

## 論文の内容の要旨

# Studies on the activation mechanism of Hedgehog signaling in fish

(魚類におけるヘッジホッグシグナル伝達経路の活性化機構の解析)

氏名 山元孝佳

### 序論

繊毛は、脊椎動物のほぼ全ての細胞に存在する細胞表面より突出した小器官であり、運動性繊毛と非運動性の一次繊毛に大別される。中でも一次繊毛は、近年の研究から細胞外からのシグナルを感知するアンテナとしての機能を果たすと考えられており、マウスでは動物の発生に重要なシグナル経路であるヘッジホッグ (Hh) 経路に必須であることが明らかになっている (Huangfu et al., *Nature*, 2003)。

Hh 経路は神経や筋肉、四肢などのパターン形成に必須であり、無脊椎動物から脊椎動物まで広く保存されている重要なシグナル経路である。リガンドである Hh は濃度勾配により位置情報を与えるモルフォゲンとして作用し、Hh 経路を活性化する。マウスにおいては受容体 Patched1 (Ptch1) などの Hh 関連因子が繊毛に局在することから、繊毛が Hh 経路活性化のためのひとつの小器官として働くと考えられている。一方、シウジョウバエなどの無脊椎動物ではこの経路に繊毛は必要ではない。祖先的な脊椎動物である魚類では、繊毛が存在しないゼブラフィッシュ変異体において Hh 経路の活性は完全には消失しないことが知られている (Huang et al., *Development*, 2009)。したがって、Hh 経路の繊毛依存性は脊椎動物内においても魚類と哺乳

類で異なることが示唆されているが、魚類における繊毛と Hh 経路についての知見は乏しく、生物種による繊毛依存性の違いを生み出すメカニズムについても不明であった。

本研究では、メダカ繊毛短小化変異体 *dhc2* において Hh 経路活性レベルが部分的に低下しているものの、マウス *dhc2* 変異体よりも弱い異常であることを明らかにした。さらに、無脊椎動物と魚類においてのみ Hh 経路の活性化に関わる *fused* の解析から、Fused のポジティブフィードバックによるシグナルの増強が魚類における Hh 経路の繊毛依存性を低下させている可能性を示した。

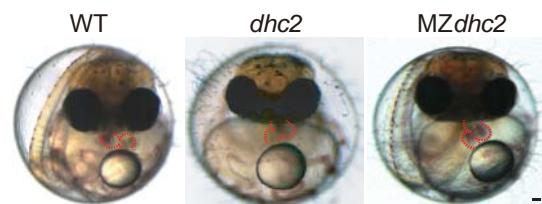


図1 MZ*dhc2* は内臓逆位を示す

(A-C) *dhc2* および MZ*dhc2* 変異体では心臓のルーピングが左右反転した(6日胚)。逆位の割合はそれぞれ0.9%(n=110)、24%(n=294)、53%(n=72)。スケールバー、100 μm

## 結果および考察

### 1. メダカ *MZdhc2* 変異体では繊毛が短小化する

メダカ *dhc2* 変異体は、当研究室における変異体スクリーニングで単離された、*cytoplasmic dynein heavy chain2* (*dhc2*) を欠損した劣性致死変異体である。*Dhc2* は繊毛内の物質輸送に関わっており、クラミドモナスやマウスの *dhc2* 変異体では繊毛が短小化する。繊毛は体の左右軸形成に必要であり、繊毛の異常は内臓の配置の左右反転（内臓逆位）を引き起こすことが知られている。実際、メダカ *dhc2* 変異体においても内臓逆位が観察されたが、その頻度は 24% であり、完全な左右性異常を示す 50% を大きく下回っていた。その原因として、メダカなどの魚類では、体節形成初期まで母性由来の遺伝子産物が存在していることが考えられる。そこで *dhc2* の母性因子を除去するため、始原生殖細胞移植によるメダカ代理出産法を確立し、maternal-zygotic (MZ) *dhc2* 変異体を作製した (Shimada & Takeda, *DGD*, 2008 を改変)。モルフオリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いて始原生殖細胞 (PGC) の生存に必須な *dead end* の翻訳阻害を行い、生殖細胞を消失させた野生型胚に、*dhc2*<sup>-/-</sup> の PGC を胞胚期に移植して得た代理親のメスと *dhc2*<sup>+/-</sup> のオスを交配させ、MZ 胚を得た。その結果、MZ 変異体において内臓逆位の頻度が 50% に上昇した (図 1)。さらに、神経管や体節の繊毛が顕著に短小化していることが明らかとなった (図 2)。

### 2. メダカにおいて繊毛の短小化はマウスに比べ Hh 経路に影響が少ない

神経管はその腹側に位置する脊索及び底板で発現する Hh リガンドの濃度依存的に細胞運命が決定する (図 3A)。Hh 経路の活性化レベルを調べるため、*in situ* hybridization により Hh 依存性マーカーの発現解析を行った。その結果、マウス変異体と同様に、MZ 変異体では、*olig2* 発現の背側拡大が観察された (図 3B-C)。一方で、マウス変異体では発現が消失する *foxa2* や *nkx2.2* が正常に発現していた (図 3D-E)。しかし、Hh 経路の阻害剤である cyclopamine で処理したところ、野生型では影響のない低濃度であっても

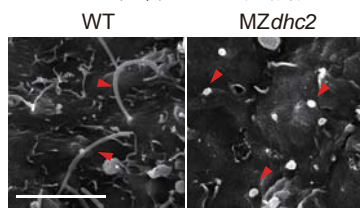


図2 *MZdhc2* では繊毛が短小化する  
神経管上皮細胞の走査型電子顕微鏡像 (16 体節期)。変異体では繊毛が顕著に短小化している。スケールバー、5 μm

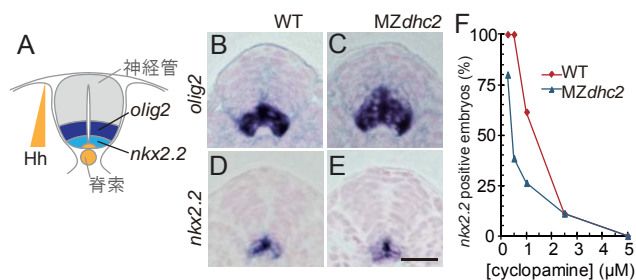


図3 *MZdhc2* 変異体で Hh 経路はほぼ正常に活性化している  
(A) 体節形成期の神経管断面の模式図。Hh 濃度勾配依存的に様々なマーカーが発現する。(B-E) 体節形成期 (16 体節期) における神経管マーカーの発現パターン。(F) Hh 経路阻害剤 cyclopamine 処理胚における *nkx2.2* 発現胚の割合 (いずれも  $n > 20$ )。スケールバー、20 μm

*nkx2.2* の発現が低下したことから (図 3F)、メダカにおいても繊毛短小化により Hh 活性が部分的に低下していることが明らかになった。これらの結果は、メダカにおいても Hh 経路は繊毛を利用しているが、マウスに比べ繊毛への依存度が低いことを示している。

### 3. 受容体 *Ptch1* は繊毛に局在する

メダカにおける Hh 経路の繊毛への依存度の低さの原因として、Hh 受容体 *Ptch1* が繊毛以外の領域に局在している可能性が考えられる。そこで私は、*Ptch1* の抗体を作製し、その局在を観察した。その結果、野生型および MZ どちらにおいても、*Ptch1* はマウスと同様に繊毛に存在していた (図 4)。このことは Hh 受容以降の細胞内伝達因子が繊毛依存性の違いをもたらしている可能性を示唆している。

### 4. *fused* ノックダウンにより *MZdhc2* はマウス *dhc2* 変異体と同様の表現型を示す

そこで、ショウジョウバエから魚類まで Hh 経路の細胞内伝達因子として機能する一方、マウスでは Hh 経路に関与しないと考えられている *fused* (*fu*) に着目した (Wilson et al., *Nature*, 2009)。まず、メダカにおける *fu* の発現解析を行ったところ、神経管の腹側特異的に発現し、*MZdhc2* ではその発現が背側に拡大していた (図 5A-B)。これは *olig2* などの Hh 依存性マーカーと同様の発現パターンであり、*fu* が Hh 依存的に発現する可能性を示唆している。そこで野生型胚を cyclopamine

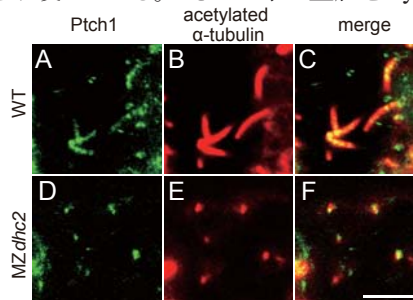


図4 Hh 受容体 *Ptch1* は繊毛に局在する  
野生型 (A-C) および *MZdhc2* (D-F) の神経管上皮細胞における *Ptch1* の免疫染色。いずれにおいても *Ptch1* は繊毛に局在していた。スケールバー、5 μm

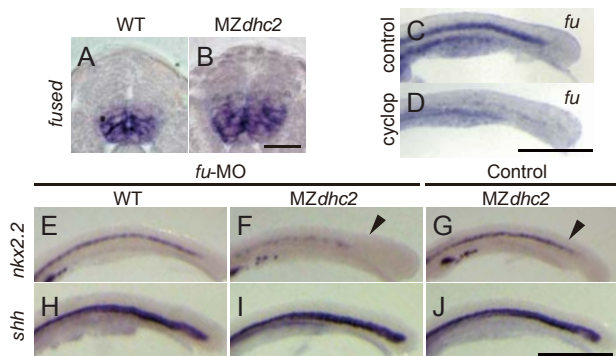


図5 *fu* ノックダウンにより *MZdhc2* 変異体はマウス *dhc2* 変異体と同様の表現型を示す

(A-B) 体節形成期 (16 体節期) における *fu* の発現パターン。*MZdhc2* では発現領域が背側に拡大していた。(C-D) Hh 経路阻害剤 cyclopamine 処理 (5  $\mu$ M) により *fu* の発現は顕著に減少した。(E-J) *fu* のノックダウンにより MZ での *nkx2.2* の発現が顕著に減少した (F)。リガンド *shh* の発現は正常 (H-J)。スケールバー、20  $\mu$ m (B)、500  $\mu$ m (D, J)

で処理したところ、*fu* の発現が顕著に減少した (図 5C-D)。したがって、メダカにおいて *fu* は Hh 依存的に発現することが初めて明らかになった。

さらに MZ において、野生型では表現型の出ない低濃度の MO により *fu* をノックダウンすると、*nkx2.2* の発現が減少した (図 5E-G)。これらの結果により、メダカにおいては Hh 経路の伝達に寄与する *fu* が Hh 依存的に発現することで、シグナル活性がポジティブフィードバックにより増強されていることが明らかになった (図 6)。哺乳類ではこの増強機構を用いず、Hh リガンド 1 分子によって引き起こされるシグナル活性の程度を低くすることで、より精緻な活性状態のチューニングが行われていると考えられる。

## 結論

本研究における繊毛短小化変異体 *MZdhc2* の解析から、メダカの Hh 経路における繊毛依存性は哺乳類に比べて低いことが示された。また、魚類において *fu* が Hh 依存的に発現することを初めて明らかにした。*fu* がポジティブフィードバックを介してシグナルの増強に働いていることが、メダカにおける Hh 経路の繊毛依存度の低さの要因であると考えられる (図 6)。

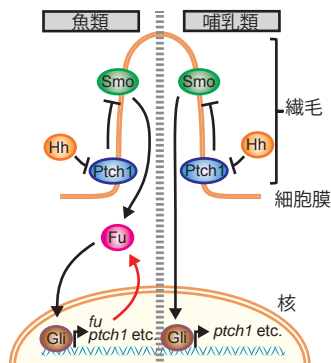


図6 魚類と哺乳類における Hh 経路のモデル図

魚類では *fu* が Hh 経路の細胞内因子として関与し、さらに Hh 依存的に発現することで Hh 経路のポジティブフィードバックが生じている。