

氏 名 服 藤 尚 恵

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大甲第467号

学位授与の日付 平成12年3月24日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻

学位規則第4条第1項該当

学 位 論 文 題 目 ヒドラの足部形成活性化ペプチド、Hym-323の機能解析

論 文 審 査 委 員 主 査 教 授 廣海 健
教 授 林 茂生
教 授 桂 勲
教 授 城石 俊彦
教 授 渡辺 憲二（姫路工業大学）

論文内容の要旨

腔腸動物の一種、淡水産チクビヒドラ (*Hydra magnipapillata*) は、二層の上皮組織が細長い袋状となった、その一端に頭、他端に足があるという単純な形態をしている。その体制は放射相称で頭-足 (上-下) の一次元軸である。ヒドラは、強く正確な再生能力を持つ。例えば、頭と足を切り除いても、数日で元の頭-足軸に従って、必ず頭があった側からは頭を、足があった側からは足を再生する。この現象は、ヒドラの体に極性があることを示している。また、その再生体は、サイズは小さくなったものの形態的な違いはない。このヒドラにおける極性に関して、過去に多くの組織移植実験が行われ、それらの結果から、ヒドラの体には頭と足からそれぞれ体軸に沿って勾配をなす形成能と抑制能とがあり、これらの勾配によって極性が作られているという位置情報モデルが提唱されている。しかし、この勾配や極性の実体となる因子や分子機構については、近年候補分子の単離や解析などが進み始めてはいるが、未だほとんど分かっていない。そこで本研究では、ヒドラにおける極性とパターン形成の機構を分子レベルで解明することを目的に、現在我々の研究室で行われているペプチド性情報分子の大規模スクリーニングの過程で単離されたペプチドの中から、形態形成に影響を与える分子を選び出し、その機能解析を行うことにした。実験に用いた Hym-323 は、アミノ酸 16 残基からなる新規ペプチド (KWVQGKPTGEVKQIKF) で、その配列はヒドラの形態形成因子として同定された神経ペプチド head activator と C 末側のアミノ酸配列が 50% 一致していた。また、スクリーニングの過程で行っている活性検定、即ちペプチドがヒドラの遺伝子発現に影響を与えるかどうかを Differential display-PCR 法で検定した結果は、ポジティブであったことから、Hym-323 は情報分子であると考えた。

初めに、Hym-323 のペプチドの配列中に安定化に関与する様な配列や、修飾されたアミノ酸が見られなかったことから、飼育水中における安定性について調べた。その結果、安定性は比較的 low、特に光に弱いことが分かった。次にこの点を考慮して、

Hym-323 の機能解析を行った。Hym-323 の C 末側が、頭部再生促進や細胞増殖、神経分化促進活性を持つ head activator と相同性が高かったことから、まず頭部再生と細胞増殖、分化への影響について調べた。その結果、頭部再生や、上皮細胞や間細胞の増殖、神経細胞や刺細胞の分化などへの影響は検出できなかった。次に、Hym-323 の足部再生への作用を、2 種類の足部特異的マーカー、足部特異的ペルオキシダーゼ活性と、ヒドラの足盤細胞から分泌される粘性物質を特異的に認識するモノクローナル抗体 AE03 とを用い、異なった方法によって調べた。その結果、どちらの実験においても Hym-323 処理により、未処理の対照群と比べて有意な足部再生促進が見られた。また、ペルオキシダーゼ活性を用いて Hym-323 の濃度依存的な作用を調べたところ、 10^{-9} M から 10^{-6} M の範囲において、濃度依存的な活性の上昇が見られた。

ヒドラの形態形成には、上皮組織が主要な役割を担っているが、一部、間細胞系譜の細胞が関与していることも示唆されている。そこで、Hym-323 の足部再生の促進効果が、直接上皮細胞に働きかけた結果なのかどうかについて調べるため、間細胞系譜の細胞を持たない上皮組織のみからなるヒドラ(上皮ヒドラ)を用いた。その結果、上皮ヒドラを用いた場合でも、正常ヒドラを用いた場合と同等な再生促進活性がみられた。よって、Hym-323 は直接上皮に作用していると考えた。しかし、間細胞を介する活性があるかどうかについては、まだ分かっていない。

Hym-323 は上皮組織に働きかけて足部再生を促進していることから、ヒドラの体軸に沿った足部形成能の勾配に影響を及ぼしている可能性が考えられた。そこで、側方移植法を用いて調べることにした。Hym-323 処理個体から組織片を切り出し、未処理の個体の同じ位置へ移植した。その結果、ペプチド処理された移植片は、未処理の組織片に比べて、有意に異所的な足部形成の誘導率を上昇させた。従って、足部形成能の勾配は、Hym-323 により高められ、そのため側方移植実験において足部形成の誘導がみられたと考えられた。これまで行った一連の組織学的手法による機能解析の結果から、Hym-323 は直接上皮に作用し、細胞の持つ足部形成能を引き上げ、足部形成や

再生の促進を誘導することが示唆された。

細胞内における Hym-323 の分布パターンやその作用経路について調べるために、まず *hym-323* 遺伝子の単離を行った。縮重プライマーによる PCR と nested PCR、ライブラリーのスクリーニングによって、Hym-323 ペプチド前駆体タンパク質をコードするほぼ全長の *hym-323* cDNA を単離した。予想アミノ酸配列中には、C 末側の末端に Hym-323 が 1 コピーコードされていただけで、類似の配列や他の既知のペプチド配列などはみられなかった。また N 末側にシグナル配列らしき領域もみられなかった。次に、*hym-323* mRNA の空間的発現を、whole mount in situ hybridization 法とノーザンブロット解析を用いて調べた。その結果、体の両端の構造 (触手や口丘の外胚葉組織と足盤) を除く全体で、かつ内外二層の上皮組織で一様に発現していることが分かった。このことから、Hym-323 は上皮細胞で常に合成されている、上皮性ペプチド(epitheliopeptide) であることが分かった。

以上の研究から、Hym-323 は上皮細胞で合成され、直接上皮に働きかけ足部形成の調節を行う形態形成因子である可能性が示唆された。

論文の審査結果の要旨

ヒドラは頭一足の一次元軸を持つ放射相称の体制をとる。頭一足軸上の様々な位置から組織断片をホストに移植すると、ドナーの頭に近い場所ほど頭部形成能が高く、足に近いほど足部形成能が高い。逆に、ホストの頭一足軸上の様々な位置への移植により、頭部は足部抑制能が高く、足部は頭部抑制能が高いことがわかっている。これらの実験から、頭一足軸に沿って各領域は位置特異的形態形成能を持つことが示唆されるが、位置情報の実体やその生成メカニズムについては不明な点が多い。これまで、再生の際に頭部あるいは足部の形成を促進するペプチドがいくつか同定されている。この内の一つ、head activator は頭部再生を促進するとともに、細胞増殖・神経分化促進活性を持つ。藤沢研におけるペプチド性シグナル分子の大規模検索の過程で、C末10残基の内、5残基がhead activatorのそれと一致している新規ペプチドHym-323が同定された。服藤さんはHym-323の生理機能の同定及びその発現パターンの解析を行った。

Hym-323の配列がhead activatorに類似していたため、まずHym-323がhead activator様の活性を持つかどうか調べた。その結果、Hym-323は頭部再生能、細胞増殖、神経分化いずれをも促進しないことがわかった。そこで、足部形成に対するHym-323の影響を解析した。足盤特異的マーカー2種類を使って、足部再生過程に対するHym-323の影響を調べたところ、2種の実験系において、Hym-323は再生足の足盤マーカーの発現を促進させることがわかった。さらに、Hym-323が作用する組織を同定するため、間細胞系譜を持たず、上皮組織からのみなる上皮ヒドラに対する影響を調べた。Hym-323は上皮ヒドラの足部再生率をも上昇させたことから、Hym-323は上皮に直接作用しうることがわかった。これはヒドラの形態形成に上皮細胞が主要な役割を担っているという知見と一致した。

Hym-323による足部再生の促進は、頭一足軸上の位置情報、あるいは足部形成能が変化したためである可能性がある。そこで、側方移植実験により、Hym-323の足部形成能に対する影響を調べたところ、ドナーのペプチド処理により、ホストへの移植後の足部形成能が有意に上昇することを見いだした。一方、予備的実験結果ではあるが、ホストのペプチド処理によって足部抑制能は変化しないことを示唆するデータも得られた。

Hym-323の発現パターンを解析するため、Hym-323ペプチド前駆蛋白をコードすると思われるcDNAの単離を行った。予想アミノ酸はシグナル配列を持っていないが、C末にHym-323を1コピー含んでいた。hym-323mRNAは内外2層の上皮組織で発現しており、頭一足軸上での空間的分布は、体の両端で発現がないのを除けば一様であった。以上の結果から、Hym-323は上皮細胞で作られ、上皮組織に作用して足部形成能を上昇させる上皮ペプチドであることが示された。

種々の移植実験に基づき、ヒドラの頭一足軸上のパターンニングは、頭、足を二つのオーガナイザーとし、そこにピークを持つ頭部形成、足部形成、頭部抑制、足部抑制の4つの活性の勾配によって決定されるというモデルが提唱されている。服藤さんは、側方移植実験によって測定できる4つの活性のうち、Hym-323には少なくともその一つ（足部形成能）を変化させる働きがあることを示した。Hym-323の足部再生促進活性や、遺伝子発現パターンを変化させうる活性も、Hym-323がシグナル分子として形態形成に深く関わっていることを示唆している。Hym-323がいかにして足部形成能を上昇させるのかはまだ不明だが、服藤さんの論文はヒドラの古典的発生学と分子レベルの技術を見事に組み合わせ、この分野に貴重な貢献をした。以上の理由で、この論文は博士（理学）の学位論文として十分な内容を持つ、と審査員全員の意見が一致した。