる胸びれ原基における *tbx5* の発現が、*hio* 変異体では完全に消失していた。このことから、*hio* 変異体でも、RALDH2 の機能欠失によりレチノイン酸の合成ができなくなった結果、胸びれの形成不全が起きるものと考えられた。

4. *hiohgi* 変異体では肝臓の出芽が遅れる

肝臓は、腸管上の幹細胞が中胚葉からのシグナルを受け出芽し、その後、この領域で肝臓の構成細胞である肝実質細胞、胆管細胞への分化、成熟が起こり、最終的に脂質代謝などの機能を持った成体肝へと成長していく。そこで、*hio* 変異体における肝臓形勢異常が起こり始める時期を検討する目的で、内胚葉マーカーである *foxA3* 遺伝子に対するプローブを用いた *in situ* hybridization を行った。その結果、*hio* 変異体の肝臓は野生型に比べ出芽過程が遅れていることが明らかとなった(図 3)。一方で、*hio* 変異体において、肝臓の構成細胞への分化や肝臓の機能に関しては野生型との間に差は見出せなかった。以上の結果より、*hio* 変異体の肝臓では出芽過程が遅れが生じるものの、その後の分化、成熟過程は正常に起こっているものと考えられた。

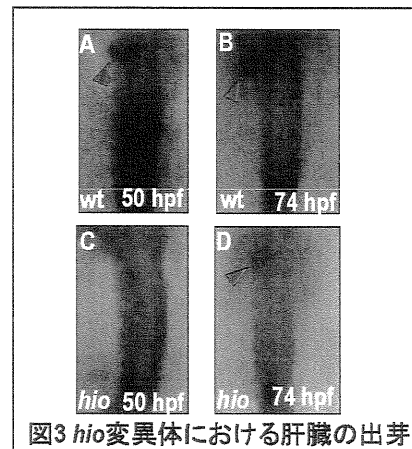


図3 *hio*変異体における肝臓の出芽

5. レチノイン酸は *wnt2bb* の発現を介して肝臓の特異化を促進する

近年、ゼブラフィッシュにおいて、肝臓の出芽が遅れる変異体 *prometheus* が単離され、この変異体の原因遺伝子である *wnt2bb* は、側板中胚葉領域で発現、分泌されることで腸管からの肝臓の出芽を誘導することが報告された。レチノイン酸合成量が低下した *hio* 変異体とゼブラフィッシュで報告された *wnt2bb* 変異体は、ともに肝臓の出芽が遅れる。また、*wnt2bb* のアイソフォームである *wnt2b* は胸びれ形成においてレチノイン酸の下流で発現が誘導されることが知られている。これらのことから私は、*wnt2bb* もレチノイン酸によって遺伝子発現が誘導され、その結果として肝臓の出芽が起こるのではないかと考え、この可能性について検討した。

まず、肝臓の出芽が起こる時期の *raldh2* 遺伝子の発現を *in situ* hybridization により検討した。その結果、肝臓の出芽が起こる受精後 50 時間においては、胸びれ形成期の受精後 38 時間では観察されなかった側板中胚葉領域で *raldh2* の発現が上昇していることが観察された。さらに、この RALDH2 が合成したレチノイン酸によって *wnt2bb* の発現が誘導されるのかどうかを調べるために、*wnt2bb* 遺伝子に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行い、*hio* 変異体における *wnt2bb* の発現を検討した。その結果、*hio* 変異体では野生型で見られる側板中胚葉領域における *wnt2bb* の発現が完全に消失していた(図 4)。このことから、肝臓の出芽を促す *wnt2bb* の側板中胚葉における発現は同じ領域で合成されたレチノイン酸により誘導されていることが示された。

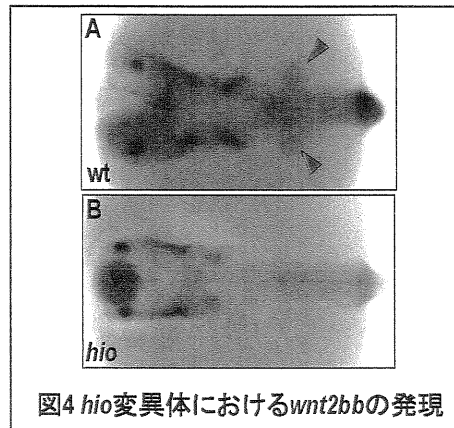


図4 *hio*変異体における*wnt2bb*の発現

【まとめ】

本研究において私は、レチノイン酸合成酵素 RALDH2 の機能欠失メダカ変異体を単離し、この変異体が肝臓及び胸びれの形成過程に異常を呈すること、レチノイン酸は側板中胚葉領域における *wnt2bb* の遺伝子発現を介して肝臓の出芽を促進する働きを持つことを示した。

胸びれ形成においては、RALDH2 は受精後 38 時間頃に体節中胚葉領域でレチノイン酸を合成し、このレチノイン酸が、胸びれ原基における *tbx5* などの遺伝子の発現を誘導する。これに対し、胸びれ形成よりも後に起こる肝臓形成においては、受精後 50 時間ごろに側板中胚葉領域に新たに発現してくる RALDH2 がこの領域でレチノイン酸を合成する。これが同じ領域での *wnt2bb* の発現を誘導し、腸管からの肝臓の出芽が促される。胸びれや肝臓は近接した場所に存在する器官であるが、レチノイン酸は合成される場所が時期によって特異的に制御されることで、同じシグナルを用いて2つの異なる器官の形成制御を可能にしているものと考えられる(図 5)。

本研究は、これまで明らかではなかった肝発生におけるレチノイン酸の重要性を明らかにした初めての研究であり、今後、*hio* 変異体の更なる解析により、レチノイン酸による肝臓形成制御に関わる詳細な分子メカニズムが解明されるものと考えている。

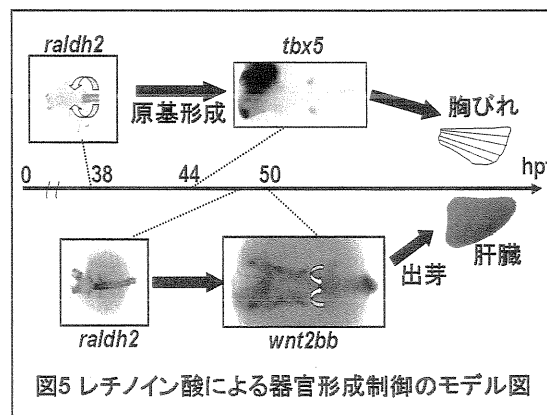


図5 レチノイン酸による器官形成制御のモデル図