

氏名(本籍)	にし まつ しんいちろう 西 松 伸一郎 (愛媛県)
学位の種類	博 士 (農 学)
学位記番号	博 乙 第 917 号
学位授与年月日	平成 5 年 10 月 31 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 2 項該当
審査研究科	農 学 研 究 科
学位論文題目	STUDIES ON ACTIVIN RELATED PROTEINS AND ACTIVIN RECEPTORS IN EARLY <i>XENOPUS</i> EMBRYOS (両生類初期胚にあるアクティビン類似物質とアクティビン受容体に関する研究)
主 査	筑波大学教授 農学博士 村 上 和 雄
副 査	筑波大学教授 農学博士 日下部 功
副 査	筑波大学教授 理学博士 宗 像 英 輔
副 査	筑波大学教授 理学博士 岡 田 益 吉

## 論 文 の 要 旨

細胞増殖因子は、細胞の増殖を促進あるいは抑制するタンパク質として作用しているばかりでなく、細胞分化の調節因子としても機能していることがわかっている。最近、細胞増殖因子の mRNA やタンパク質が初期胚中に検出され、初期発生における形態形成に細胞増殖因子が重要な役割を担っていることが明らかにされつつある。たった一つの細胞である受精卵より、多細胞からなる親と同じ個体になるまでの課程に数多くの生理活性物質がその発生・分化のプログラムを精緻に制御していることは想像に易い。

両生類の受精卵は、黒い色素を含む動物半球と卵黄顆粒を多く含む植物半球に区別できる。卵割が進み桑実胚を経て胞胚になると、胚の帯域の細胞が分化し新たに将来、筋肉や骨等の組織になる中胚葉と呼ばれる細胞集団を形成する。この「中胚葉誘導」と呼ばれる現象は、胚移植の実験から胚の植物極側の細胞が動物極側の細胞に働きかけて引き起こされることが明らかにされている。この中胚葉誘導に関わる分子の実体は、長い間謎とされてきた。

アクティビンは、卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌を促進する因子として卵胞液中から単離精製されたホルモンであるが、その一次構造が形質転換増殖因子 (Transforming Growth Factor- $\beta$ ) と良く似ていたことからアクティビンの細胞増殖因子としての作用が示唆されていた。その後、アクティビンが赤芽球分化誘導因子 (EDF) と同一であることが明らかにされるなど、現在アクティビンはホルモンとしてばかりでなく細胞増殖因子としても機能するタンパク質として認識されている。

上野らは、ヒト・組み換え型アクティビンをツメガエルの予定外胚葉に作用させたところ、本来表皮になる細胞集団の中に中胚葉性組織 (筋肉や脊索など) が形成されることを明らかにした。組み換

え型アクティビンに強力な中胚葉誘導活性があることから、アクティビンが両生類の内在性中胚葉誘導因子として機能している可能性がある。ツメガエルでは胚由来の遺伝子の転写は胞胚期まで活発に行われなため、初期胞胚までに起こる中胚葉誘導などの胚発生に必要な物質は、母性由来の mRNA 又はタンパク質として供給されている。そこで本研究では、アクティビンが内在性の因子として初期発生において機能していることを検討するための第一歩として、分子生物学的手法により両生類のアクティビンとその受容体の構造を解析した。

#### (1) ツメガエル・アクティビン類似遺伝子のクローニング

ツメガエルのアクティビン遺伝子を得るために、哺乳類のアクティビン遺伝子をプローブとして、ツメガエルの染色体遺伝子ライブラリーをスクリーニングした。その結果、哺乳類のアクティビンと87%の相同性を示す遺伝子ばかりでなく、アクティビンと構造がよく似た骨形成因子 (BMP) の遺伝子を得ることができた。両生類の BMP の成熟タンパク質部分をヒトのもの比べると、114あるアミノ酸のうちわずか3つのアミノ酸にしか違いが見られなかった。クローン化した遺伝子をプローブとしてツメガエル初期胚における mRNA の発現時期を調べたところ、BMP の mRNA が未受精卵中から存在しており、アクティビンの mRNA は幼生期以降に検出できることがわかった。

#### (2) ツメガエル初期胚にある骨形成因子の解析

骨組織がない未受精卵中にアクティビンに良く似た BMP の mRNA が存在していることから、初期発生の形態形成に重要な役割を担っている可能性がある。そこでクローン化した BMP 遺伝子をプローブとして未受精卵 cDNA ライブラリーをスクリーニングしたところ、3種類の cDNA を得ることができた。ヒトで報告された BMP のアミノ酸配列との類似性から、これらの3つの cDNA は BMP-2, BMP-4 および BMP-7 をコードしていることがわかった。発生過程におけるこれらの mRNA の発現を解析したところ、いずれの mRNA も母性由来の mRNA として発現しているが、胚発生過程において別々に、mRNA の転写が制御されていることがわかった。次に BMP 蛋白質の初期胚における挙動を解析する目的で、BMP の成熟蛋白質部分に対する抗体を作製した。抗体価が上昇した BMP-4 に対する特異的な抗体を使ってツメガエル初期胚の BMP-4 蛋白質を検出したところ、分子量約27kDaの単量体として存在していることがわかった。

#### (3) アクティビン受容体遺伝子と初期胚での発現

アクティビンのツメガエル初期胚における生理作用は、初期胚に存在するアクティビン受容体の構造と機能を明らかにすることによっても検討することができる。そこでツメガエル初期胚にあるアクティビン受容体の構造を解析した。マウスの培養細胞を使った実験によりアクティビンには、分子量の違いにより3種類 (I型:42kDa, II型:51kDa, III型:151kDa) の受容体が存在することが確認されている。このうちII型の受容体がクローン化され、細胞内領域に Ser/Thr リン酸化酵素をコードしていることが明らかにされている。このマウス・アクティビン受容体の cDNA をプローブとしてツメガエル初期胚 cDNA ライブラリーをスクリーニングした。その結果、哺乳類で報告されているII型受容体ばかりでなく、II型と良く似たII B型受容体とII B型受容体の Ser/Thr リン酸化酵素領域のC末端側約100アミノ酸を欠損した受容体をコードする3種類のクローンを得る

ことができた。胚発生過程における mRNA の発現時期を解析したところ、いずれの受容体の mRNA も未受精卵中で転写され胚期以降異なるパターンで発現することがわかった。

#### (4) 欠損型アクティビン受容体のツメガエル初期胚での機能

欠損型受容体は、受容体タンパク質の C 末端側に位置する Ser/Thr リン酸化酵素領域を半分欠失していることからアクティビンのシグナルを伝達できない受容体である可能性を予想した。II 型や II B 型受容体の mRNA を両生類初期胚に注入すると、その胚が持つ本来の頭尾軸に加え新たに頭や尾（二次軸）を形成することが知られている。欠損型アクティビン受容体の mRNA を *in vitro* で合成し初期胚に注入したところ、欠損型受容体 mRNA を注入しても、II 型や II B 型受容体と同様に二次軸が形成された。次にアクティビンに対する受容体の応答能を検討するために、mRNA を注入した胚から予定外胚葉を切り出しアクティビン添加後、 $\alpha$ -アクチン mRNA の発現誘導を調べた。このアッセイにおいても同様に、いずれの受容体の mRNA を注入しても  $\alpha$ -アクチン mRNA の発現が上昇したことから、欠損型受容体もアクティビンのシグナルを細胞内に伝達できることがわかった。ウサギ網状赤血球由来の抽出物を使って *in vitro* で欠損型アクティビン受容体の mRNA を翻訳したところ、分子量が約 64kDa と推定された。マウスの I 型アクティビン受容体の分子量が約 42kDa と推定されていることならびに欠損型受容体がアクティビンのシグナルを細胞内に伝達できることを考え合わせると、クローン化した欠損型受容体は両生類の I 型アクティビン受容体である可能性が示唆された。

本研究によりアクティビンやアクティビン受容体ばかりでなく骨形成因子が両生類に存在していることが明らかとなり、初期胚における形態形成に深く関わっていることが示唆された。またこれらに対する cDNA や抗体を使って初期胚におけるアクティビン類似物質の生理作用を分子の言葉で解明することが可能になった。

## 審 査 の 要 旨

アクティビンは、卵胞刺激ホルモン (FSH) の分泌促進因子として精製されたタンパク質であるが、その後赤芽球分化誘導活性など様々な生理作用を有することが明らかになりつつある。本論文は、アクティビンが初期胚中に存在し発生過程の形態形成に重要な役割を担っている可能性を明らかにする目的で行っている。哺乳類のアクティビン遺伝子をプローブとして両生類の遺伝子をクローン化し、アクティビンの mRNA が発生後期に検出できることを明らかにした。またアクティビンの作用をリガンド側からばかりでなく受容体側からも検討している。なかでも細胞内にあるリン酸化酵素領域を半分欠損したアクティビン受容体遺伝子を世界に先駆けて単離し、初期胚中での生物学的機能を解析したことは非常に高く評価できる。さらにアクティビン遺伝子をクローン化する過程で骨形成因子の遺伝子を得ることに成功し、発生過程における mRNA やタンパク質の挙動を解析している。骨組織がまだ形成されていない初期胚で、骨形成因子の新たな生理的機能を示唆している点でも意義深い。

よって、著者は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。