



Title	Genetic evidence for involvement of maternally derived Wnt canonical signaling in dorsal determination in zebrafish
Author(s)	野嶋, 秀明
Citation	大阪大学, 2004, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/45511
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	野 嶋 秀 明 の じま ひで あき
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	第 1 8 9 0 9 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 16 年 4 月 15 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	Genetic evidence for involvement of maternally derived Wnt canonical signaling in dorsal determination in zebrafish (完全腹側化表現型を示すゼブラフィッシュ母性効果変異体 <i>tokkaebi</i> の解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 平野 俊夫 (副査) 教 授 近藤 寿人 教 授 濱田 博司

論 文 内 容 の 要 旨

[目 的]

魚類においては、母性由来の背側決定因子が卵黄植物極に存在し、受精直後に微小管に乗って、将来の背側胚盤細胞に移送され、背側化プログラムが開始すると考えられている。背側化決定因子の本態は不明であるが、Wnt シグナルを活性化し、背側特異的接合遺伝子の発現を介して、背側オーガナイザーを誘導すると考えられている。背側オーガナイザーからの誘導シグナルが、BMP 等の腹側化シグナルと拮抗することにより、背腹軸が形成される。本研究において、申請者は、母性由来の初期背側化シグナルの解明を目的とし、完全腹側化表現型示す新規ゼブラフィッシュ母性効果変異体 *tokkaebi* (*tkk*) を単離し、その解析を行った。

[方法ならびに成績]

変異原 ENU 処理した AB 系統の雄魚を用いた変異体のスクリーニング、及び変異体の継代の過程で、背側組織を完全に欠損した完全腹側化表現型を示す胚を産卵する雌魚(変異体)を得た。この変異の遺伝様式を検討するため、変異体雌魚を、野生型 TL 系統の雄と掛け合わせた結果、約 50%の胚において腹側化表現型が観察された。次の F1 世代同士の掛け合わせでは腹側化表現型胚を産卵する雌は観察されなかった。F2 世代の雌を野生型の雄と掛け合わせたところ、81 匹中 17 匹の雌に腹側化表現型胚を産卵する個体が得られた。以上のことから、この変異 *tkk* は母性遺伝子効果劣性変異体であると考えられた。この表現型の強度・浸透率は、遺伝背景・加齢に依存性を示し、India 系統に比べて TL 系統の遺伝背景を有する変異体、及びより若い雌の方が、完全腹側化表現型胚を多く産卵した。TL 系統の遺伝背景を有し、70%以上の腹側化表現型を示す胚(*tkk* 胚)を産卵する *tkk* ホモ接合体、及びその胚を用いて以下の解析を行った。

tkk 胚では、背側オーガナイザーの形態的指標である胚盾の構造を認めなかった。さらに、背側特異的遺伝子である *bozozok*、*gooseoid* の発現の減弱・消失を認め、腹側特異的遺伝子である *bmp4*、*eve1* の背側への発現の拡大が観察された。また、背側以外の、中・内胚葉特異的遺伝子の発現に異常は認められなかった。以上のことより *tkk* は、初期背側化シグナルに異常を有する変異体であると考えられた。

Wnt シグナルの下流で機能する β -catenin の活性化の指標である、 β -catenin の核での蓄積を、免疫染色法で検討したところ、*tkk* 胚においては β -catenin の背側核での集積が観察されなかった。このことから、*tkk* 胚においては、背側決定因子及びそれによって活性化される Wnt シグナルのどこかで、異常であることを示唆した。

Wnt シグナルのどこに異常を有するかを検討するため、RNA 注入実験を行った。Wnt シグナルの標的遺伝子 *bozozok*、および Wnt シグナルの細胞内因子である Dvl3、GBP、活性化型 β -catenin、ドミナントネガティブ Axin1・GSK3 β の RNA 注入では腹側化表現型を回復できたが、Wnt8、Frizzled8b の RNA 注入では回復できないことが明らかとなった。また、ゼブラフィッシュの初期胚において Ca^{2+} シグナルを thapsigargin で阻害することにより背側化することが知られているが、野生型胚を背側化する濃度の thapsigargin では *tkk* 胚の表現型を十分に回復しなかった。

SSLP マーカーを用いた連鎖解析により、*tkk* 遺伝子座が染色体 16 番上に存在することを見出した。

[総括]

tkk は母性遺伝子効果劣性変異体であることが明かとなった。また、遺伝子発現解析より、*tkk* は中・内胚葉の形成には異常を示さないが、初期背側化シグナルに異常を示す変異体であることが明らかとなった。Tkk 遺伝子産物は、Wnt 経路の内、Dvl/Axin/GSK3 の上流、または平行した経路で、機能している可能性が示唆された。また、Tkk 遺伝子産物は、 Ca^{2+} シグナルが Wnt シグナルに影響を与える位置より下流で機能していると考えられた。これらの結果は、ゼブラフィッシュにおいて、 β -catenin の上流の母性 Wnt/ β -catenin シグナルが背側軸形成において必要であることを、遺伝学的に示すものである。

論文審査の結果の要旨

魚類においては、母性由来の背側決定因子が卵黄植物極に存在し、受精直後に微小管に乗って将来の背側胚盤細胞に移送され、背側化プログラムが開始すると考えられている。背側化決定因子の分子本体は不明であるが、その下流において Wnt シグナルを活性化し、背側特異的接合遺伝子の発現を介して、背側オーガナイザーを誘導すると考えられている。誘導されたオーガナイザーからのシグナルが、BMP 等の腹側化シグナルと拮抗することにより、外胚葉の神経誘導、中胚葉の背側化が引き起こされる。オーガナイザー遺伝子に関しては多くの知見があるが、背側決定因子の実体は不明である。申請者は、母性由来の初期背側化シグナルの解明を目的とし、腹側化表現型を示す新規ゼブラフィッシュ母性効果変異体 *tokkaebi* (*tkk*) の解析を行った。変異原 ENU による変異体のスクリーニング、及び変異体の継代の過程で、背側組織を欠損した強い腹側化表現型を示す胚を産卵する雌魚（変異体）を得た。この変異の遺伝様式を検討した結果この変異体は母性遺伝子効果劣性変異体であることを明らかとした。またこの表現型の強度・浸透率は、遺伝背景・加齢に依存性を示すことを明らかとした。

また、遺伝子発現解析の結果 *tkk* 胚では、背側特異的遺伝子の発現が減弱・消失し、逆に腹側特異的遺伝子の背側への発現の拡大が観察された。さらに、背側以外の、中・内胚葉特異的遺伝子の発現に異常がないことを確認している。以上のことより *tkk* は、初期背側化シグナルに異常を有する変異体であることを明らかとした。

Wnt シグナルの下流で機能する β -catenin の活性化の指標である、 β -catenin の核での集積を、免疫染色法で検討したところ、*tkk* 胚においては β -catenin の核での集積が観察されなかった。このことから、*tkk* 胚においては、背側決定因子及びそれによって活性化される Wnt シグナルに異常があることが示唆された。これを検証するため RNA 注入実験を行った結果、Dvl3 など Wnt シグナルの細胞内因子の RNA 注入では腹側化表現型を回復できたが、Wnt8、Frizzled8b の RNA 注入では回復できないことを明らかとした。また、ゼブラフィッシュの初期胚において Ca^{2+} シグナルを thapsigargin で阻害することにより背側化することが報告されているが、野生型胚を背側化する濃度の thapsigargin では *tkk* 胚の表現型を十分に回復しないことを明らかとした。また、SSLP マーカーを用いた連鎖解析により、*tkk* 遺伝子座が染色体 16 番上に存在することを見出した。これらの結果は、ゼブラフィッシュにおいて、 β -catenin の上流の母性 Wnt/ β -catenin シグナルが背側軸形成において必要であることを、初めて遺伝学的に示すものであり、学位の授与に値すると考えられる。