

論文審査の結果の要旨

氏名 日笠 弘基

本論文は2章からなり、第1章は、Xlim-1の下流遺伝子の検索とその発現解析、第2章は、レセプターチロシンキナーゼ Xror2 の発現と機能解析について述べられている。

両生類初期胚の背側中胚葉組織であるシュベーマンオーガナイザーの特徴として、顕著な形態形成運動と、外胚葉に対する神経誘導活性、さらに神経外胚葉と中胚葉のパターン形成での役割が挙げられる。近年、シュベーマンオーガナイザー領域に発現する種々の分泌性因子ならびに転写因子が同定されているが、それらの因子間における相互作用や遺伝子カスケードについての解析は未だ十分には行われていない。そこでアフリカツメガエルのオーガナイザーに特異的に発現する LIM ホメオドメイン蛋白質 Xlim-1 に着目した。活性型の Xlim-1 は腹側中胚葉を背側化し、多分化能をもつアニマルキャップ（外胚葉外植体）に対してはオーガナイザー特異的遺伝子 *chordin*、*gooseoid*、*Xotx2* の発現を促し、前方型神経組織を誘導するというオーガナイザー活性を模倣することが示されている。そこで Xlim-1 の下流の遺伝子カスケードの体系的な解析と、その結果同定された遺伝子の機能解析を行った

第1章では、アニマルキャップにおいて Xlim-1 で発現誘導をうけるオーガナイザー特異的遺伝子を体系的に検索し、その発現解析を行った。活性型 Xlim-1 の mRNA を注入したアニマルキャップで発現が引き起こされ、かつオーガナイザー領域で Xlim-1 とその発現が重複する遺伝子を6個単離した。その結果、既知の遺伝子として、頭部誘導活性を持つ分泌性蛋白質 *cerberus* や前方型神経の分化に関与する *Xotx5* 等が Xlim-1 の標的遺伝子の候補として新たに同定された。このことは Xlim-1 が頭部およびそのパターン形成に関与するという先の報告と良い対応を示すとともに、この手法を用いたアプローチの有効性を示唆している。さらにヒト・レセプター・チロシンキナーゼ *Ror2* のオーソログ (Xror2)、マウス分泌型メタロプロテアーゼ *ADAMTS-1* のオーソログ (XADAMTS-1) およびヒト p53 応答遺伝子 *PA26* のオーソログ (XPA26) が同定された。Xror2 と XADAMTS-1 はオーガナイザー領域に発現を開始し、後には脊索領域に発現することが見いだされた。XPA26 は初期原腸胚のオーガナイザー領域での発現は検出されなかったが、前期神経胚以降は脊索に非常に特異的に発現していた。このようにこれらの遺伝子が Xlim-1 の制御を受けてオーガナイザーあるいは脊索において種々の役割を担っている可能性が示された。

第2章では、Xlim-1 の下流遺伝子 Xror2 の機能解析を行った。Ror 遺伝子ファミリーは細胞外領域に frizzled 様ドメイン等を持ち、細胞内領域にはチロシンキナーゼドメインをもつ。

Ror ファミリーの機能はこれまでに線虫とマウスにおいて解析されているが、初期発生での役割、およびリガンドや細胞内シグナル伝達系は不明である。

そこで野生型 Xror2 および細胞内ドメイン欠失変異体 Xror2-TM をアフリカツメガエル胚の腹側あるいは背側の中胚葉領域に過剰発現させ発生過程に対する影響を調べた。その結果、Xror2 により原腸陥入が著しく阻害されること、また予想外にも Xror2-TM は野生型と類似の活性を持つことが見いだされた。そこで Xror2 の過剰発現細胞の挙動を細胞系譜マーカーと共発現させて調べたところ、Xror2 と Xror2-TM は共に細胞分化には影響を与えないが、原腸陥入を引き起こす細胞運動の1つである収斂伸長運動を阻害することが明らかとなった。そこでより単純な系としてアニマルキャップで同様に検討したところ、予想通り Xror2 および Xror2-TM を発現させたアニマルキャップではアクチビンにより誘発される収斂伸長運動が阻害された。そこで両者をアニマルキャップに共発現させたところ Xror2 と Xror2-TM の作用は拮抗的ではなく相加的であったことより、Xror2 の収斂伸長運動阻害活性はキナーゼ活性に非依存的であることがさらに裏付けられた。

これまで収斂伸長運動には Wnt の非標準経路 (non-canonical pathway) が関与し、この経路の過度の活性化あるいは阻害により収斂伸長運動が阻害されることが報告されている。そこでそのシグナル伝達の下流に位置する Cdc42 のドミナントネガティブ型を Xror2 と共発現させたところ Xror2 による収斂伸長運動の阻害が回復した。この結果は、Xror2 が Wnt の非標準経路に直接あるいは間接的に関わることで収斂伸長運動を制御していることを示唆している。

本研究では、Xlim-1 の下流遺伝子の検索を行い、その結果、頭部形成もしくは、前方型神経誘導というオーガナイザー活性に関わる遺伝子が候補として新たに同定されるとともに、Xror2 の機能解析により、Xlim-1 を介した分子経路が、オーガナイザーの収斂伸長という形態形成運動にも関わることを示唆された。

なお、本論文第1章は平良真規との、第2章は平谷伊智朗、平良真規との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析と検証を行ったもので、論文提出者の寄与は十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。