

氏名	塩見 浩介
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第1041号
学位授与の日付	平成20年3月22日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	ウニ胚における Par 関連遺伝子の発現と機能
論文審査委員(主査)	山口 正晃(自然科学研究科・教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝(自然科学研究科・教授), 岩見 雅史(自然科学研究科・教授), 東 浩(自然科学研究科・准教授), 山下 克美(自然科学研究科・准教授)

Abstract

Partitioning-defective (*Par*) genes were originally identified in *Caenorhabditis elegans* and are involved in asymmetric divisions of the egg. Recently, the expression and function of *Par* orthologs have been elucidated in deuterostomes, including vertebrates. Sea urchin eggs are polarized along the animal-vegetal axis. The polarity is apparent at the 16-cell stage; vegetal blastomeres asymmetrically divide to form micromeres at the vegetal pole. Micromeres are cell-autonomously specified to the skeletogenic mesoderm, the descendant of which emanates signals to specify endomesoderm tissues at the blastula stage and to induce gut differentiation during gastrulation. In this study, I isolated three *Par*-related genes, *Par-1*, *Par-6*, and *atypical protein kinase C (aPKC)*, from the sea urchin *Hemicentrotus pulcherrimus* and examined their expression patterns. Furthermore, I analyzed functions of three genes through morpholino-mediated knockdown and overexpression of dominant negative forms.

Transcripts of three *Par*-related genes existed maternally in eggs, and were uniformly expressed in cleavage-stage embryos. From the blastula to early gastrula stage, *HpPar-1* expression was transiently restricted to the vegetal plate, including the primary mesenchyme cells (PMCs); this transient reduction was followed by uniform expression. Overexpression of kinase-dead form of *Par-1* result in formation of wrinkled blastula, suggesting that *Par-1* may regulate cell adhesion in early cleavage-stage embryos. On the other hand, embryos injected with morpholino against *HpPar-1* showed delays in gastrulation and spicule elongation.

HpPar-6 was expressed uniformly throughout development. Morpholino-mediated *Par-6* knockdown caused defects in skeletogenesis and gut differentiation, both of which occur through tissue-tissue interactions in normal development. To define which blastomere requires *Par-6* for the process, I constructed chimeric embryos composed of control and experimental blastomeres. By analyzing their phenotypes, I found that both defects were due to loss of *Par-6*- function in micromere descendants.

In contrast, *HpaPKC* expression changed dramatically during development. At the blastula stage, *HpaPKC* expression was restricted to the vegetal region, including PMCs and the vegetal plate. During gastrulation, the expression was maintained in PMCs and the archenteron tip. From the prism stage, two

cell types started to express *HpaPKC*: ectoderm cells interspersed in the ciliary band and skeletogenic cells at the posterior end of the larva. Functional analysis revealed that *HpaPKC* is essential for cell living after the blastula stage.

Partitioning-defective (*Par*) 遺伝子群は、センチュウ受精卵の前後軸にそった極性を調節する遺伝子として同定された。最近、脊椎動物を含む新口動物において、*Par*相同遺伝子が細胞極性の構築のみならず、形態形成運動においても重要な役割をしていることが明らかになってきた。

ウニは新口動物に属し、その卵は動物-植物軸にそって分極している。その極性は、16細胞期胚の植物極に小割球が非対称分裂によって生じることで外面に現れる。これまでウニ胚を用いて多くの発生調節遺伝子の発現と機能が解析されてきたが、*Par*相同遺伝子についてはまったく調べられていない。今回、私はバフンウニから3つの*Par*関連遺伝子、*HpPar-1*、*HpPar-6*、*HpaPKC*、を単離し、プルテウス幼生期までの胚発生におけるそれらの発現パターンを解析した。さらに、モルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MASO) による翻訳阻害、あるいは変異型タンパク質過剰発現によってウニ胚発生における3つの遺伝子の機能を解析した。

3つの*Par*関連遺伝子を単離するため、縮重プライマーを用いてそれぞれの部分配列をPCR増幅した。その断片をプローブとしてバフンウニ初期卵割期cDNAライブラリーをスクリーニングすることによって、*HpPar-1*、*HpPar-6*、そして*HpaPKC*を単離した。これらの配列をもちいて最近公開されたアメリカのウニ *Strongylocentrotus*

purpuratus ゲノムデータベースをBLAST検索した結果、それぞれ *SpMARK3*, *SpPar-6beta*, そして *SpPKCiota* のみが高い相同性を示した。分子系統解析は、ウニはそれぞれ1つの *Par-1* (*SpMARK3/HpPar-1*)、*Par-6* (*SpPar-6beta/HpPar-6*)、そして *aPKC* (*SpPKCiota/HpaPKC*) をもつこと、脊椎動物の3つの *Par-1* パラログ、3つの *Par-6* パラログ、2つの *aPKC* パラログは、いずれも脊索動物の系譜で重複したことを示唆した (図1A, 図2A, 図3A)。

HpPar-1, *HpPar-6*, そして *HpaPKC* cDNA と *S. purpuratus* BAC クローンとのアラ イメントから、それぞれのエキソン-イントロン構成を推定した (図1B, 図2B, 図3B)。その構成はNCBIのgenome annotation pipeline (Gnomon) が予想した *SpMARK3*, *SpPar-6beta*, そして *SpPKCiota* のそれとほぼ一致したが、いずれも異なる領域があった。例えば、ショウジョウバエとマウスの *Par-1* には2つの alternative splicing variants が存在する。そこで、*HpPar-1* の複数の領域にたいしてプライマーを設計し、RT-PCR によって *HpMARK3*-type variant の存在を検索した。しかし、増幅配列は単一で、すべて *HpPar-1* cDNA 配列と一致した。また、ノーザンプロット解析においても、単一のシグナルが検出された。この結果は、バフンウニにおいて、*SpMARK3*-type variant が存在するとしても、その異性体はプルテウス幼生までの胚発生期には発現していないことを示唆する。*HpPar-6* と *HpaPKC* についても同様の結果であった。

Par 関連遺伝子の転写物は卵に母性因子として存在し、その分布は卵割期までは胚内

において均一であった (図 1 C, 図 2 C, 図 3 C)。HpPar-1発現は、胞胚期から原腸胚期に一過的に一次間充織細胞 (PMC) を含む植物板に限局された (図 1 D)。Kinase-dead 変異型Par-1を過剰発現した胚は、初期卵割期の割球間接着が弱くなり、その後、しわ胞胚へと発生した (図 1 E)。この表現型は、受精後シヨ糖処理することによって生じる双生胚と似ていた。シヨ糖処理胚は第 1 卵割において割球の頂端-基底極性を乱す (基底側の喪失) ので、Par-1は割球の基底側の確立/維持に関わるか、あるいは基底側での頂端化の抑制への機能をもつと考えられる。ホニユウ動物上皮細胞においてPar-1は基底膜側を規定することから、ウニ卵割期胚の細胞とホニユウ動物の上皮細胞における頂端-基底極性の確立に共通した分子機構がはたらいっている可能性がある。一方、MASO-HpPar-1注入胚は、内中胚葉の分化は正常に起こっていたが、原腸形成と骨片伸長をふくむ形態形成が遅れた。

Par-6は発生を通して胚全体で一様に発現していた。MASO-HpPar-6注入胚は、骨片伸長と原腸の消化管への分化が阻害される表現型を示した (図 2 D)。幼生骨片の形成には骨片形成細胞の存在に加えて、外胚葉からのシグナルを必要とする。また、原腸が消化管へと分化するとき、PMC/骨片形成細胞から放出されるシグナルが必要である。全胚でのPar-6ノックダウンによって現れた表現型がどの組織でPar-6機能を阻害した結果なのか確かめるために、対照胚と実験胚の動物半球と小割球を再構成したキメラ胚を作製し、その胚の表現型を調べた。その結果、小割球においてMASOを含むキメラ胚

でのみ骨片伸長と消化管の分化が阻害されることが明らかになった（図 2 E）。最近、PMC クラスターの位置決定と骨片形成の開始は、PMC での VEGFR 発現と外胚葉での VEGF 発現が必要であることが示された。本研究において、*Par-6* をノックダウンした全胚とキメラ胚のいずれにおいても、PMC クラスターの位置に影響はなく、正確に骨片形成は開始された。しかし、小割球子孫細胞における *Par-6* ノックダウンは、それに続く骨片伸長が阻害された。この結果は、*Par-6* は骨片形成の場所決めではなく、その後の骨片形成細胞自身による骨片伸長を調節していることを示している。骨片形成細胞からの消化管分化シグナルの実体は不明であるが、胞胚腔内での PMC から SMC へのシグナルは、細胞体からの糸状突起をとおして伝えられる。ホニユウ動物において、*Par-6* が神経突起の伸長を調節しているので、ウニ胚の骨片形成細胞から原腸へのシグナル伝達も糸状突起を介している可能性がある。

HpaPKC mRNA は発生をとおして存在するが、空間的発現パターンは大きく変化した。胞胚期から原腸胚期の間、*HpaPKC* の発現は一過的に PMC と原腸先端を構成する細胞に限局された（図 3 D）。プリズム幼生期以降、2 種類の細胞において新たな *HpaPKC* の発現が始まった（図 3 D）。一つは繊毛帯に点在する外胚葉細胞であった。繊毛帯は、幼生の遊泳運動だけでなく外部感覚器としてもはたらき、セロトニン発現細胞とシナプトタグミン発現細胞の存在が確認されている。しかし、*HpaPKC* 発現細胞はそのいずれの細胞とも分布が異なっていた。これまでに、*HpaPKC* 発現細胞の分布と一致する細胞種あるいは遺伝子発現は報告されていないので、*HpaPKC* 発現細胞は新規の

絨毛帯構成細胞である。もう一つは、胚後端の骨片形成細胞であった。幼生骨片にそって存在する他の骨片形成細胞にこの *HpaPKC* 発現はないので、骨片形成細胞には *HpaPKC* 発現細胞と非発現細胞の少なくとも 2 つのサブクラスがあることを示している。一方、MASO-*HpaPKC* 注入胚は、胞胚まで発生したが、間充細胞胚期に上皮構造を失って死滅した (図 3 E)。この胚において内中胚葉は正常に分化していたので、aPKC が上皮から間充織が移入する形態形成時の細胞の生存に必須であること、つまり aPKC は細胞極性の維持に関わっていることを示唆している。

本研究において、私はウニ胚における *Par* 関連遺伝子の発現および機能解析を行うことによって、*Par* 遺伝子群が、骨片形成、原腸形成のような形態形成から、中胚葉と内胚葉の間の相互作用までの多様な発生現象に関わっていることを示した。

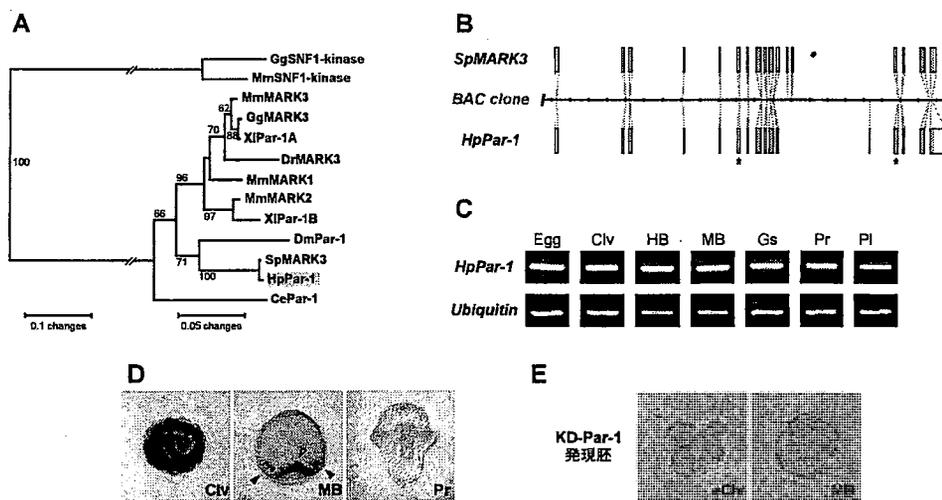


図 1 (A) *Par-1* タンパク質の Ser/Thr kinase domain 配列に基づいた近隣結合樹。外群には BLAST 検索で最も相同性の高かった SNF1-kinase の Ser/Thr kinase domain 配列を用いた。50% 以上指示されるブーストラップ値を節部に示した。Mm, *Mus musculus*; Gg, *Gallus gallus*; XI, *Xenopus laevis*; Dr, *Danio rerio*; Ce, *Caenorhabditis elegans*; Dm, *Drosophila melanogaster*; Sp, *Strongylocentrotus purpuratus*; Hp, *Hemicentrotus pulcherrimus*。(B) Gnomon により推定された *SpMARK3*、および BAC クローン (NW_001328709) 配列とのアライメントから示唆された *HpaPar-1* のエキソン-イントロン構成。箱はエキソン、影の部分はコード領域を示している。星印はスプライシングバリエーション検索のためのプライマー位置を示す。1 目盛りは 5 kb を示す。(C) 各ステージの胚の total RNA を用いた RT-PCR による発生時間を追った発現解析。上段は *HpaPar-1*。発現対照には ubiquitin を用いた (下段)。*HpaPar-1* mRNA は母性因子として存在し、発生を通して発現している。ステージの略述は以下の通り。Egg, 未受精卵; Clv, 初期卵割期胚; HB, 孵化胞胚; MB, 間充細胞胚; Gs, 原腸胚; Pr, プリズム幼生; Pl, プルテウス幼生。(D) WISH による空間的発現解析。左より、60 細胞期胚、間充細胞胚、プリズム幼生。*HpaPar-1* は、初期卵割期では胚全体で均一に発現している。間充細胞胚になると、PMC (黒矢尻) と植物板 (白矢尻) で強い発現が見られる。後期原腸胚以降、優位な発現領域は存在しない。(E) KD-*Par-1* mRNA 注入胚。初期卵割期に割球の分離が見られ (左)、その後、しわのある胞胚に発生する (右)。

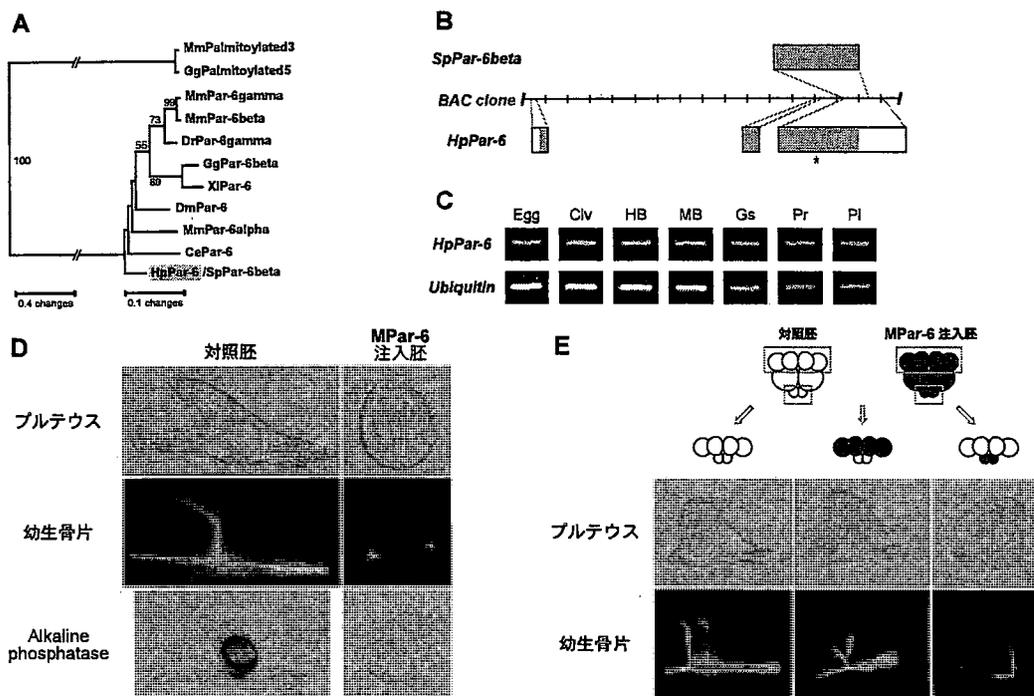


図2 (A) Par-6 タンパク質の PDZ domain 配列に基づいた近隣結合樹。その外群には BLAST 検索で最も相同性の高かった Palmitoylated の PDZ domain 配列を用いた。50% 以上指示されるブーストラップ値を節部に示した。生物種の略述は図1と同様。(B) Gnomon により推定された SpPar-6beta、および BAC クローン (NW_001304107) 配列とのアライメントから示唆された HpPar-6 のエキソン-イントロン構成。箱はエキソンを、影の部分はコード領域を示している。星印は、5' RACE のために設計したプライマー位置を示す。1 目盛りは 1 kb を示す。(C) 各ステージの胚の total RNA を用いた RT-PCR による発生時間を追った発現解析。対照には Ubiquitin を用いた (下段) HpPar-6 mRNA は母性因子として存在し、発生を通して発現している。ステージの略述は図1と同様。(D) 正常胚 (左) と MPar-6 注入胚 (右) のプルテウス幼生期とそのアルカリフォスファターゼ活性染色による消化管分化の観察。MPar-6 注入胚は骨片伸長 (中段) と、消化管の分化 (下段) が遅れている。(E) キメラ胚による中割球あるいは小割球子孫細胞での HpPar-6 の機能解析。キメラ胚は 1 6 細胞期の対照胚、あるいは MPar-6 注入胚から単離した中割球と小割球から構成されている。小割球で MPar-6 を含むキメラ胚の骨片伸長と消化管分化が遅れていた。

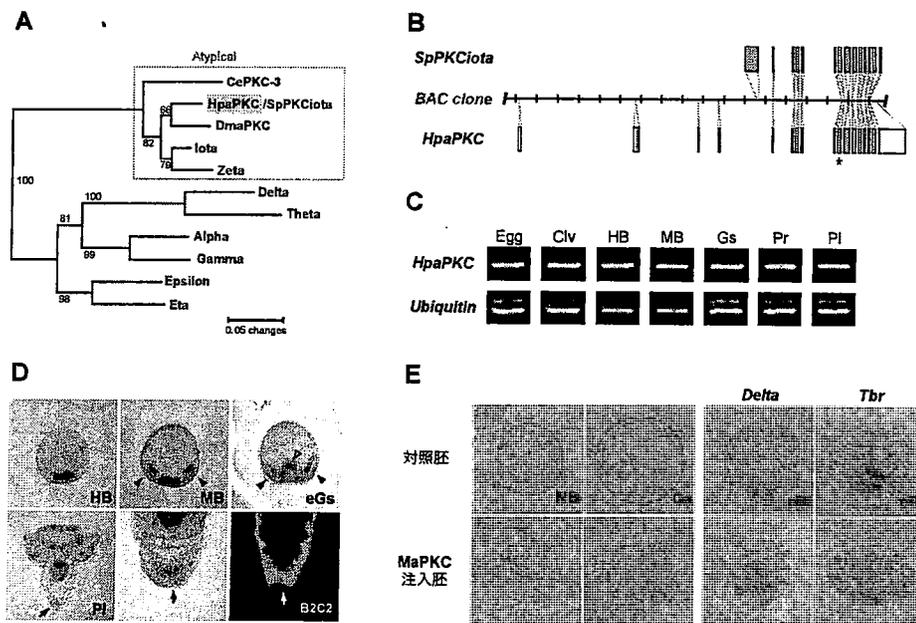


図3 (A) PKC タンパク質の Ser/Thr kinase domain 配列に基づいた近隣結合樹。マウスの atypical 以外の PKC 分子種を外群として用いた。50% 以上指示されるブーストラップ値を節部に示した。生物種の略述は図1と同様。マウスの PKC 分子種はその isotype 名のみを記した。(B) Gnomon により推定された SpPKCiota、および BAC クローン (NW_001282827) 配列とのアライメントから示唆された HpaPKC のエキソン-イントロン構成。箱はエキソンを、影の部分はコード領域を示している。星印は、5' RACE のために設計したプライマー位置を示す。1 目盛りは 5 kb を示す。(C) 各ステージの胚の total RNA を用いた RT-PCR による発生時間を追った発現解析。対照には Ubiquitin を用いた (下段)。HpaPKC mRNA は母性因子として存在し、発生を通して発現している。ステージの略述は図1と同様。(D) WMISH による空間的発現解析。各発生ステージは写真右下に略述。孵化期胚 (HB, 左上) では、植物極に位置する細胞で発現が限局する。間充織胞胚 (MB, 中上) では、PMC (黒矢尻) と植物板で強く発現している。初期原腸胚 (eGs, 右上) になると、PMC (黒矢尻) と原腸先端 (白矢尻) で強い発現が見られる。プルテウス幼生 (左下, PI) では、機毛帯に沿って点在する外胚葉細胞と、胚後端の間充織胞細胞 (矢印) で優位な発現がみられる。(右下) B2C2 抗原の発現。胚後端の HpaPKC 発現間充織胞細胞 (中下, 矢印) は、骨片形成細胞の一部と一致する (右下, 白矢印)。(E) MaPKC 注入胚の発生と初期卵割期の予定 PMC マーカー発現。(上段) 対照胚。(下段) MaPKC 注入胚。対照胚が間充織胞胚 (左上) の頃、MaPKC 注入胚では PMC が見られない (左下)。原腸胚期 (左中上) の頃、MaPKC 注入胚は死滅した (左中下)。初期胚期の予定 PMC マーカーの Delta (右中), Tbr (右) は MaPKC 注入胚と対照胚で発現に差がない。

学位論文審査結果の要旨

塩見氏から提出された学位論文について、上記5名の審査委員による査読の後に平成20年2月6日に口頭発表会が行われた。同日に最終の審査委員会が開かれ、審議の結果、以下のとおり判定した。

Par 遺伝子群はセンチュウ受精卵の非対称分裂を調節する遺伝子として同定された。本論文はウニ胚における *Par* 関連遺伝子 (*Par-1*, *Par-6*, *aPKC*) の発現と機能を初めて報告するものである。*Par-1* 発現は胞胚から原腸胚期に一過的に植物板に限局された。Kinase-dead 変異型 *Par-1* を過剰発現した胚はしわ胞胚様の表現型を示し、*Par-1* が初期卵割期の細胞接着に関わることを示唆した。*Par-6* 機能阻害および割球再構成実験によって、*Par-6* が小割球子孫細胞による骨片形成と消化管分化シグナル放出を調節していることを明らかにした。一方、*aPKC* は繊毛帯に点在する外胚葉細胞と胚後端の骨片形成細胞で局所的に活性化され、新規の細胞タイプの存在を示した。また、*aPKC* 機能阻害実験は、この遺伝子機能が胚の上皮構造の維持に必須であることを示した。以上のように、本論文はウニ胚における *Par* 遺伝子の発現を明らかにするとともに、*Par* 遺伝子が形態形成、中胚葉と内胚葉の間の相互作用、上皮構造の維持という多様な発生過程を調節しているという発生生物学における重要な知見を示したと評価され、学位論文に値すると判断した。