The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Ogon/Secreted Frizzled functions as a negative feedback regulator of Bmp signaling
Author(s)	矢部, 泰二郎
Citation	大阪大学, 2003, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45362
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、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

【11】

氏　　名	矢　部　泰二郎（やべ　たいじろう）
博士の専攻分野の名称	博　士（医　学）
学　位　記　番　号	第　１８０４９　号
学位授与年月日	平成 15 年 6 月 27 日
学位授与の要件	学位規則第４条第１項該当 医学系研究科分子病態医学専攻
学　位　論　文　名	Ogon/Secreted Frizzled functions as a negative feedback regulator of Bmp signaling （Ogon/Secreted Frizzled は BMP シグナル伝達の負のフィードバック制御因子として機能する）
論　文　審　査　委　員	（主査） 教　授　平野　俊史 （副査） 教　授　近藤　寿人　　教　授　濱田　博司

論　文　内　容　の　要　旨

〔　目　　的　〕

魚類や両生類の初期発生において受精直後に背側決定因子が予定背側領域に移動し、母性 Wnt 細胞内シグナルを活性化することにより、オーガナイザーが形成される。その後、腹側領域において発現する BMP と、オーガナイザーから分泌される抗 BMP 因子（Chordin、Noggin、Follistatin）の拮抗作用により形成された BMP 活性の勾配により、背腹軸に沿ったパターン形成が行われると考えられている。申請者は、背腹軸に沿ったパターン形成の分子機構を詳細に明らかにするため、ゼブラフィッシュを用いた遺伝学的な解析を行った。

〔　方法ならびに成績　〕

AB 株の野生型ゼブラフィッシュの雄魚を ENU で処理し、精原細胞の染色体遺伝子に点変異を導入した。その雄魚を AB 株野生型雌魚と交配し、F1 個体を作成した。F1 雌魚から卵を取り出し、紫外線照射により遺伝子を不活性化した精子と受精させ、半数体 F2 胚を作成し、初期体節形成期の神経外胚葉のパターン形成に異常を示す変異体をスクリーニングした。753 匹の F1 雌魚をスクリーニングし、神経外胚葉の縮小という腹側化表現型を示す変異体を２系統単離した。相補テストの結果それらは既知の変異体 *dino*(*din*)変異体と *ogon*(*ogo*)変異体の新規 allele（$dino^{rk2}$、$ogon^{rk1}$）であることが明らかになった。*din* 変異体はオーガナイザーから分泌される抗 BMP 因子の１つである *chordin*（*chd*）遺伝子を欠損することが知られている。一方、*ogo* 変異体は抗 BMP 因子を欠損することが予測されていたが、その責任遺伝子は未同定であり、*ogo* 変異体の責任遺伝子のポジショナルクローニングを試みた。AB 株とは遺伝的多型性を示す india 株を用いた ogo^{rk1} の連鎖解析、およびゼブラフィッシュゲノム BAC、PAC クローンを用いた genomic walking を行い、ogo^{rk1} 変異体の変異領域を含む PAC クローンを単離した。得られた PAC クローンのインサートをプローブとして、ゼブラフィッシュ原腸胚 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、*ogo* 変異領域近傍にコードされる３つの遺伝子を単離した。その内の１つは *Xenopus sizzled* のゼブラフィッシュ相同遺伝子（*zsz1*）をコードしていた。適量の *zsz1* RNA の導入により ogo^{rk1} の表現型を回復した。モルフォリーノアンチセンスオリゴヌクレオチドにより *zsz1* 遺伝子の機能を阻害した胚は、*ogo* 変異体に酷似した表現型を示した。また、ogo^{rk1}

では *zsz1* 遺伝子の第一イントロンのスプライシングドナーに変異が認められ正常なスプライシングがされておらず、*ogo*^{tm305} においては機能的に重要と考えられるシステインリッチドメイン内に変異が見出され、変異タンパクは正常に機能できないことが明らかとなった。以上のことより *ogo* 変異体の責任遺伝子はゼブラフィッシュ *sizzled* であると考えられた。*ogo/zsz1* を過剰発現した胚は、BMP シグナルを阻害したときに見られる背側化の表現型を示したが、Wnt シグナルを阻害したときに見られる神経外胚葉前方化の表現形は見られなかった。またゼブラフィッシュ胚において *ogo/zsz1* は *wnt8* による *bozozok/dharma* 遺伝子の発現誘導を阻害することができず、*zsz1* は Wnt シグナルではなく BMP シグナルを特異的に阻害すると考えられた。また、*ogo/zsz1* RNA を *din* 変異ホモ接合体に導入したところ、野生型胚で見られるような背側化の活性が見られなかったことから、*ogo/zsz1* の背側化活性は *chd/din* に依存していると考えられた。しかし、*din* ホモ接合体では、*ogo/zsz1* 過剰発現により、*chd/din* の発現に影響を与えないことから、*ogo/zsz1* は *chd/din* の転写に関与していないと考えられた。また、*zsz1* の発現は胞胚期から原腸期にかけて腹側領域に限局して発現しており、その発現は BMP シグナル依存的であった。

〔 総　　括 〕

ogo 変異体の責任遺伝子が、ゼブラフィッシュ *sizzled* であることが明らかになった。*sizzled* は Wnt 受容体 Frizzled の細胞外ドメインと相同性を持つ分泌型タンパクをコードしており、Wnt シグナルの阻害分子として機能すると考えられてきた。しかし、*ogo* 変異体は BMP シグナルが増強された際にみられる腹側化表現型を示すこと、BMP シグナルを阻害することにより表現型を回復できること、が報告されている。本研究において *ogo/zsz1* の過剰発現胚に見られた表現型は、BMP シグナルを阻害した胚で見られる表現型と類似していたことから、Ogo/zSz1 は BMP シグナルの阻害因子として機能していると考えられた。また、*ogo/zsz1* の機能は *chd/din* に依存的であるが、*chd/din* の転写には関与せず、Chd/Din タンパクの機能を修飾するような機能を持つと考えられた。*ogo/zsz1* の発現は BMP シグナルに依存的であり、Ogo/zSz1 は BMP シグナルの negative feed back inhibitor して機能すると考えられた。

論文審査の結果の要旨

魚類や両生類の初期発生において予定背側領域に形成されるオーガナイザーから分泌される抗 BMP 因子と腹側領域で発現する BMP の拮抗作用により背腹軸に沿った BMP 活性の勾配が形成される。この様な BMP 活性の勾配により規定された背腹軸の位置情報を基に適切な位置に様々な組織が分化していくことは、これらの動物の体の複雑な構造が形成されるうえで極めて重要なステップであると考えられている。しかしながら、この様な背原軸のパターン形成に関する分子機構に関しては未だに不明な点が多く残されている。

申請書はこの様な背腹軸に沿ったパターン形成の分子機構を遺伝学的に明らかにすることを目的とし、背原軸形成に異常を示すゼブラフィッシュ変異体のスクリーニングを行い、*ogon* 変異体の新規アレルを同定した。*ogon* 変異体は背側組織の減少という腹側化の表現型を示し背側形成に重要な遺伝子を欠損することが考えられているが、その責任遺伝子は未だに未同定であった。申請書は *ogon* 変異体のポジショナルクローニングを行い、責任遺伝子として WNT レセプターFrizzled の細胞外領域と相同性を持つ分泌タンパクをコードするゼブラフィッシュ *sizzled* ホモログを同定した。更に解析を行った結果、Ogon/Sizzled はゼブラフィッシュ胚において BMP インヒビターChordin 依存的な背側化の活性を示し、Ogon/Sizzled は Chordin と協調的に BMP シグナルを抑制する機能を持つことが明らかになった。また、*ogon/sizzlse* mRNA は発生初期において BMP シグナル依存的に腹側領域で発現していたことより、Ogon/Sizzled は BMP シグナル伝達の負のフィードバック制御因子として機能し、ゼブラフィッシュの初期発生において背腹軸に沿った BMP 活性勾配の形成に重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究により得られた成果は脊椎動物の初期発生における背腹軸パターン形成に新しい知見をもたらすものであり、学位の授与に値すると考えられる。