

審査の結果の要旨

氏名 根岸 崇大

肝臓は、消化酵素や胆汁の合成に加え、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、肝臓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。「メダカ肝臓形成異常変異体 *hiohgi* (*hio*) の解析」と題した本論文においては、肝臓の形態に異常を呈するメダカ変異体 *hio* について、その原因遺伝子の同定および表現型の解析を行い、肝臓の形成においてレチノイン酸シグナルが重要な役割を担うことを見出している。

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、肝臓に異常を呈する変異体として単離された。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* 変異体は肝臓が小さい変異体であることが明らかとなった。さらに、この変異体では胸びれが欠失するという別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い、*hio* 変異体の *retinaldehyde dehydrogenase type 2* (*raldh2*) 遺伝子中にミスセンス変異が存在することを同定した。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* 変異体に野生型 *raldh2* mRNA を注入したところ、肝臓形成異常及び胸びれ欠損の両表現型が回復した。また、野生型胚に対して *raldh2* に対するモルフォリノアンチセンスオリゴを注入して *raldh2* の発現を抑制すると、*hio* 変異体と同様に肝臓の形成異常及び胸びれの欠損が同時に観察された。以上の結果より、*hio* 変異体の原因遺伝子が *raldh2* であることが示された。また、モルフォリノによる発現抑制が *hio* 変異体と同等の表現型を示したことから、*hio* 変異体における *raldh2* のミスセンス変異はレチノイン酸合成能の低下を引き起こし、その結果、肝臓及び胸びれの形成に異常が生じ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、胸びれの形成はレチノイン酸の下流での *wnt2ba* の発現を介して制御されていることが報告されている。*wnt2ba* は *tbx5* の発現を肢芽において誘導することにより胸びれの形成が起こる。そこで、レチノイン酸の下流で働く *tbx5* に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行い、*hio* 変異体におけるレチノイン酸シグナルの有無を検討した。その結果、*hio* 変異体において *tbx5* の発現が消失していることが観察された。このことから、*hio* 変異体は RALDH2 の機能欠失によりレチノイン酸シグナルが低下しており、その結果、レチノイン酸の下流で胸びれ形成に関わる遺伝子の発現が消失することにより、胸びれの形成が不全になることが示された。

### 4. レチノイン酸は *wnt2bb* の発現を介して肝臓形成を誘導する

肝臓は中胚葉からの誘導を受けた腸管から肝臓原基が出芽し、その後増殖・分化することで発生する。*hio* 変異体における肝臓形態形成異常がどの時期から起こり始めるかを検討する目的で、肝発生の初期より発現が見られる内胚葉マーカー *foxA3* に対するプローブを用いて *in situ* hybridization を行った。その結果、*hio* 変異体では野生型胚に比べ肝原基の出芽が遅れることを見出した。しかしながら、*hio* 変異体の肝臓は野生型からは遅れて成長を続けていた。さらに、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ず、RALDH2 は肝原基の出芽段階に特異的に機能していることが明らかにされた。

近年、ゼブラフィッシュの *wnt2bb* の変異体における解析から、側板中胚葉から分泌される *wnt2bb* が腸管からの肝臓原基の出芽を誘導すること、及び *wnt2bb* 変異体において、肝臓発生に遅れが生じることが報告された。一方で、メダカ野生型胚において *raldh2* の発現を *in situ* hybridization により検討したところ、側板中胚葉で強く発現が見られた。これらのことから、レチノイン酸が *wnt2bb* の遺伝子発現を制御しているのではないかと考え、*wnt2bb* 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* 変異体においては野生型で見られる側板中胚葉領域における *wnt2bb* の発現が消失していることが観察された。このことから、肝臓の出芽を誘導する *wnt2bb* の側板中胚葉における発現はレチノイン酸によって制御されていることが明らかにされた。

本論文では、肝臓の形態形成に異常を呈するメダカ変異体を用いて、レチノイン酸合成酵素 RALDH2 が肝臓の腸管からの出芽過程を促進的に制御していることを明らかにし、レチノイン酸が *wnt2bb* 遺伝子の発現を介して肝臓の形態形成過程を制御しているというモデルが提示された。以上を要するに、本論文は、これまで不明な点が多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、博士（薬学）の学位として十分な価値があるものと認められる。