

## 論文の内容の要旨

論文題目: Comprehensive analysis of head organizer genes in

*Xenopus* embryos

(頭部オーガナイザー遺伝子群の網羅的解析)

氏名 柴田 幹士

両生類の原口背唇部（背側中胚葉）は周囲の組織から神経や筋肉を誘導しかつそのパターン形成を行うことよりオーガナイザーと呼ばれる。オーガナイザーはさらに頭部オーガナイザー（脊索前板および前部内胚葉領域）と胴部オーガナイザー（脊索領域）に分けられ、それぞれ前部神経板と後部神経板を誘導すると考えられている。近年の分子レベルでの研究から提唱されたモデルによれば、オーガナイザーによる神経誘導の過程とは、外胚葉が分泌する神経化阻害因子 BMP4 を、オーガナイザーが分泌する Chordin, Noggin が結合阻害することで外胚葉が神経化し、また後方化因子あるいは腹側化因子 Wnt を Cerberus, Dickkopf-1, Frzb-1 などの頭部オーガナイザーからの分泌性因子が遮断することで前方神経組織が誘導されると考えられている。しかしこのモデルは、オーガナイザーによる頭部の誘導を大まかに説明するにとどまり、例えば実際にどのような遺伝子が頭部の誘導とパターン形成に能動的に働き、どのような遺伝子が頭部オーガナイザーを規定するか、といった疑問を説明できない。これらの点を解明するためには、オーガナイザー特異的な新規遺伝子を多数単離、同定しその機能解析を行うことが有効であると考えた。そこで私は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) 後期原腸胚と初期神経胚の頭部オーガナイザー領域（前方内中胚葉領域、anterior

endomesoderm ; 以下 AEM と略記) を用いて作成した cDNA ライブラリーから AEM 特異的 ESTs (Expressed Sequence Tags) を構築し、このデータを基に選択したクローンの発現パターンを網羅的に解析することで、AEM 領域に特異的に発現する新規遺伝子の単離を試みた。その結果、頭部オーガナイザー領域に発現する遺伝子 P4F1 (*crescent*)、P7E4、P8F7、P17F11 を見出し、それらに関して詳細な発現解析を行った。さらに P4F1 (*crescent*) に関しては mRNA 顕微注入実験による機能解析を行い頭部オーガナイザーにおける役割を検討した。

### 第一部: 頭部オーガナイザー遺伝子の網羅的検索と発現解析

頭部オーガナイザー特異的遺伝子の単離方法として、本研究では AEM 特異的 cDNA ライブラリー由来の遺伝子の発現パターン解析によるスクリーニングを採用した。後期原腸胚から初期神経胚の AEM を切り出し、その poly(A)<sup>+</sup>RNA から AEM 特異的 cDNA library を作成した。この切り出しの段階で約 20 倍の頭部オーガナイザーに発現する遺伝子の濃縮が期待された。housekeeping 遺伝子など頭部オーガナイザーに非特異的な遺伝子を除くため、尾芽胚胴部由来の cDNA をプローブとしてブランク・ハイブリダイゼーションを行い、陽性だった約 28% のクローンを除き、陰性の 1632 クローンを選択した。そのうち 1039 クローンに関して 5' 側からの部分的塩基配列を決定して ESTs を作成し、これを基に重複遺伝子のクラスタリングと Blast サーチによるホモロジー検索を行った。その結果、1039 クローンは 756 個の独立クラスターに分けられ、その中の 151 クラスターは既知のアフリカツメガエル遺伝子で (151/756=20%)、そこにはオーガナイザー特異的な既知の遺伝子が 8 個 (8/177=4.5%) 含まれていた。

これら遺伝子の内訳について検討したところ、分泌性因子をコードする遺伝子として *chordin*, *noggin*, *follistatin*, *xFRP* といった阻害因子のみが単離され、*eFGF*, *Xwnt-11* あるいは *shh* といったリガンド分子の遺伝子は単離されなかった。このことはオーガナイザーにおいて阻害因子をコードする遺伝子の発現量が、リガンド分子の遺伝子の発現量よりも多いことを示唆している。また 756 個の独立クラスターのうち既知のカエル発生制御遺伝子が 36 クラスター、発生制御遺伝子と予想されるものは 48 クラスター (48/756=12%)、未知の遺伝子と予想されるものは 315 クラスター (315/756=42%) であった。そこで発生制御遺伝子と予想されるものと未知の遺伝子と予想されるもの計 363 クラスターを選別し、そのうち現在まで 198 クローンに関して発現パターンを全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析した。最終的にオーガナイザー領域に発現するツメガエル新規遺伝子として 9 個同定し、これらに関しては cDNA 全長の構造解析を行った。

その中で頭部オーガナイザー領域に発現する遺伝子は、P4F1、P7E4、P8F7、P17F11 の

4 遺伝子であった。P4F1 はニワトリ *crescent* と、P7E4 はヒト EST クローン KIAA0952 と、P17F11 はシロイヌナズナの未知の遺伝子と相同性があった。P8F7 はどの遺伝子とも相同性はなかった。これら遺伝子の発現パターンを更に詳細に知るため、初期原腸胚期と初期神経胚期において、これらの遺伝子と、既知のオーガナイザー遺伝子 *chordin* と *XHex* の発現パターンと比較検討した。その結果、オーガナイザー領域の中において P4F1(*crescent*)、P7E4、P8F7、P17F11 はそれぞれ異なる領域で発現していることが判明した。すなわち P7E4 は脊索前板にリング状に、P8F7 は前方内胚葉に、P17F11 は AEM 領域に広く発現していた。なお P4F1(*crescent*)の詳細な解析結果は第二部で述べる。

このように私が試みた網羅的検索はオーガナイザー特異的遺伝子を単離する有効な手段であること、および頭部オーガナイザー領域が種々の遺伝子の発現パターンによりさらに幾つかの領域に分けられることが示され、単離されたこれらの遺伝子が各発現領域において、頭部オーガナイザーの規定や神経誘導、パターン形成などに関して独自の役割を果たしているのではないかと考えられた。

## 第二部: *crescent* 遺伝子の構造、発現、機能解析

P4F1 の全長 cDNA を単離し構造解析を行った結果、ニワトリ *crescent* と全翻訳領域のアミノ酸レベルで 64%が、Frizzled 様ドメインでは 90%が一致した。他の Frizzled 様ドメインを持つ分泌性因子 (Frzb-1、Sizzled など) との比較より P4F1 は *crescent* のアフリカツメガエルオーソログであることが考えられた。シグナルペプチド様の配列と Frizzled 様ドメインの存在は *Crescent* が Wnt に対する分泌性結合阻害因子であることを予想させた。

*crescent* は初期原腸胚のオーガナイザー領域に特異的に発現を開始し、発生の進行に従い頭部オーガナイザーすなわち AEM に限局した。尾芽胚期ではこの発現が減少し、代わりに前腎での特異的発現が認められた。*crescent* が初期オーガナイザー領域で発現することより AEM に発現する転写活性化因子の制御を受けている可能性が考えられた。そこでアニマルキャップを用いて検討したところ、転写活性化因子 *Siamois*、*Xlim-1* と *Xlim-1* の活性化補助因子 *Ldb1* により協調的に発現が活性化されることを見出した。しかしながら中胚葉化因子アクチビンで処理したアニマルキャップでは発現上昇は認められなかった。*Siamois* は背側化因子 Wnt の下流遺伝子、*Xlim-1* はアクチビン/*Nodal* の下流遺伝子であることより、*crescent* 遺伝子は Wnt とアクチビン/*Nodal* の両方のシグナルによって活性化されることが示唆され (Mech. Dev. 96, 243-246, 2000)、このことは *crescent* の AEM に限局した発現とよく対応すると考えられた。

*Crescent* はその構造と発現場所から Wnt の阻害因子として頭部誘導に関わるものが

予想された。この検証のため、mRNA の微量注入実験をおこなった。Crescent を前方神経外胚葉領域に異所発現させたところ、眼とセメント腺の肥大が認められた。また腹側中胚葉領域に BMP 阻害因子である *noggin* と共発現させると眼とセメント腺をもつ2次軸形成が認められた。さらに腹側中胚葉領域に Xwnt-8 と共発現させると、Xwnt-8 による2次軸形成能が阻害された。これらの実験結果は Crescent が Xwnt-8 あるいはそれに類似の Wnt に結合して阻害することを強く示唆しており、Crescent が頭部誘導に関わっていることが考えられた。さらにこのような活性に加えて、前方神経外胚葉領域に異所発現させた実験と腹側中胚葉領域に Xwnt-8 と共発現させた実験において Crescent が体軸の伸長を阻害する作用を持つことを見出した。このような活性は Wnt 阻害因子の1つである Dkk-1 では見られなかったものであることより、Crescent は Dkk-1 とは異なる特異性で Wnt を阻害することが考えられた。最近、後方中胚葉と外胚葉の収斂伸長運動に Xwnt-4、Xwnt-5a、Xwnt-11 が関与することが示唆されていることより、Crescent がこれらの Wnt の活性を阻害する可能性が考えられた。頭部オーガナイザー領域は収斂伸長運動をしない領域であることを考え合わせると、もし Crescent が収斂伸長運動に関与する Wnt の活性を阻害することが今後実証されれば、Crescent は頭部オーガナイザー領域において後方化の阻害と共に収斂伸長運動を阻害する役割を担っていると言える。

本研究では、AEM 特異的 ESTs と発現パターン解析により、頭部オーガナイザーに発現する遺伝子を単離することを試み、実際に、頭部オーガナイザー特異的遺伝子の単離が可能であることが示された。さらに単離された遺伝子 *Xenopus crescent* の機能解析を行った結果、Crescent が後方化と収斂伸長運動に関与する種々の Wnt を阻害する可能性が示された。このような活性をもつ分泌性因子は現在のところ知られていない。今後 *crescent* 更に P7E4、P8F7、P17F11 を詳細に解析することによって、頭部オーガナイザーの持つ多様な機能の一端がさらに明らかになると期待される。