



Title	Asymmetric p38 activation in zebrafish : its possible role in symmetric and synchronous cleavage
Author(s)	藤井, 律子
Citation	大阪大学, 2001, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42644
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	藤 井 律 子
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 6 0 5 1 号
学 位 授 与 年 月 日	平 成 13 年 3 月 23 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科病理系専攻
学 位 論 文 名	Asymmetric p38 activation in zebrafish : its possible role in symmetric and synchronous cleavage (ゼブラフィッシュp38 MAP キナーゼの非対称的な活性化とその役割)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 長田 重一 教 授 祖父江憲治

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

p38MAP キナーゼは真核細胞において様々な環境ストレスや炎症性サイトカインにより活性化されることが知られている。しかし、脊椎動物の初期発生における p38 の役割は明らかにされていない。そこで本研究ではゼブラフィッシュ系をもちいて脊椎動物の発生初期における p38MAP キナーゼの機能解析を試みた。

【方法ならびに結果】

(1)p38MAP キナーゼおよび MKK 3 の cDNA クローニング

ゼブラフィッシュの受精後18時間の cDNA ライブラリーよりゼブラフィッシュ p38a、p38b、および p38MAP キナーゼの上流キナーゼである MKK 3 の cDNA を単離した。ゼブラフィッシュの p38a、p38b、および MKK 3 はアミノ酸配列において各々ヒトのホモログと86%、64%、および77%の相同性を有していた。ゼブラフィッシュの P38a と MKK 3 はともに母性遺伝子として均一に発現しているが p38b は受精後24時間までほとんど発現していなかった。したがってゼブラフィッシュでは p38a がドミナントに機能していると考えられた。

(2)卵割期における p38MAP キナーゼの活性化パターン

卵割期における p38MAP キナーゼの活性化パターンを調べるために特異的に活性型 p38MAP キナーゼを認識する抗体 (anti-ACTIVE™ p38 antibody) を用いて免疫染色を行った。卵割期において p38 は胚盤上に均一に分布しているにもかかわらず2細胞期では第一卵割の分裂面とは無関係に胚盤の片側のみで活性化されていた。またこの非対称的な活性化は16細胞期に入ると消失した。

(3)ドミナントネガティブ変異型 p38MAP キナーゼによる機能解析

p38a と MKK 3 のドミナントネガティブ変異型 RNA を合成し、1細胞期の受精卵に注入して均一に発現させた。こうして p38MAP キナーゼの活性化を抑制すると DNA 合成は正常に起こるが胚盤の片側のみで細胞質分裂が阻害されていた。またこの細胞質分裂の阻害は p38MAP キナーゼの活性化パターンと同様に第一卵割の分裂面とは無関係なところで起こっていた ($n=322$, d.f. = 1, $\chi^2=41.789$, $P<0.001$)。さらに2細胞期の細胞の片方にドミナントネガティブ変異型 RNA とトレーサー色素を共注入すると細胞質分裂が阻害された領域は常にトレーサー色素を含む細胞群と一致していた。この結果、p38 が細胞自律的に胚盤片側での細胞質分裂を制御していることが示された。

(4)ドミナントネガティブ変異型 p38MAP キナーゼによる細胞質分裂阻害は将来の背側で起こる

ドミナントネガティブ変異型 p38を発現させた受精卵を細胞の mixing が起こる以前（受精後約3.3時間）に固定し、背側マーカーである *dharma* 遺伝子のプローブを用いて *in situ hybridization* を行なった。すると、*dharma* 遺伝子を発現している細胞は常に細胞質分裂が阻害された細胞群の中に認められた（100%、n=106）。このことから将来の背側で p38が活性化される可能性が示唆された。

(5)p38MAP キナーゼの活性化は背側化シグナルに依存する

ゼブラフィッシュでは受精後20分以内に卵黄表層に微小管が形成される。ゼブラフィッシュの背側化にはこの微小管によって植物極に存在する背側化因子が将来の背側へと輸送されることが必要である。また UV 照射により受精直後の微小管形成を阻害したり、あるいは1細胞期に植物極側の卵黄を除去すると受精卵は腹側化する。同様に UV 照射や植物極側の卵黄を除去すると卵割初期に見られた p38の活性化が消失したことから、p38の活性化が卵黄植物極に存在する背側化因子や卵黄表層の微小管形成に依存していることが示唆された。

【総括】

ゼブラフィッシュ p38は卵割初期に非対称的に活性化されることがはじめて示されたシグナル伝達分子である。本研究は p38の非対称的な活性化がゼブラフィッシュの対称的かつ同調的な卵割に必須であり、同時にこの非対称的な活性化が背側化シグナルと同じメカニズムで制御されていることを明らかにした。

論文審査の結果の要旨

本研究はゼブラフィッシュ系を用いて脊椎動物の初期発生における p38MAP キナーゼシグナル伝達経路の機能を解析したものである。ゼブラフィッシュの受精卵の cDNA ライブラリーより p38a、p38b、および MKK 3 をクローニングし、その発現パターンを調べた結果、ゼブラフィッシュの p38a と MKK 3 はともに母性遺伝子として均一に発現していた。また、卵割期において p38タンパクは胚盤上に均一に分布しているにもかかわらず、その活性化は2細胞期から8細胞期までの間、第1卵割の分裂面とは無関係に胚盤の片側のみで起きていた。つぎに、ドミナントネガティブ変異型や p38の特異的阻害剤で内在性の p38の活性化を抑制すると DNA 合成は正常に起こるが細胞質分裂は胚盤の片側のみで細胞自律的に阻害された。さらにドミナントネガティブ変異型により細胞質分裂が阻害された細胞群の中で常に背側マーカーである *dharma* 遺伝子の発現が認められることや、背側化シグナルを抑制すると2細胞期より見られる p38の活性化が消失することから卵割初期の p38の非対称的な活性化が将来の背側で起こることを示した。ゼブラフィッシュは脊椎動物のモデルとして今後も注目される実験系であり、ゼブラフィッシュの MAP キナーゼファミリーを同定し、これを発生初期において解析した意義は大きい。また、p38MAP キナーゼが卵割初期において非対称的に活性化されることを示し、卵割期において非対称に活性化されるシグナル分子の存在を初めて明らかにした。以上の成果は背側化シグナルと MAP キナーゼシグナル伝達経路との関連性を初めて示したものであり、脊椎動物の体軸形成を理解する上での基本的な概念を呈示したことは学位に値いすると考える。