

## 論文の内容の要旨

論文題目 : Analysis of otolith formation using the medaka mutant *ha*

(メダカ突然変異体 *ha* を用いた耳石形成機構の解析)

氏名 : 北條 幹

耳石（平衡石、聴砂）は脊椎動物の内耳に存在し、傾斜や加速度の感知に必要なバイオミネラルであり、約 9 割の炭酸カルシウムとわずかな有機成分で構成されている。魚類の場合、血流開始期の胚において、内耳原基である耳胞の内部で耳石形成が始まる。一般的にバイオミネラルの結晶化には、結晶の有機成分（基質タンパク質）、無機環境、構造的な足場、結晶核形成因子の 4 要素が重要だと考えられている。これまで、基質タンパク質、構造的足場、無機環境を調節するチャンネルなどの因子が同定されてきた一方で、結晶核の実態や結晶化の機構はほとんどわかっていない。私は、重力感知に異常をきたすメダカ自然突然変異体 *ha* に着目し、耳石形成およびバイオミネラリゼーション機構の一端を明らかにすることを目的として研究を行った。

まず、*ha* の表現型を分子レベルで詳細に解析した。野生型のメダカでは、片側の耳胞につき 2 つの耳石が形成されるのに対し、*ha* では、耳石が形成されず、耳石の成分と思われる物質が耳胞上皮に付着することがわかっている。*ha* の耳胞においても、耳胞の誘導・分化のマーカーの発現が正常であることや、seeding particle と呼ばれる耳石成分を含む顆粒や主要な基質タンパク質である OMP-1 が耳胞内部に存在することが確認された。しかしながら、耳石は形成されず、カルシウム沈着も観察されなかった。以上から、耳石の構成成分は耳胞内部に存在するが、結晶核の形成が行われず、結晶化が起こらないのではないかと考えられる。

次に、*ha* の原因遺伝子を特定した。ポジショナルクローニングの結果、原因遺伝子はポリケタイド合成酵素 (polyketide synthase; PKS) によく似た遺伝子であることがわかった。このことは、*ha* の別 allele である *ki79* 変異体でも変異が確認されたこと、モルフォリノ阻害実験(フェノコピー)および mRNA によるレスキュー実験の結果からも確認された。私はこの遺伝子を「メダカ *Olyzias latipes* ポリケタイド合成酵素 (Ol-PKS)」と命名した。ポリケタイドとは、微生物や植物にする二次代謝物の一種で、様々な生理活性を持つことから、医薬品資源等として注目されてきた。PKS は複数の酵素活性ドメインを持ち、基質に対して各酵素が順次働くことで、最終産物としてポリケタイドを与える。Ol-PKS も、KS、AT、DH、KR および ACP の 5 つのドメインを持つことが予測された。これらの各ドメインが酵素活性を持つかどうかを調べるため、各々の酵素の活性中心に変異を導入した mRNA を、null 変異体 (*ki79*) の胚に顕微注入した。その結果、いずれの場合もレスキューされなかったため、各ドメインが酵素活性を持ち、それらが耳石形成に必須であることが判明した。

これまで、高等動物において PKS のクローニングの報告がほとんどないことから、ゲノムデータベースを用い、他の生物種における PKS 遺伝子の存在を調べた。その結果、ゼブラフィッシュやフグ等の魚類にとどまらず、クローニングの報告があるウニをはじめ、サンゴ、線虫、ギボシムシ、ナメクジウオ、爬虫類、鳥類そして有袋類まで、動物界の様々な種において、Ol-PKS 類似遺伝子が確認された。なお、ゼブラフィッシュでは *in situ* hybridization により、耳胞での遺伝子発現を確認した。分子系統樹を作成すると、これらの PKS は、すべての動物に存在する fatty acid synthase とは別のグループを形成することがわかった。

次に、*in situ* hybridization および免疫染色により発現解析を行った。Ol-PKS の mRNA は、発生過程の中で、耳石が形成される直前の 9 体節期 (st.22) 前後でのみ、耳胞の背側かつ正中線側の領域に特異的に検出された。また、Ol-PKS タンパク質は耳胞上皮の頂端側の細胞膜付近に限局していることがわかった。これらの結果は、ミネラル化が起る直前に、上皮の頂端側の膜付近から耳胞内腔にポリケタイドを提供していることを思わせるものであった。

さらに、耳石形成における Ol-PKS の作用機序を推測するために、野生型の細胞を *ha* に移植し、キメラメダカを作出し、耳石を観察した。野生型細胞がわずか数個でも耳胞上皮に存在すれば、その耳胞の耳石形成は回復することがわかった。また、耳石の付着する領域以外に、野生型細胞が存在しても、耳石形成がレスキューされた。これらから、Ol-PKS が、無機環境の調節や足場としての機能より、結晶核形成因子 (促進因子) としての機能を持つことが推測される。

Ol-PKS の産物の性質を調べるため、ニホンコウジカビ *Aspergillus oryzae* による異種発現の系を利用した。Ol-PKS を導入し、発現を誘導した *A.oryzae* の菌体を酢酸エチルで液液抽出し、脂溶性の画分を得た。この抽出物の濃縮液をリンガー液に少量添加し、*ha* を飼

育すると、耳石形成がレスキューされた。このことから、導入株が、確かに活性のある低分子化合物を産生していることがわかった。また、リンガー液に添加するだけで耳胞に供給されたことから、ある程度水溶性があり、かつ、微量で作用するという性質も示唆された。

これらの結果から、耳石形成における **OI-PKS** の機能を推測すると、**OI-PKS** が、ポリケタイド様の低分子を合成し、耳胞上皮から耳胞内に供給し、これが、耳石の結晶核として機能し、ミネラル化を引き起こすのではないかとと思われる。耳石形成の過程は骨の石灰化によく似ており、骨形成においては、結晶核の形成にリン脂質が重要な働きを持つと言われている。耳石においてはリン脂質に代わってポリケタイドが寄与しているということになれば、耳石と骨との共通性を考察する上で、大変興味深い。また、これまで微生物や植物において、生体防御機能などに関与するものと考えられていた **PKS** が、動物において発生過程でバイオミネラルの形成に関与していることを示したのは本研究が初めてであり、今後のポリケタイドの研究に与える影響も大きい。

また、動物界に広く存在する **PKS** 遺伝子が、**OI-PKS** と共通の機能を持つかどうかにも興味深い。ムラサキウニでクローニングされた **Sp-PKS2** 遺伝子は、骨片が形成される直前に骨片細胞のみに局限して発現することが知られている。バフンウニのホモログ **Hp-PKS2** をノックダウンすると、骨片が形成されなかったため（お茶の水女子大学との共同研究）、**PKS** が炭酸カルシウムのミネラル化に関与するという共通性を見出すことができた。**PKS** の存在が確認された生物種は、必ずしも炭酸カルシウムのバイオミネラルを持つわけではなく、また、全ての種において **PKS** が機能しているかはわからないが（少なくともニワトリでは遺伝子発現が確認できなかった）、**PKS** 遺伝子が動物界でバイオミネラル化に関与しているという新たな事実がわかった。