

氏 名 橋口恵

学位（専攻分野） 博士（理学）

学 位 記 番 号 総研大甲第 1164 号

学位授与の日付 平成 2 0 年 3 月 1 9 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 6 条第 1 項該当

学 位 論 文 題 目 Analysis of secondary axis induction by zebrafish cell  
lines

論文審査委員	主 査 教授	相賀 裕美子
	教授	広海 健
	准教授	川上 浩一
	助教	布施 直之
	チー ム リーダー	日比 正彦（理化学研究所）

Early in vertebrate development, body axes are patterned by an adequate series of inductive events. These events are organized by a specific region in embryos. The region is known as the organizer—the source of inducing signals. Previous studies of dorsal axis formation in amphibians have identified two kinds of organizers; Two the primary organizing center, so-called Nieuwkoop center, and the dorsal organizer (Spemann organizer). The Nieuwkoop center induces the dorsal organizer; and then the dorsal organizer dorsalizes the adjacent mesoderm and induces the neural ectoderm. The Nieuwkoop center and the dorsal organizer are largely conserved structurally among other vertebrates. In zebrafish and other teleosts, for example, the Nieuwkoop center and the dorsal organizer are known as the dorsal yolk syncytial layer and the embryonic shield, respectively. Recent studies with zebrafish mutants have uncovered molecules acting in these inductive events. However, the details of the molecular mechanisms of formation of the dorsal organizer remain unclear.

Here, I propose to address this issue by using the zebrafish cultured cells. Preliminary experiments in our lab have shown that zebrafish cultured cells form secondary axis when the cells were implanted into mid-blastula of zebrafish embryos. I demonstrated that this culture cell system is potentially useful to disclose the mechanism of the secondary axis formation or dorsal axis induction.

In chapter one, I discussed the ability of cultured cells for the induction of secondary axis. I established zebrafish cell lines derived from various developmental stages and implanted these cell lines into the mid-blastula of zebrafish embryos. I observed that the implantation of all of the established cell lines could induce a secondary axis. Then, I examined whether this phenomenon is caused by induction of neural tissues or by induction of the dorsal organizer itself. The results were: (i) Secondary axis was never induced when cells were implanted after formation of the endogenous organizer. (ii) The implanted cells themselves were not differentiated, but they induced notochord in the secondary axis. (iii) Ectopic expression of dorsal organizer markers was observed only around the implanted cells. From these results, I concluded that the established cell lines induce the secondary axis through induction of the dorsal organizer rather than mimicking the dorsal organizer activity.

In chapter two, I investigated the molecular mechanism of dorsal organizer induction by these zebrafish cell lines. Recent studies have uncovered two kinds of molecules, *bozozok/dharma* (*boz*) and *squint* (*squint*), two molecules that act in parallel to induce the dorsal organizer in the Nieuwkoop center and act in parallel to induce the dorsal organizer in the dorsal yolk syncytial layer: and *bozozok/dharma* (*boz*) (Fekany et al., 1999; Koos and. Hence, I investigated the relation of these two molecules and the dorsal organizer induction by the zebrafish cell lines. Cultured cells did not express *boz*. In addition, expression of *boz* was not observed both around the implanted

cells and in the cells themselves. These data suggest that zebrafish cell lines induced the dorsal organizer without activating *boz*. I implanted cell lines into maternal-zygotic one-eyed pinhead (MZoep) mutant, which fail to receive Nodal signaling. Even in the mutant, the cell lines could induce the dorsal organizer and the secondary axis. Furthermore, the phenotype of MZoep mutants of secondary axis was not rescued by implantation of the cell lines. These data, therefore, suggest that the cultured cells induced the dorsal organizer independently of the Nodal signaling pathway. Taken together, I concluded that zebrafish cell lines induce the dorsal organizer by activating neither *boz* nor Nodal signaling.

In chapter three, I explored the candidate genes responsible for the dorsal organizer induction by zebrafish cell lines. I first examined relation with known secreting factors and the causing factor of the dorsal organizer induction by zebrafish cell lines. I examined expression of fgfs and wnts in cultured cells by RT-PCR. The cultured cells showed no or little expressions of fgfs or wnts. In addition, I investigated expression of *dkk-1*, inhibitor of Wnt signaling, in the implanted embryos. Although ectopic expression of *dkk-1* was observed around the implanted cells, cultured cells did not express *dkk-1* themselves. Therefore, I considered that this factor is not sufficient to explain the inductive ability of the dorsal organizer by zebrafish cell lines. Then, I performed microarray analysis in comparison to cultured cells and wild-type embryos. By screening the microarray data, I obtained 14 genes as a candidate. Further studies of these candidate genes could provide new insights into molecular mechanisms of the dorsal organizer induction.

脊椎動物の発生過程において、体軸は連続した“誘導”により形作られる。それら“誘導”には、ニューコープセンターと背側オーガナイザー（シュペーマンオーガナイザー）の2つのオーガナイザーが重要な役割を果たすことが知られている。両オーガナイザーの役割は脊椎動物間で保存されており、ゼブラフィッシュなどの硬骨魚類では、背側卵黄多核層と胚盾がそれぞれのオーガナイザーの役割を果たす。近年のゼブラフィッシュ突然変異体を用いた解析により、誘導の分子機構が明らかにされてきたが、その詳細は未だ不明である。橋口さんは、ゼブラフィッシュの培養細胞が二次軸誘導能を持つことに興味を持ちその分子機構の解析を通してゼブラフィッシュの背軸誘導機構を解明することを目指して研究を行った。博士論文は3部構成になっている。

第1章はゼブラフィッシュ培養細胞の樹立とそれらの二次軸誘導活性に関する解析である。橋口さんは、様々な発生段階の胚や稚魚から培養細胞を樹立し、それらを中期胞胚に移植すると二次軸を形成することを発見した。まず培養細胞がニューコープセンターと背側オーガナイザーのどちらの活性を模倣しているのかを調べたところ(i)内在性の背側オーガナイザーがすでに形成された初期囊胚に移植した場合には二次軸は誘導されない(ii)移植した細胞は増殖分化せずに脊索を誘導する(iii)培養細胞自身は背側オーガナイザーマーカーを発現しないがその誘導能力をもつ、という結果を得た。これらのことから、橋口さんは、ゼブラフィッシュ培養細胞はニューコープセンター様の活性を有すると結論づけた。

第2章は、誘導の分子機構の解析である。まず背側オーガナイザーの誘導に関与する因子として知られている *Bozozok/Dharma* (Boz) 及び *Nodal* との関係を調べた。培養細胞は *boz* を発現しておらず、移植した細胞自身やその周りに *boz* の発現は確認されないことがわかった。また、*Nodal* シグナル受容の必須分子である *one-eyed pinhead* (*oep*) を完全に欠損した *maternal-zygotic oep* 突然変異体に移植した場合にも、背側オーガナイザーが誘導された。これらのことから、培養細胞は Boz や *Nodal* 非依存的に背側オーガナイザーを誘導する能力をもつことが示された。

第3章は、その培養細胞が産生する誘導分子の探索である。まず、背軸の形成に関わることが知られている既知の *FGF* や *wnt* の発現を調べたが、それらの発現の亢進は見られなかった。次にマイクロアレイ解析を用いて未同定の分子の探索を行った。このスクリーニングの結果、14の候補遺伝子を得た。これらの遺伝子の解析により、背側オーガナイザーの誘導に関わる新たな知見がもたらされる可能性が示唆された。

以上のように、橋口さんはゼブラフィッシュの培養細胞には、既知の誘導分子とは異なる分子が発現している可能性、またこれまで知られていた分子機構とは異なったメカニズムで背側オーガナイザーを誘導している可能性を提唱している。非常に粘り強い緻密な解析によりこれらの結論を見出したことは高く評価でき、遺伝学専攻の博士論文としての条件を満たすと審査委員全員が認めた。