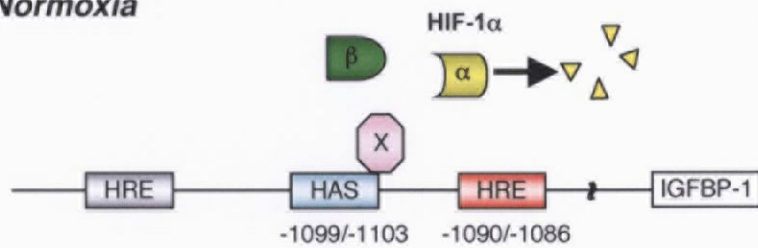


Fig. 3-1. A model how hypoxia causes embryonic growth retardation and developmental delay. IGFBP-1 is induced by hypoxia (1), which presumably reduces “free” forms of IGFs (2). As a consequent, it leads to the reduced IGF-signaling (3) and subsequent suppression of IGF-dependent cell proliferation (4). This suppression in IGF-signaling contributes to the hypoxia-induced embryonic growth retardation and developmental delay (5).

Normoxia



Hypoxia

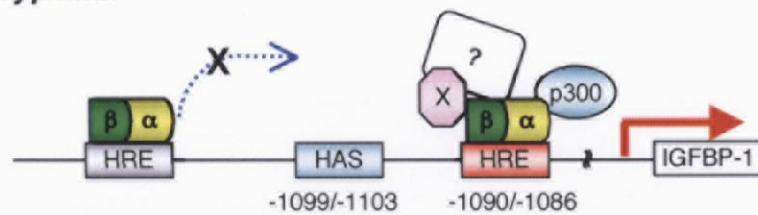


Fig. 3-2. A model how hypoxia triggers IGFBP-1 gene expression. Under normoxic condition, HIF-1 α is targeted for ubiquitination and proteosomal degradation. Protein "X" binds to the HAS region. Under hypoxia, HIF-1 α dimerized with HIF-1 β and translocates to the cell nucleus. HIF-1 that binds to non-functional HREs does not drive IGFBP-1 gene transcription. When HIF-1 binds to the HRE positioned at -1090/-1086, HIF-1 activates the transcription of IGFBP-1 gene cooperatively with protein X and CBP/p300.

SUMMARY IN JAPANESE

脊椎動物の初期発生は、緻密な遺伝プログラムによって支配されると同時に、様々な環境要因によっても大きく影響を受ける。好気性生物全般に酸素は生命活動に不可欠であり、環境中の酸素濃度は初期発生に影響を及ぼす大きな要因の1つである。ヒトにおいて、胎児発育環境中の低酸素状態が子宮内胎児発育遅滞 (IUGR) を惹起する主な原因の一つであることはその良い例であろう。

近年の研究から、IUGR の惹起にはインスリン様成長因子 (insulin-like growth factor, IGF) を介したシグナルが関与することが示唆されている。IGF は細胞の分化や増殖の促進作用をもち、脊椎動物の初期発生に不可欠な因子であるが、低酸素により惹起される IUGR の胎児血清中には IGF の活性を制御する IGF 結合タンパク質 (IGF-binding protein, IGFBP) の1つ、IGFBP-1 が多量に存在することが知られていた。IGFBP-1 は、分泌型タンパク質として IGF に結合することで IGF の作用を制御することが細胞及び個体レベルで知られていることから、低酸素下における IGFBP-1 の上昇が胚の発生と成長の抑制因子として IUGR の惹起に関与することが示唆されていた。しかし、その直接的な因果関係ならびに分子機構の理解は非常に乏しい。

哺乳類モデルでは胎児の発育が母体内で進行するため、胎児発育環境を操作することや、個体レベルで胎児の発生を経時的に観察することが困難である。その一方、ゼブラフィッシュは母体外で胚発生が進行し、胚体が透明であること、さらに遺伝学・発生学的アプローチが可能であることなどから上記の仮説を検証する上でよい実験モデルである。また、近年のゲノム情報の解読によって、IGF システム (IGF, IGF 受容体, IGFbps) は脊椎動物全般に進化上よく保存されていることがより明らかになり、ゼブラフィッシュを用いた比較内分泌・生理学的アプローチは、魚類のみならず脊椎動物一般に普遍的な生理機構の知見をもたらすことができると考えられる。そこで、本研究ではゼブラフィッシュ胚を脊椎動物の初期発生の1つのモデルとして用い、初期胚の発生環境における低酸素がどのように感知され、IGF システムを介して脊椎動物の胚発生と成長に影響を及ぼすのかを検討した。その結果、1) 低酸素環境により惹起される IGFBP-1 の上昇は IGF 依存的な細胞増殖を抑制し、これが低酸素に起因する胚発生と成長遅滞の重要な原因の1つであること、2) 初期発生時において、低酸素環境は転写因子 hypoxia-inducible factor (HIF)-1 を介して IGFBP-1 の発現を誘導することを細胞および個体レベルで明らかにした。

1. IGFBP-1 は低酸素に起因する胚発生と成長遅滞の誘起に重要な因子である。

発生学的、形態学的解析によりゼブラフィッシュ初期胚を低酸素 (0.5mg/l O₂) に24時間曝すと、正常酸素濃度 (6-7mg/l O₂) と比較して、胚の発生と成長が著しく遅滞することが明らかになった。その際の IGF システムの動態を検討すると、低酸素下において IGFBP-1 の遺伝子発現とタンパク量が特異的に増加した。一方、リガンド (IGF-1, 2) や受容体、その他の IGFbps に有意な変化は見られなかった。

そこで、特異的に上昇する IGFBP-1 が低酸素に起因する胚発生と成長遅滞とどのように関与しているかを明らかにするために、遺伝学的手法 (loss/gain-of-function) を用いて検討した。まず、IGFBP-1 に特異的なアンチセンスモルフォリノオリゴを微量注入し、正常酸素下ならびに低酸素下において内因性 IGFBP-1 をノックダウンした。正常酸素下では、IGFBP-1 のノックダウンによる明らかな表現型は観察されなかったが、低酸素下において IGFBP-1 をノックダウンすると、低酸素により惹起される発生と成長の遅滞がおよそ60%改善

された。次に、低酸素下で内因性 IGFBP-1 をノックダウンした胚に、外因的に IGFBP-1 を過剰発現させると発生と成長が遅滞した。さらに、IGFBP-1 の過剰発現は正常酸素下においても発生と成長の遅滞を誘起することから、IGFBP-1 はゼブラフィッシュ胚の低酸素による発生と成長の遅滞を誘起する重要な因子であることが示唆された。

では IGFBP-1 はどのようにゼブラフィッシュ初期胚に作用するのだろうか？そこで、ゼブラフィッシュ初期胚由来の細胞株 (zf4) を用いて、IGFBP-1 の細胞増殖能に及ぼす影響を検討した。IGF-1, -2 (100ng/ml) の

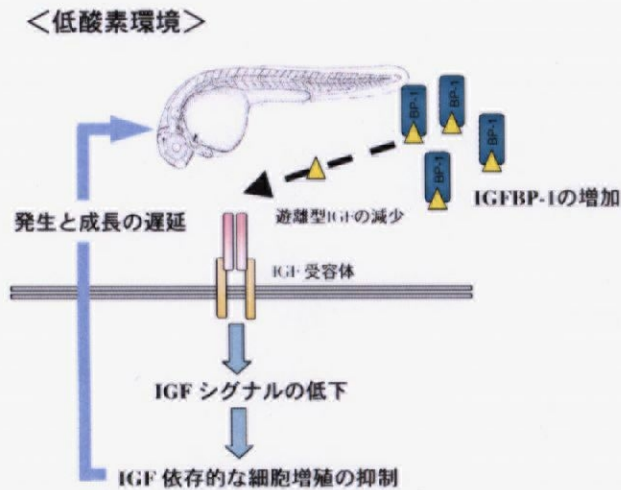


図1. 低酸素環境に起因する初期胚発生と成長遅滞の分子機構のモデル図。IGFBP-1の増加により、遊離型IGFが減少する。それに伴うIGFシグナルの低下により、IGF依存的な細胞増殖が抑制され、これが胚発生と成長の遅延を誘起する一因と考えられる。

添加により、zf4 細胞株の細胞増殖は有意に (IGF-1, 6.0 倍; IGF-2, 4.9 倍) 増加した。次に、IGFs と等モル量の IGFBP-1 を加えると、IGFs による細胞増殖はおおよそ 60% 抑制された。この IGFBP-1 による IGF 依存的な細胞増殖能の抑制は、過剰量の IGFs を加えることにより濃度依存的に消失し、IGFBP-1 のみの添加では細胞増殖能に有意な変化は観察されなかった。以上の結果から、低酸素環境により特異的に誘導される IGFBP-1 は IGF と複合体を形成し、IGF 依存的な細胞増殖を抑制することで低酸素に起因する発生と成長遅滞に関与すると考えられる (図1 参照)。

2. 低酸素は、HIF-1 経路を介して IGFBP-1 の発現を誘導する。

前述のとおり、低酸素は IGFBP-1 の発現を誘導することが明らかとなったが、その分子機構は不明である。その分子機構の解明の端緒として、まず IGFBP-1 遺伝子の上流域約 3kb を単離した。IGFBP-1 の上流域には 13 個の HIF-1 結合配列、hypoxia-response element (HRE) が存在した。HIF-1 は α , β サブユニットから成るヘテロダイマーの転写因子であり、CBP/p300 との共役により低酸素下において標的遺伝子の発現を制御することが知られている。そこで、「HIF-1 経路は、ゼブラフィッシュ初期胚において低酸素下における IGFBP-1 遺伝子発現誘導に関与する。」という仮説をたてた。その仮説の検証のために、まず HIF-1 経路がゼブラフィッシュの初期発生過程において成立しているかを検討した。ゼブラフィッシュの HIF-1 α , β サブユニットは、共に胚発生過程においてほぼ全ての細胞で発現していた。また、ゼブラフィッシュ HIF-1 α タンパク質は低酸素下において上昇し、細胞核内に局在した。さらに、培養細胞系ならびに個体レベルにおいて、HIF-1 α の過剰発現は IGFBP-1 遺伝子の発現を誘導した。薬理的に HIF-1 を誘導させると同様に、内在性 IGFBP-1 遺伝子の発現が上昇した。以上から、ゼブラフィッシュの初期発生過程において HIF-1 経路は確立しており、低酸素による IGFBP-1 の遺伝子発現誘導は HIF-1 を介することが明らかとなった。

次に、HIF-1 がどのような分子機構で IGFBP-1 の遺伝子発現を誘導するのかを明らかにするために、ゼブラフィッシュ IGFBP-1 遺伝子のプロモーター領域に存在する HRE の様々な欠損変異体・点変異体を作成し、ゼ

ブラフィッシュ肝臓由来の培養細胞株(ZFL)ならびにヒト肝細胞株(HepG2)を用いてシスエレメントの同定を行った。その結果、13個存在するHREのうち、唯一つのHRE(-1090/-1086)にHIF-1が物理的に結合することが、HIF-1を介した低酸素によるIGFBP-1遺伝子発現の誘導には必要であることが明らかとなった。上記の知見を個体レベルにおいても検証するために、ゼブラフィッシュ初期胚においてIGFBP-1のプロモーター活性をGFPによりリアルタイムで可視化した。低酸素下では、GFP陽性細胞ならびにGFPタンパク量(すなわち、IGFBP-1プロモーター活性)が増加するが、機能的なHRE(-1090/-1086)に変異を導入すると、GFPの増加は見られなかった。以上の結果から、低酸素下において誘導されるHIF-1は、IGFBP-1遺伝子プロモーター領域上の-1090/-1086に存在するHREに直接結合することによりIGFBP-1の発現を誘導することを細胞および個体レベルで明らかにした。

では、なぜHIF-1は13個のHREの中から唯一つのHRE(-1090/-1086)を選択的に用いて遺伝子発現を誘導するのだろうか? IGFBP-1遺伝子と既知のHIF-1標的遺伝子のプロモーター配列の比較や、IGFBP-1遺伝子プロモーター領域の欠損変異体・点変異体解析

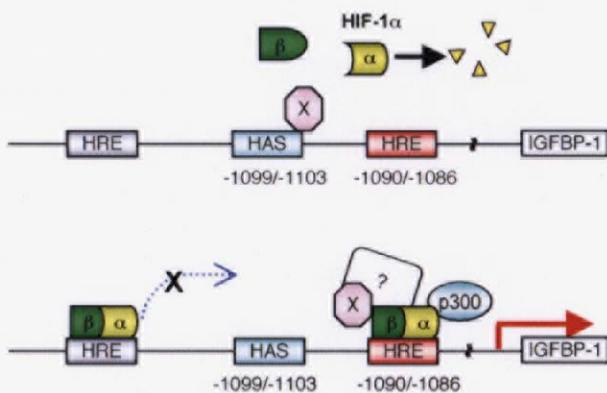


図2. 正常酸素環境において、HIF-1はユビキチン-プロテアソームにより分解されるが、低酸素環境では、HIF-1がIGFBP-1遺伝子上流域-1090/-1086に存在するHREに直接結合することによって、IGFBP-1の転写を誘導する。

から、-1099/-1103に位置するHIF-1 ancillary sequence (HAS) 配列が低酸素/HIF-1によるIGFBP-1の遺伝子発現の誘導には必要であることがわかった。さらに、このHAS配列に特異的に結合する核タンパク質が常酸素下において存在することから、HIF-1はHREと新規のシスエレメントHASとの共役によってIGFBP-1遺伝子の発現を誘導することが示唆された(図2参照)。

本研究では、ゼブラフィッシュを用いた発生学・遺伝学的アプローチを内分泌学に取り入れるることによって、HIF-1経路を介して低酸素下で誘導されるIGFBP-1が初期発生時における低酸素環境への適応メカニズムの一つとして重要な役割を果たすことを個体レベルで明らかにした。ではその生理学的意義は一体何か? 哺乳類、魚類を含め多種の脊椎動物において、IGFBP-1は栄養飢餓や低酸素、浸透圧変化など様々な環境ストレスにより急激に誘導され、IGFシグナルを抑制することが知られる。また、無脊椎動物(線虫、ショウジョウバエ)においてもインスリン・IGFシグナルの低下が低酸素環境への適応ならびに生命維持に重要であることが示唆されている。すなわちIGFBP-1は胚発生や成長に不適な条件下において誘導され、IGFシグナルの抑制因子として作用することで発生・成長を抑制し、代謝エネルギーを胚発生・成長から生命維持に移行させる分子スイッチの1つなのではないかと考えられる。本研究で明らかとなった知見は魚類のみならず、脊椎動物の進化の過程において保存された生体機構であると推測される。

LIST OF PUBLICATIONS (Peer-reviewed original articles)

- 1) S. Kajimura, K. Aida, and C. Duan. Understanding hypoxia-induced gene expression in early development: *in vitro* and *in vivo* analysis of hypoxia-inducible factor 1-regulated zebrafish insulin-like growth factor binding protein 1 gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 2006, vol. 26, 1142-1155.
- 2) S. Kajimura, K. Aida, and C. Duan. IGF binding protein-1 mediates hypoxia-induced embryonic growth retardation and developmental delay. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2005, vol. 102, 1240-1245.
- 3) S. Kajimura, A.P. Seale, T. Hirano, I.M. Cooke, and E.G. Grau. Physiological concentrations of ouabain rapidly inhibit prolactin release from the tilapia pituitary. *Gen Comp Endocrinol.* 2005, vol. 143, 240-250.
- 4) S. Kajimura, N Kawaguchi, T Kaneko, I Kawazoe, T Hirano, N Visitacion, E G Grau, and K, Aida. Identification of the growth hormone receptor in an advanced teleost, the tilapia *Oreochromis mossambicus*: with special reference to its distinct expression pattern in the ovary. *J. Endocrinol.* 2004, vol. 181, 65-76.
- 5) S. Kajimura, T. Hirano, S. Moriyama, O. Vakkuri, J. Leppaluoto and E. G. Grau. Changes in plasma concentrations of immunoreactive ouabain in the tilapia in response to changing salinity: Is ouabain a hormone in fish? *Gen. Comp. Endocrinol.* 2004, vol. 135, 90-99.
- 6) S. Kajimura, T. Hirano, N. Visitacion, S. Moriyama, K. Aida and E.G. Grau. Dual mode of cortisol action on GH/IGF-I/IGFBPs in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinol.* 2003, vol. 178, 91-99.
- 7) S. Kajimura, K. Uchida, T. Yada, K. Aida, T. Hirano, and E. G. Grau. Effects of insulin-like growth factors (IGF-I and -II) on growth hormone and prolactin release and gene expression in euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2002, vol. 127, 223-231.
- 8) S. Kajimura, K. Uchida, T. Yada, L. G. Riley, J. C. Byatt, R. J. Collier, K. Aida, T. Hirano, and E. G. Grau. Stimulation of insulin-like growth factor-I production by recombinant bovine growth

- hormone in the euryhaline tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Fish Physiol. Biochem.* 2001, vol.25, 221-230.
- 9) S. Kajimura, Y. Yoshiura, M. Suzuki, and K. Aida. cDNA cloning of two gonadotropin β subunits (GTH-I β and -II β) and their expression profiles during gametogenesis in the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 2001, vol. 122, 117-129.
- 10) S. Kajimura, Y. Yoshiura, M. Suzuki, T. Utoh, N. Hiroe, H Oka, and K. Aida. Changes in mRNA levels of gonadotropin I β and II β subunits during vitellogenesis in the common Japanese conger *Conger myriaster*. *Fisheries Science* 2001, vol. 67, 1053-1062.
- 11) K. Uchida, JS. Yoshikawa-Ebesu, S. Kajimura, T. Yada, T. Hirano, E. G. Grau. In vitro effects of cortisol on the release and gene expression of prolactin and growth hormone in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen Comp Endocrinol.* 2004, 135, 116-125.
- 12) K. Uchida, S. Kajimura, L. G. Riley, T. Hirano, K. Aida, and E. G. Grau. Effects of fasting on growth hormone/insulin-like growth factor I axis in Mozambique tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem Physiol A.* 2003, vol. 134, 429-39.
- 13) T. Yada, K. Uchida, S. Kajimura, T. Azuma, T. Hirano, and E. G. Grau. Immunomodulatory effects of prolactin and growth hormone in immune system in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *J. Endocrinol.* 2002, vol.173, 483-492.
- 14) A. P. Seale, L. G. Riley, T. A. Leedom, S. Kajimura, R. M. Dores, T. Hirano, and E. G. Grau. Effects of environmental osmolality on release of prolactin, growth hormone and ACTH from the tilapia pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2002, vol. 122, 117-129.

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to thank my advisor Prof. K. Aida for his valuable advice, support, and patience throughout my school year that allowed me to pursue a diversity of projects, some of which are not encompassed in this thesis.

I am very grateful to my committees, Profs. S. Watabe, K. Kaneko, S-I. Takahashi, and S. Hyodo for their invaluable advice, supports and critical reading of the dissertation.

Very special appreciation goes to Prof. C. Duan for his enthusiastic guidance and warmest support in my studies and life in University of Michigan. These works center this dissertation. We shared the blood and sweats in science, and survived in the sever Michigan winter.

I would like to acknowledge Profs. E. G. Grau and T. Hirano, Hawaii Institute of Marine Biology at University of Hawaii, Manoa, for their warmest supports and encouragements in my learning process of science since I joined their laboratory. They taught me the beauty of science.

My sincere appreciation also goes to Prof. H.A. Bern, University of California, Berkeley, for his kind consideration and encouragement. I also acknowledge Drs. H. Hirata, University of Nagoya, K. Uchida, University of Nigata, and H. Kamei, University of Michigan for their help, supports, and discussions throughout my graduate endeavor.

I will always remember all of the past and current members in the laboratory of aquatic animal physiology at the University of Tokyo, in the Duan's laboratory at the University of Michigan and in the laboratory of fish endocrinology and environmental physiology at Hawaii Institute of Marine Biology. They contributed to this work in many ways. I am truly proud of sharing the scientific enthusiasm, success and difficulties together, and most of all, our friendship. This dissertation is dedicated to my family.