

氏名・(本籍)	た　むら　こう　じ 田　村　宏　治
学位の種類	博　士(理　学)
学位記番号	理博第1332号
学位授与年月日	平成5年3月25日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科専攻	東北大学大学院研究科 (博士課程)生物学専攻
学位論文題目	ニワトリ胚枝芽の軸形成に対するレチノイン酸の作用機構の 解析
論文審査委員	(主査) 教　授　竹　内　拓　司　　教　授　長　内　健　治 助教授 井出宏之

## 論　文　目　次

序	
第1章 序論	
第2章 レチノイン酸による枝芽前側組織のZPA化	
第3章 レチノイン酸による枝芽組織の基部化	
第4章 レチノイン酸拮抗阻害剤TD550の枝芽形態形成への影響	
第5章 総合考察	
第6章 材料と方法	
第7章 要約	
第8章 謝辞	
第9章 引用文献	
第10章 図・表の説明	
表1～表6	
図1～図21	

## 論文内容要旨

〔序〕生物を観察するあるいは研究するにあたって、その生物の形態を考慮することは不可欠である。発生学においては、この“生物の形態”がいかにして形成されるかという問題が一つの大命題とされており、いろいろな動物種のさまざまな器官を対象にして、“生物の形態形成”の研究が繰り返されている。手足の形作り、すなわち枝芽の形態形成は動物の形態形成のほぼすべての要素を含み、かつそれを3次元的なパターンの形成を伴って行うことから、動物の形作りの重要なモデル系として研究が進められている。特に、枝芽の軸形成についての研究は古くからさまざまな方法を用いてなされている。

〔第1章〕枝芽前後軸のパターン形成に関しては、ニワトリ胚枝芽の後端部の中胚葉組織を外植片として取り出し、別の枝芽の前端部に移植すると、前後軸における鏡像対称的な重複肢が形成されることが知られている。重複肢を形成するこの領域はZPAと呼ばれ、手足の前後軸形成の中心的な役割をもつと考えられている。レチノイン酸は枝芽の形（パターン）を変える因子として注目を浴び、さまざまな解析からZPAの放出する前後軸決定因子と考えられてきた分子である。本論文において、筆者はニワトリ枝芽の軸形成に関する（前後軸形成のみならず、他の軸に関しても）レチノイン酸の作用に関する研究を行った。その研究内容は以下の3つに分けることができる。

第1番目〔第2章〕は、枝芽前後軸形成に関するレチノイン酸の作用についての研究である。前後軸形成に対して、レチノイン酸は濃度勾配を形成することによって作用するモルフォゲンであると考えられてきた。しかし、筆者の修士課程在学中の研究はこれを支持しない結果であった（詳細は割愛する）。そこで、“レチノイン酸モルフォゲン説”を否定すべく、筆者はさらに研究を進めた。すなわち、レチノイン酸を染み込ませたビーズを枝芽に移植し、一定時間後にビーズの近傍の組織を別の枝芽の前側に移植する。これによっても重複肢が形成されることを見いだした。すなわち、レチノイン酸処理により周辺の組織がZPA活性を獲得することを示した。このことは、レチノイン酸がそれ自身の濃度勾配によって重複肢を形成するのではなく、周辺の組織にZPAを誘導する結果として重複肢が形成されることを示している。

また、レチノイン酸の核内レセプターであるRAR- $\beta$ 遺伝子を用いた *in situ* hybridization 法を駆使することにより、レチノイン酸によるZPA化を裏付ける結果を得た。ビーズによる枝芽へのレチノイン酸の添加によって、RAR- $\beta$ 遺伝子は枝芽全体に増幅発現するが、ZPAの移植や上のレチノイン酸処理した組織の移植によってはRAR- $\beta$ 遺伝子の発現は増幅されないことがわかった。この結果は、レチノイン酸による重複肢形成と、ZPAやレチノイン酸処理組織による重複肢形成との間に、遺伝子の初期発現において大きな差異があることを示している。言い替えると、レチノイン酸処理された特定の組織がZPA組織に変化して、結果として重複肢を形成していることを強く示唆する。

さらに、ZPA化の起こる条件について、添加するレチノイン酸の濃度・レチノイン酸の添加

場所および時期・レチノイン酸による ZPA 化と AER との関係についても検討した。

以上の結果は、少なくとも外部から添加されたレチノイン酸が肢芽前後軸を新たに形成するには、レチノイン酸の濃度勾配が必要なのではなく、レチノイン酸によって周辺の組織に ZPA 活性が生じることが必要であることを示唆する。さらに、レチノイン酸による ZPA 化の諸条件を検討した結果から、この現象は ZPA による重複肢形成とは独立に起こり得ることがわかった。

このように、肢芽の前後軸形成に対するレチノイン酸の作用は、肢芽組織の後方化（ZPA 化）であることが示された。すなわち、レチノイン酸による重複肢形成は、

①レチノイン酸による ZPA 化

→② ZPA から周辺組織への位置情報の伝達

→③周辺組織での新たな形態形成

という過程を経て行われると考えられる。

第 2 番目〔第 3 章〕は、肢芽の基部先端部軸形成とレチノイン酸の関わりについての解析である。有尾両生類の四肢再生においてはレチノイン酸は後方化のみならず、基部化を引き起こすことが知られている。すなわち、手首から切断された部分にできた再生芽（この組織が失われた構造を形成していく）をレチノイン酸処理すると、本来は手首から先の構造が形成されるはずが、肩の部分から再生してくる。この現象は、手首から先の構造をつくる再生芽がレチノイン酸によって“基部化”され、肩の部分から形成してしまうのだ、と解釈されている。

ところが、肢芽の発生過程においては、レチノイン酸は上に示したように肢芽の前側組織の後方化は引き起こすが、レチノイン酸による組織の基部化を示すデータは報告されていない。しかし、肢芽の発生過程と四肢の再生過程は基本的にかなり類似した現象であるという立場、あるいはレチノイン酸の形態形成に対する作用は統一的に考えることができるという見方から、筆者は四肢の発生においても同様にレチノイン酸が組織の基部化を引き起こしていることを予想し、それを示す実験を計画した。

レチノイン酸の添加によって形成されるニワトリ肢芽の重複肢では、ほとんどの場合に手首から先の部分が過剰構造として形成される。このレチノイン酸処理したニワトリ肢芽組織をより早い発生段階の肢芽（肩の構造を形成する時期）に移植し直すことにより、より基部側の構造が形成されるかどうかを調べた。その結果、この移植実験により、レチノイン酸処理された組織は（本来形成するはずの手首から先の構造よりも）基部側の構造（肩や肘の部分の構造）を形成することがわかった。

さらに、肢芽の基部先端部軸形成に重要な役割をもつと考えられているホメオボックス遺伝子、Chox - 1 遺伝子群の発現レチノイン酸による基部化との関係を調べた。正常発生時には、Chox - 1 遺伝子群のうち Chox - 1.8 は肢芽の基部側に、Chox - 1.9 は肢芽の中間部に、Chox - 1.10 は肢芽の先端部に発現分布がみられ、肢芽の基部先端部軸方向の区画化に関係すると考えられている遺伝子群である。上記のレチノイン酸処理した移植片は、移植前は不均一な Chox - 1 遺伝子群の発現分布をもつが、若い発生段階の肢芽に移植することによって、24 時間後にはそれらの

遺伝子の分布の再構成が観察された。この結果は、レチノイン酸による基部化が Chox - 1 遺伝子群の発現調節のレベルで起こっていることを示すと考えられる。

これらの結果から、レチノイン酸が周辺の組織を能力的には基部化し得ることが明きらかとなった。すなわち、レチノイン酸処理された枝芽組織は、発生段階の早い枝芽に移植すると移植された環境に合わせて本来は形成しなかった基部側の構造を形成し、しかもそのメカニズムは Chox - 1 遺伝子群の発現調節のレベルで行われている。言い替えると、枝芽組織はレチノイン酸処理により Chox - 1 遺伝子群の発現調節に対する反応能力を再びもつようになるものと考えられる。

第3番目〔第4章〕は、内在的に存在するレチノイン酸の作用を解析する試みである。レチノイン酸は枝芽の形態形成のみならず、さまざまな動物種のいろいろな器官形成に多岐にわたる作用をもつことが知られているが、それらの作用のほとんどはレチノイン酸を外部から過剰に与えた場合に現れる。この外来性のレチノイン酸の作用が果たして内在性のレチノイン酸の作用を反映したのか、それともレチノイン酸のもつ催奇形性作用によるものなのかは、常に疑問をはさむ余地がある。したがって、何らかの方法によって内在性のレチノイン酸の作用を調べることが重要である。

この目的のために、内在性のレチノイン酸の作用を阻害することを考え、レチノイン酸の拮抗阻害剤である TD550 を用いる実験を行った。まず、TD550 とレチノイン酸を混合することによって、外来性のレチノイン酸による重複枝形成作用を阻害させた。その結果、100倍濃度の TD550 が、レチノイン酸の重複枝誘導能を約 1/2 に抑えることがわかった。しかし、TD550 のみを枝芽に添加しても何の変化も観察されず、また、ニワトリの初期胚に添加しても何の変化も現れなかった。これらの結果から、TD550 は外来性のレチノイン酸による過剰枝芽誘導作用は拮抗的に阻害するが、それ自身は枝芽のパターン形成に積極的な作用はもたないと判断した。

これらの実験事実は、内在性のレチノイン酸の作用が外来性のものと異なる可能性、極論すると内在性のレチノイン酸は枝芽の形態形成に主たる作用はもたない可能性を示唆する。

〔第5章〕以上の3つの実験および考察から、枝芽の前後軸・基部先端部軸形成にかかわるレチノイン酸の作用について、以下のようにまとめることができる。

①枝芽前後軸形成に関するレチノイン酸の作用は、周辺の組織の後方化である。すなわち、レチノイン酸作用の本質は ZPA の誘導である。

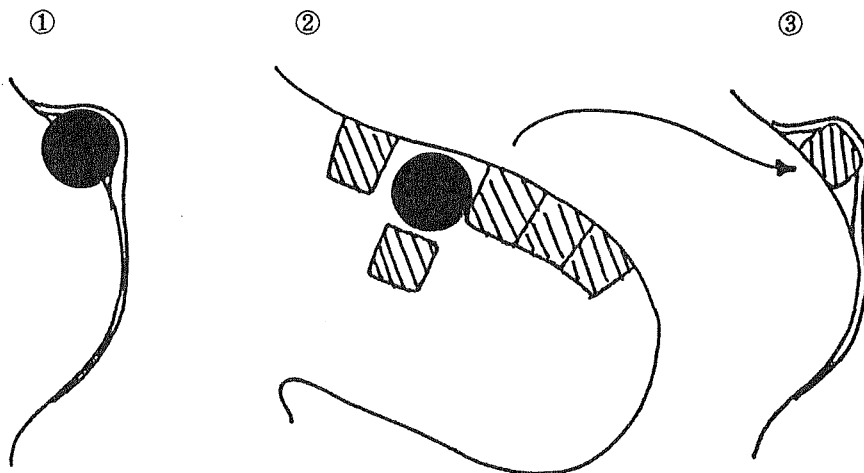
②枝芽基部先端部軸形成に関するレチノイン酸の作用は、周辺の組織の基部化である。ただし、四肢再生の場合とは異なり、その現象は移植実験を行ったときにのみ現れる。すなわち、レチノイン酸による基部化は常に周辺の環境に左右されている。

③上の①、②に表されるレチノイン酸の作用は、現段階では外来性のレチノイン酸に限った作用であり、それが直接的に内在性のレチノイン酸の作用を反映したものであるかどうかは判断し難く、今後に残された大きな課題である。

今後は、これらの結果から示唆された事柄と残された課題をもとに、レチノイン酸作用のメカニズムの分子的な解明が期待される。

※次ページに、レチノイン酸による後方化、基部化を示すための実験方法の概略をまとめた。

1. レチノイン酸による後方化（ZPA）を示す実験



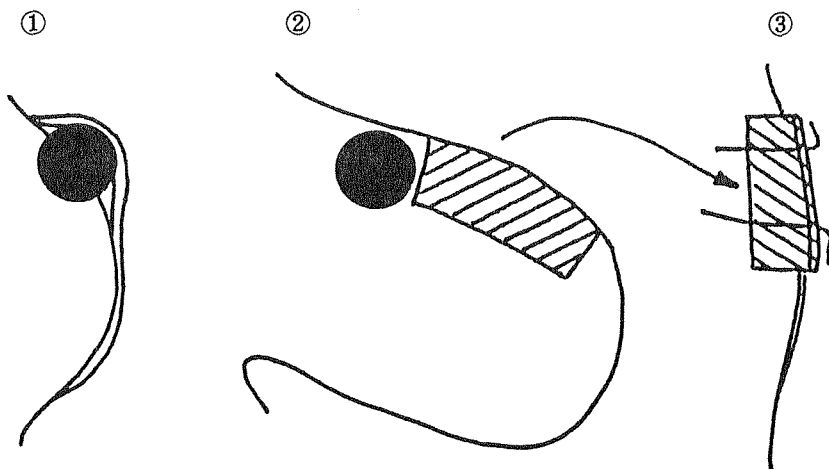
①レチノイン酸含有ビーズを肢芽前端部に移植し、

②24時間後にビーズの周辺領域を切り出して、

③別の肢芽の前側に移植する。

→これによっても重複肢を誘導できる。

2. レチノイン酸による基部化を示す実験



①レチノイン酸含有ビーズを肢芽に移植し、

②24時間後に図の斜線部全体を切り出し、

③発生段階の早い肢芽に移植する。

→移植片は、肩の構造をも形成する

## 論文審査の結果の要旨

レチノイン酸 (RA) は四肢などの軸形成に大きな影響をおよぼす。ニワトリ胚肢芽の前端部に RA を含むイオン交換樹脂のビーズを挿入すると、ZPA (極性化活性域, 肢芽後端部) を移植した場合と同様に、前後軸方向に鏡像対称の重複肢が形成される。この結果等から、RA は ZPA からでて、濃度によって四肢形成を支配するモルフォゲンと考えられるにいたった。この考えを再検討するために、RA-ビーズの周辺の組織を切り出して別の肢芽の前端部に移植したところ、重複肢の形成が起こった。つまり RA は周辺の組織を ZPA に変える作用を持っていることを示した。さらに重複肢の形成がなくても、ZPA 形成の起こることを示し、RA による重複肢形成過程は、RA による ZPA 化、ZPA による重複肢形成の二つの過程に分けられることを明らかにした。

次に RA-ビーズの周辺域、特にその先端部側を若い胚の肢芽に移植すると、本来は先端部を作る領域が基部側を作る、つまり基部化が起こることを明らかにした。両生類の再生の際には RA は再生芽の基部化を起こすことが知られている。この結果は、鳥類の四肢は再生をしないが、RA による基部化は起こりうることを示したものである。

一方、RA の拮抗阻害剤 TD550 を RA と一緒にビーズに含ませて肢芽前端部に投与すると、RA の重複肢形成作用を阻害することが分かったが、TD550 のみの投与では ZPA の作用は阻害されず、ZPA から分泌されていると考えられてきた内在性の RA は ZPA による軸形成に作用しない可能性を示唆したものである。

これらの研究は、RA の作用機構についてのまったく新しい知見であるとともに、今まで別個に考えられてきた鳥類肢芽での作用と両生類再生芽での作用を統一的に考えられる方向を示している。

この論文は、提出者が自立して、研究活動を行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いる。よって、田村宏治提出の論文は、博士 (理学) の学位論文として合格と認める。