

## 論文内容の要旨

### 論文題目

Analysis on developmental mechanisms for morphogenesis of  
the vertebrate dorsal trunk using the medaka mutant *Double anal fin*

(メダカ突然変異体 *Double anal fin* を用いた  
体幹背側形態の発生機構に関する研究)

氏 名  
河 西 通

#### [序論]

脊椎動物は、一般に背と腹とで非対称な外見をしている。なかでも、背面の色彩によって周囲の環境と同化したり、背側の鰭などの構造物により他個体へアピールするなど、背側の特殊化した構造は生物の生存に重要な役割を持つ。これら外部形態は発生後期において形成される組織であり、組織学的には主に体幹表層部に位置する外胚葉および神経堤に由来している。背腹の差異を生み出す機構としては、初期胚におけるモルフォゲンの濃度勾配に基づいて背腹軸を形成する過程が精力的に研究されてきた。しかし、発生後期における外胚葉および神経堤由来器官の形成過程に着目し、形態的に背腹のパターンの違いが生じる機構を明らかにした取り組みはこれまでにない。

そこで本研究では、背側の外部形態が腹側化した表現型を持つメダカ自然突然変異体 *Double anal fin* (*Da*) を用いて、発生学的解析を行った。*Da* 変異体の成体は背鰭、背側の体色、側線器官の配置など体幹にみられる複数の外部形態が腹側と同一のパターンを示す。しかし、神経系および内胚葉由来器官の背腹軸は正常であり、発生初期の背腹軸形成も正常に進むことから、発生後期における背腹パターン形成に異常を持つと考えられる。

*Da* 変異体は、*zic1* および *zic4* (*zic1/zic4*) 遺伝子座に変異を持つことが報告されている。

*zic1/zic4* はともに zinc finger 型の転写因子をコードする遺伝子であり、ゲノム上に隣接しているが、*Da* 変異体では両遺伝子座の近傍にトランスポゾンの挿入が見つかっている。このことから、*Da* は *zic1/zic4* の転写調節領域の変異体と考えられている。実際、*zic1/zic4* の発現部位は、野生型ではいずれも神経管および体節の背側領域であるが、*Da* 変異体では両遺伝子の発現がとくに体節において著しく低下する。以上から、体節における *zic1/zic4* の発現が、体幹部の背腹パターン形成に関与している可能性が考えられた。そこで本研究では、体幹背側形態の形成過程における *zic1/zic4* 遺伝子の機能解明を目指した。

#### [結果および考察]

##### 1. 外部形態形成における *zic1/zic4* の役割

まず、*Da* 変異体における *zic1/zic4* 上の変異が体節の発生に与える影響を調べた。その結果、*Da* 変異体では腹側特異的な皮筋節マーカー *sim1* の発現が体節背側領域に拡大していた。一方、背側体節マーカー *wnt11r* の発現は、野生型よりも低下していた。さらに、体節に由来する体幹筋および椎骨についても、背側特有の形態が失われ、腹側形態に類似していた。以上から、*zic1/zic4* の発現低下により、体節が背側の性質を失い腹側化していることがわかった。

次に、体節の背腹異常と体幹外部形態との関係を調べるため、メダカ胚における組織移植実験系を新たに確立した。*Da* 変異体の表現型は胚発生の過程において出現する。そこで、野生型胚由来の体節を *Da* 胚に移植し、孵化期における表現型を観察したところ、(1) 背側の黒色素パターン (2) 背鰭原基の形態のいずれについても、移植領域において局所的に表現型が回復した。さらに、孵化後 2-3 週間頃に出現する虹色素パターンも、同様に移植領域特異的に表現型が回復した。また時系列観察により、移植した体節から派生した間充細胞が、色素細胞や背鰭原基まで移動し接触している様子が観察された。以上から、体節細胞が *zic1/zic4* の発現を通して色素細胞や表皮といった外胚葉および神経堤由来組織と局所的に相互作用することによって、外部形態の背側化を誘導していることが明らかとなった。

##### 2. 背腹軸情報における *zic1/zic4* の役割

上記の移植実験において孵化後 2 週間後以降に現れる表現型についても回復がみられたことから、*zic1/zic4* が胚発生期だけでなく、それ以降も長期にわたって発現している可能性が考えられた。まず成魚（受精後 6 か月）における *zic1/zic4* の発現を定量的 PCR により調べたところ、筋節、真皮および正中鰭のいずれにおいても、背側領域由来の発現量は腹側領域由来と比べて著しく上昇していた。そこで、*zic1/zic4* の空間的な発現パターンを精査す

るために、BAC コンストラクトを用いて *zic1:GFP/zic4:DsRed* トランスジェニックメダカを 9 系統作出した。その結果、いずれの系統においても、体節由来組織である筋節、真皮、椎骨、鱗および鰭条すべてにおいて、背側領域に局限された GFP および DsRed の発現が見られた。蛍光の発現境界は、筋節を背腹に分割する水平筋中隔の位置にちょうど対応していたが、これは筋節のみならずすべての発現組織に共通した発現境界位置であった。さらに興味深いことに、背側領域全体における一様な発現は成魚に至るまで維持されていた。これらの結果から、*zic1/zic4* が胚発生期から生涯にわたり体幹背側領域全体をかたどって発現する特徴的な遺伝子であることがわかった。

それでは、背側形態をつかさどる転写因子 *Zic1/Zic4* の長期にわたる発現は、どのようにして制御されているのだろうか。*zic1:GFP/zic4:DsRed* トランスジェニック胚における形成直後の体節を野生型胚にランダムな向きで移植すると、5 日後すべての移植胚の背側部分で蛍光がみられた。さらに、*zic1:GFP/zic4:DsRed* トランスジェニック胚の分節直後の体節を単離培養したところ、培養開始 1 日後に蛍光が失われていた。以上から、体節における *zic1/zic4* の発現は、周囲の組織による誘導を受けていることが示された。

ところが、体節形成後 3 日（受精後 5 日）の体節についても同様の単離培養を行ったところ、少なくとも 11 日間継続して蛍光が観察された。また、成魚の真皮から単離した間充組織を用いた場合でも同様の発現の自律性が観察された。このことから、発生後期における体節での *zic1/zic4* の発現は、周囲の組織に非依存的に制御されていることが示唆された。すなわち、周囲の組織による誘導によって発現を開始した *zic1/zic4* は、体節の分化に伴って自律的な発現へと変化する。自律的な発現制御は、*zic1/zic4* 発現細胞が体幹背側領域全体へ移動・分布して周囲の環境が変化し、発生初期の背腹軸情報が散逸した後も、継続して外部形態を制御することを可能にしている、と考えられる。

### 3. *zic1/zic4* を介した背腹パターンニング機構の保存性

*zic1/zic4* を介した背側形態形成機構が種を超えて共通であるかどうかを調べるため、数種の魚類の胚を用いて *zic1/zic4* の発現パターンを確かめた。成魚体幹の形態が一見して背腹対称のように考えられるディスカス (*Symphysodon* sp.; スズキ目) やエンゼルフィッシュ

(*Pterophyllum* sp.; スズキ目)、また腹部が扁平化した底層魚であるコリドラス (*Corydoras aeneus*; ナマズ目) といった野生種では、いずれもメダカ野生型と同様に体節背側領域で発現していた。また、野生種に最も近いと言われる common type のベタ (*Betta splendens*; スズキ目) も同様であった。これらの結果から、*zic1/zic4* 自体の発現パターンは保存されており、背側形態の多様性は主にその下流において生じていると示唆された。一報で、ベタの一変種 *Double tail* は背鰭や尾鰭、側線器官のパターンが腹側化しており、*zic1/zic4* の体節に

における発現は特異的に著しく減少していた。このことから、*Double tail* はメダカ *Da* 変異体同様 *zic1/zic4* の変異体であると考えられ、*zic1/zic4* の機能がベタにおいても保存されていることが強く示唆された。以上から、*zic1/zic4* の発現パターンおよび機能は魚類に広く保存されていると結論づけた。

#### [結論]

本研究から、メダカの背側特有の形態は体節における *zic1/zic4* の発現によって生み出されることが明らかとなった。さらに、*zic1/zic4* の発現パターンが背側領域全域に渡っていたことから、発生後期における背側形態全体の発生が腹側とは独立に働く、モジュール的発生様式をとることがわかった。

さまざまな器官が形成される発生後期において、*zic1/zic4* によって背側領域を包括的に制御することにより、背側領域に位置する様々な外部形態の協調した形態形成が可能となる。また進化的観点からは、腹側形態に影響を与えることなく、常に外界に曝露される背側形態を多様化させることができたと推察される。