

氏名・(本籍)	おお すぎ ひろ のり 大 楷 弘 順
学位の種類	理 学 博 士
学位記番号	理博第 986 号
学位授与年月日	昭和 61 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当
研究科専攻	東北大学大学院理学研究科 (博士課程) 生物学専攻
学位論文題目	鵝胚肢芽パターンのモノクローナル抗体による研究
論文審査委員	(主査) 教 授 竹 内 拓 司 教 授 小 西 和 彦 助 教 授 井 出 宏 之

論 文 目 次

I. 序 論	1 頁
II. 材料と方法	7 頁
III. 結 果	18 頁
1. 部域特異的結合を示すモノクローナル抗体 (AV-1)	19 頁
2. 肢芽の発生過程における AV-1 抗原の分布パターン	21 頁
3. ZPA 移植後の AV-1 抗原の分布パターン	24 頁
4. 電子顕微鏡による観察	25 頁
5. 電気泳動及びイムノブロッティング	26 頁
IV. 論 議	29 頁
V. 要 約	46 頁
VI. 謝 辞	50 頁
VII. 引用文献	52 頁
VIII. 図の説明	56 頁

論文内容要旨

序論

高等動物の三次元の生物形態がいかにして形成されるか、その分子機構については、現在のところ、我々はほとんどその実体を知らない。著者はこの分子機構を解明する糸口を得るため、脊椎動物の手足（肢）の形態形成をモデル系として研究を進めた。

肢の発生の初期に於いて、ZPA (Zone of Polarizing Activity, 肢芽の後部の一部領域) を肢芽の各領域、特に肢芽の前部に移植すると、肢のパターンはダイナミックに変化することが知られている。このことは、肢芽には領域による違いがあることを示唆しており、それらの領域どうしの間で、例えば少なくとも肢芽のZPA領域とそれ以外の領域の間で、物質的な違いがあることが推定される。さらに、そのような、領域による物質の違いがもし存在するならば、その物質こそが肢のパターン形成に大きな役割を果たしていることが予想される。現在まで、肢芽に於いて、そのような領域特異的な物質の存在は知られていないが、もし、その物質が発見できれば、パターン形成の分子機構を解明する大きな糸口となると考えられる。この研究の目的は、パターンの決定が進行する発生初期の肢芽に於いて、予想される領域特異的な物質を、モノクローナル抗体法を利用して、検出することである。

結果

1. 領域特異的結合を示すモノクローナル抗体 (AV-1)

ステージ21-23の鶏胚肢芽のホモジネイトを抗原として、モノクローナル抗体を作成し、ステージ23の組織切片に対する間接蛍光抗体法によりスクリーニングを行なった。その結果、約4500個のハイブリドーマコロニーのなかで、1コロニー、目的とする、発生段階初期の鶏胚肢芽の特定の領域にのみ結合するモノクローナル抗体を産生するものを得ることが出来た。このハイブリドーマを3回クローニングし、安定した抗体産生クローンを得た。ステージ22の肢芽において、この抗体が特異的に結合する領域を間接蛍光抗体法により観察した結果がFig. 1である。Fig. 1が示すように、この抗体は肢芽の前部 (Anterior) かつ腹部 (Ventral) を占める領域のうち、基部から先端にかけて扇状に広がるような空間領域に対してのみ特異的に結合する。さらに、この抗体は外胚葉には結合せず、そのような領域の中胚葉に対してのみ特異的に結合する。この結果は30個体以上から得た300個以上の切片によって確認した。この抗体を以下AV-1抗体と呼ぶ。ステージ22に於けるAV-1抗体のこのような領域特異的な結合パターンは、左右の前肢芽及び左右の後肢芽において同様に観察された。また、このステージの他の組織にはAV-1抗体の結合は観察されなかった。

2. 肢芽の発生過程におけるAV-1抗原の分布パターン

肢芽の前-後軸と基部-先端軸を含む断面について、その各発生段階におけるAV-1抗原の分布パターンを、間接蛍光抗体法により観察した結果をFig. 2に示す。AV-1抗原はステー

ステージ19から観察され、ステージ26までは強い蛍光像が観察された。それ以後はステージが進むにつれて、しだいに蛍光像は弱くなり、前肢芽においてはステージ33以後、後肢芽においてはステージ29以後に、観察されなくなった。

また、これまでの観察において、AV-1抗原は、ステージ19-32においては、肢芽以外には観察されず、ステージ15-18及びステージ33-37においては肢芽を含めてどの組織にも観察されなかった。

AV-1抗原の、肢芽の前-後軸方向の分布パターンとして特徴的なことは、ステージ19において、前-後軸の中央部分のやや前方よりの部分に観察され始め、ステージ22においては、中央からより前方にかけて観察され、ステージ24以後は、ステージが進むにつれて、しだいに前半部分の特定の領域を占めるように幅がやや狭くなる点である。ステージ27-28に於いては、将来、前肢における橈骨、尺骨（後肢においては脛骨、腓骨）や、各指骨になる領域に細胞の凝集が観察されるようになるが、このようなステージにおいては、AV-1抗原は、前肢においては橈骨と尺骨の間、後肢では脛骨と腓骨の間から、前肢、後肢共に、前方より数えて第一指と第二指の間にかけての領域の一部にのみ分布が観察された。

AV-1抗原の、基部-先端軸方向の分布パターンとして特徴的なことは、ステージ19においては先端の外胚葉の直下の中胚葉に強い蛍光像が観察され、それ以後、ステージ24までにおいても、基部から先端にかけて、より先端ほど広い領域を占めるように扇形の分布を示す点である。それ以後のステージに於いても、蛍光像が強く観察されるステージ26までは、先端に近い領域に広い分布が観察された。

AV-1抗原は、背-腹軸方向においては、基部から先端にかけて、中心から腹側へほぼ扇形の分布パターンを示す。この分布パターンはステージ19からステージ24まで同様に観察された。それ以後のステージにおいても、より基部の部分では中心に近い領域に分布し、より先端の部分では中心からより腹側の領域にかけて分布が観察された。

AV-1が観察される領域とそれ以外の、中胚葉域との境界部分では、細胞あたりの蛍光の強さは連続的に変化しているように観察された。

3. ZPA移植後のAV-1抗原の分布パターン

ステージ19において肢芽の前部にZPAを移植した胚を、ステージ25まで発生させた。移植を行なった前肢芽はステージ25においては、正常な肢芽形態に加え、それより前方に過剰に増殖した部分をもつようになり、いわばコブを2つもつような形になる。このような肢芽におけるAV-1抗原の分布を、間接蛍光抗体法により観察した結果、AV-1抗原は正常な領域におけるほぼ正常な分布パターンの他に、過剰な部分においては、正常な領域の分布パターンとはほぼ鏡像対称的な分布パターンを示した。

4. 電子顕微鏡による観察

間接酵素抗体法を用いて、ステージ23におけるAV-1抗原の分布を電子顕微鏡により観察した結果、AV-1抗原は細胞質内にも広く観察されたが、特に細胞の周辺に近い部分及び細胞

膜と考えられる部分に強く観察された。また、このステージにおいては、中胚葉の細胞どうしは細胞間物質によって隔てられており、細胞と細胞は細胞突起により接している像が観察されるが AV-1 抗原はそのような細胞突起の部分にも強く観察された。さらに、細胞間にも、細胞間物質と接合していると思われるような反応像が観察された。

5. 電気泳動及びイムノブロットィング

電気泳動及びイムノブロットィングを行なった結果、5本のバンドに特異的な反応が認められ最も分子量が小さいバンドに、最も強い反応が見られた。メルカプトエタノールを加えると、反応が認められなくなるため、メルカプトエタノールは加えていない。このため、必ずしも正確な分子量を反映しているとは言えないが、分子量マーカーと対応させると5本のバンドは、およそ 175 K から 290 K の間に観察された。

論 議

鵝胚肢芽においては、パターン形成の決定は基部から先端にかけて進行し、ステージ 21, 22 においては、少なくとも指骨のパターンはまだ決定されていないことが示されている。AV-1 抗原は、まさにそのような、パターンの決定が進行していると考えられるステージにのみ出現しパターンの決定が終了したと考えられるステージ 27, 28 以降には、抗原性はしだいに観察されなくなる。このことは、AV-1 抗原が軟骨パターンの決定過程に関与していることを示唆する一つの証拠と考えられる。

AV-1 抗原が観察される中胚葉の空間領域は、肢の発生において何か特定の組織に対応するものではない。筋肉、神経、血管、結合組織、そして軟骨も AV-1 領域にも、それ以外の領域にも形成される。このことは AV-1 抗原が、何か特定の組織の形成の過程において出現する物質ではないことを意味している。また肢芽の発生過程においては、細胞死が観察されるが、AV-1 領域はそれらの領域とも全く異なる。

このように AV-1 抗原は、軟骨のパターンの決定が進行中の肢芽に、組織特異的ではなく、部域特異的に出現する。このことは、もし、AV-1 抗原が肢の発生において何らかの機能を果たしている物質であると仮定するならば、その機能とは、軟骨のパターンの形成の際に、軟骨が形成される位置を指定することである可能性が、十分考えられる。ステージ 27-28 における AV-1 抗原の分布が、前肢において尺骨と橈骨の間、後肢において脛骨と腓骨の間、及び前肢、後肢共に、前方より数えて、第一指目と第二指目のあいだに限られることは、この可能性をさらに強く示唆するものである。つまり AV-1 抗原は、肢における尺骨と橈骨（後肢では脛骨と腓骨）、及び前方より第一指と第二指の位置を指定する機能に関与していると考えられる。

肢芽のパターンの決定は、肢芽の中胚葉のうちその先端部分において行なわれると考えられている。この先端部分は Progress Zone と呼ばれているが、AV-1 抗原はパターンの決定が進行していると考えられるステージ 19-25 において、中胚葉の先端部分においてほど、より広い領域により強い抗原性が観察された。このことは、AV-1 抗原がパターンの決定過程に関与し

ていることをさらに示唆するものである。

Z P A を発生初期の肢芽の前方部分に移植し発生させると、過剰な軟骨（特に指骨）が、鏡像対称的なパターンで形成されることが知られている。ステージ 25 の肢芽においては、前述のように各指骨の決定が進行すると考えられており、少なくとも、後に指骨が形成される部分の細胞の凝集化はまだ観察されないが、Z P A 移植により、ステージ 25 の胚の肢芽の過剰に増殖した部分に、軟骨形成に先だって、鏡像対称的な A V - 1 抗原の分布が観察されることは、A V - 1 抗原が軟骨パターンの形成に関与していることをさらに示唆するものである。

ステージ 23 の肢芽の免疫電顕による観察において、A V - 1 抗原は細胞質の周辺部分と細胞膜と思われる部分に多く観察され、また、細胞間にも細胞間物質に結合しているような像が観察された。このステージの肢芽の中胚葉の各細胞はお互いどうしが密な結合はせず、細胞間物質を間にしてある程度距離を保ちながら、細胞の一部のみで接触をしている状態で存在している。A V - 1 抗原分子の機能については、現時点ではまだ推定の段階であるが、仮に、ある細胞が他の細胞に対して情報を与える作用を担っていると考えた場合、細胞膜、あるいは細胞間物質中に存在することが合理的と考えられる。また、細胞と細胞が接触しているような部分の細胞質で、強い抗原性が観察されたことも、矛盾がないように考えられる。つまり、A V - 1 抗原分子は細胞質中で作られた後、細胞膜に移動し、他の細胞と接触している細胞膜上で他の細胞に作用するか、あるいは細胞間に分泌されて他の細胞に作用するか、そのどちらかを、あるいは両方を行なっている可能性が考えられる。イムノブロッティングの結果 5 本のバンドに抗原性が観察されたことは、あるいはこのことを反映しているとも考えられる。つまり、細胞質で作られた A V - 1 抗原分子が、最初の状態、細胞膜に移動する過程における状態、細胞膜に存在する状態あるいは細胞間に分泌される状態において、分子上に各種の修飾が行なわれたり、あるいは幾つかのサブユニットの結合により各種の分子形態をとるため、それらが異なったバンドとしてとらえられた可能性が考えられる。

A V - 1 抗原分子の分子量がおよそ 175 K 以上であることは、もし A V - 1 分子が細胞間に分泌された場合においても、その速やかな拡散は起きないことが予想される。このことは、もし A V - 1 分子が他の細胞に対してなんらかの情報を与える機能を持つと仮定した場合においても、そのような作用は極く近傍の細胞に対してのみ行なわれることを意味している。

この研究は、発生初期の肢芽に、実際に部域特異的物質が存在することを示した最初の仕事である。A V - 1 抗原の実際の機能を明らかにすることは、今後の研究課題であるが、このような物質の発見は、これまで「位置情報」あるいは「位置値」という言葉で、概念的に言い表わされてきたものの実体が、分子レベルの研究対象となり得る可能性を示すものである。さらに A V - 1 抗原そのものが、その実体である可能性も十分考えられる。また、モノクローナル抗体を用いる方法が、肢芽において、部域特異的物質を発見するのに有効であることも、今回初めて明らかになった。A V - 1 抗原のような部域特異的物質の、今後の分子レベルでの研究は、これまで全く謎であった肢のパターン形成の分子機構を解明する大きな突破口になると考えられる。

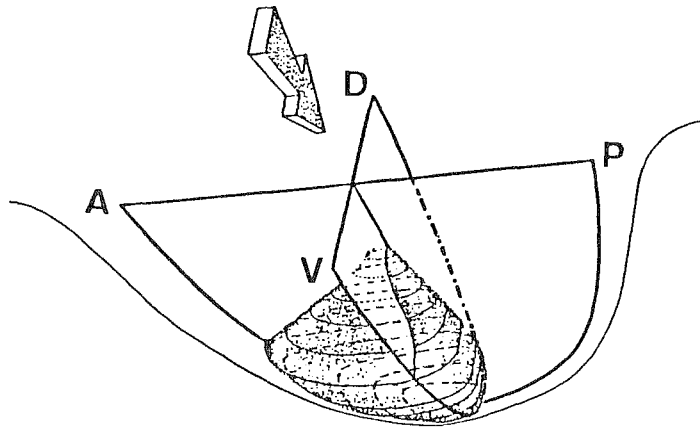


Fig. 1 ステージ 22 の右前枝芽において、AV-1 抗体が特異的に結合する空間領域を示した図。図中の線と点線で囲まれた点をうった空間が、AV-1 抗体が特異的に結合する領域を示す。

右前枝芽を下から見たときの図で、矢印は基部から先端方向を示す。A = 前方向, P = 後方向, D = 背方向, V = 腹方向。

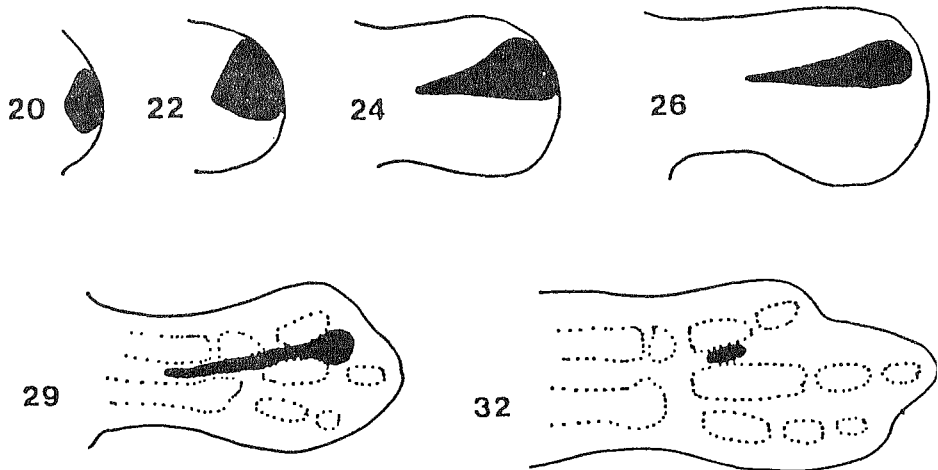


Fig. 2 各発生段階の前枝芽において、前-後軸と基部-先端軸を含む断面について AV-1 抗体が特異的に結合する領域（黒く塗りつぶした領域）を示す。ステージ 29 や 32 における抗原性は、ステージ 20-26 と比較すると非常に弱くなる。

数字は各ステージを示し、各図で右が先端方向、上が前方、下が後方。点で囲んだ領域は、細胞の凝集が観察される領域を示す。

論文審査の結果の要旨

脊椎動物の四肢の骨のパターンは、多くの動物種において基本的に共通であり、そのパターンの形成に関する研究は発生生物学の最も大きな分野のひとつである。今迄、主に鶏胚を使って多くの実験が行われ、いくつかの理論が提出されたが、パターン形成の分子機構は全く不明であった。本論文は、鶏胚肢芽の領域に特異的なモノクローナル抗体を得、その抗原の分布から、肢芽パターン形成の分子機構を明らかにしようとしたものである。

鶏胚肢芽ホモジネートを用いて作成したモノクローナル抗体のうち、胚の一時期の肢芽の前半部かつ腹側の領域のみに結合する抗体を見つけ、これをAV-1抗体と名付けた。これに相当する抗原(AV-1抗原)は、前肢芽においては、ステージ19-32、後肢芽においてはステージ19-28にのみ出現し、肢芽以外の場所には出現しない。また、この抗原は特定の組織の分化に直接関連して出現するものではない。これらの分布パターンは、この抗原が肢芽でのパターン形成に関与していることを示唆している。胚芽の後部領域のZPA(極性化活性帯)を前部に移植すると鏡像対称的な軟骨パターンが形成されるが、それに先立って、AV-1抗原の鏡像対称的な分布がみられた。これはAV-1抗原がパターン形成に関与していることを支持している。発生の進んだ肢芽でのAV-1抗原の分布を詳しく調べると、前肢では橈骨と尺骨の間になる領域および、より先端の第一指と第二指の間になる領域に出現し、後肢でもそれらに相当する領域に出現した。これらの領域の形成にAV-1抗原が関与しているものと考えられる。

AV-1抗原の分布を電子顕微鏡観察で調べてみると、細胞周辺部の細胞質、細胞膜、細胞間物質中等に広く分布していることが明らかになった。また、電気泳動とイムノブロットングの結果、AV-1抗原分子は分子量がおおよそ175Kから290Kに相当する5本のバンドとして検出された。

これらの成果は、肢芽パターン形成の分子機構に関する全く新しい知見であり、肢芽のみならず、他の多細胞体制の形成機構の解明についても、大きな寄与をするものと考えられる。従ってこの論文は、著者がこの分野において自立して研究活動を行なうに必要な高度の研究能力と学識を有することを示しており、よって大槻弘順提出の論文は、理学博士の論文として合格と認める。