

## 論文の内容の要旨

論文題目 Interactions of the LIM homeodomain protein Xlim-1 and other transcription factors in mesoderm patterning

(中胚葉のパターン形成における LIM ホメオドメイン蛋白質 Xlim-1 と他の転写因子との相互作用)

氏名 望月 俊昭

脊椎動物の初期発生においてオーガナイザーの形成、神経誘導は発生学における重要な研究対象である。これまでにオーガナイザー特異的に発現する遺伝子がアフリカツメガエルにおいて数多く単離されている。その中にホメオボックス遺伝子である *gooseoid (gsc)*、*Xlim-1*、*otx2* があり、これらの遺伝子は頭部オーガナイザー（前部内中胚葉）に共発現している。それらの機能は主としてアフリカツメガエル胚を用いた mRNA 顕微注入実験により全胚あるいはアニマルキャップ（予定外胚葉外植体）により解析され、活性の違いはあるがそれぞれの因子がオーガナイザーの機能に関与することが示唆されている。Gsc はオーガナイザー特異的に発現する因子として最初に単離され、腹側帯域に発現させると 2 次軸を形成するが、アニマルキャップにおいては誘導活性を示さない。Otx2 は腹側帯域に発現させるとセメント腺や不完全な 2 次軸を形成し、アニマルキャップでは強いセメント腺形成と弱い神経化能を示す。一方 Xlim-1 は N 端に一对の LIM ドメインをもつホメオドメイン蛋白質で、LIM ドメインは蛋白質間相互作用に関与している。LIM ドメインに変異を導入した 3m 変異体あるいは野生型 Xlim-1 と LIM 結合蛋白質 Ldb1 により胚の腹側に 2 次

軸を形成し、アニマルキャップにおいて前方神経のマーカ遺伝子の発現を誘導する。マウスにおける逆遺伝学的手法により *Lim1* と *Otx2* のノックアウトマウスが頭部欠損の表現型を呈することが示されている。このようにオーガナイザー領域に発現する転写因子の個々の機能解析は行われているが、それらの転写因子間の相互作用に関する知見は乏しい。そこで私は *Xlim-1* の標的遺伝子として解析が進行中であった *gsc* 遺伝子のプロモーター解析を継続し、更に *gsc* プロモーターに結合領域の存在した *Otx2* と *Gsc*、ならびに腹側中胚葉に発現するホメオドメイン蛋白質 *PV.1/Xvent-1* の作用について検討することで、*gsc* 発現制御における転写因子間の相互作用を 1 つのモデル系として、オーガナイザー領域を規定する転写因子間の相互作用について解析した。

これまでに *gsc* プロモーター解析において以下の知見が得られていた。1) 活性型 *Xlim-1* である 3m 変異体の mRNA と、*gsc* プロモーターにレポーターとして *Luciferase* 遺伝子をつないだ *gsc* プロモーター/*Luciferase* (*gsc/Luc*) を共注入し、*gsc* プロモーター上の *Xlim-1* の反応領域を検討したところ、転写開始点から 492 bp 上流の領域で十分である。2) DNA 結合ドメインであるホメオドメイン (HD) と GST との融合蛋白質を用いた footprinting および EMSA (electrophoretic mobility shift assay) により *Xlim-1*/HD はプロモーター上の 3 つの領域 UE、DE、PE に結合する。DE と PE はそれぞれ *Activin/Vg1* 反応領域、*Wnt* 反応領域として同定されているもので UE は新規の領域である。3) *Xlim-1*/HD は UE、DE、PE の TAATXT (XY は CC、CT 以外) に結合し、*Otx2*/HD と *Gsc*/HD は DE の TAATCT、PE の TAATCC に結合し、*PV.1*/HD は *Xlim-1* と同様の結合選択性を示す。

以上の結果をふまえ、まず私は転写因子間相互作用を解析するには DNA 結合ドメインの HD だけではなく全長のタンパク質を用いて解析する必要があると考え、N 端に FLAG タグをつけた全長蛋白質を *Xenopus* 胚内で発現させ、その粗抽出液による EMSA を行った。その結果、全長のタンパク質の *Xlim-1*、*Otx2*、*Gsc*、*PV.1* が GST-HD 融合蛋白質と同様の DNA 結合選択性を持つことを確認した。更に野生型 *Xlim-1* は単独では DNA に対して弱い結合しか示さないが、*Ldb1* を共発現させると、複合体としてより強く DNA に結合することを示した。これは予想されていた *Ldb1* による野生型 *Xlim-1* の活性化機構を強く支持している。

次に結合領域を同定した上記の転写因子の *gsc* プロモーターにおける相互作用を検討すべく、アニマルキャップにおいてレポーターアッセイを行った。野生型 *Xlim-1* は単独ではレポーター遺伝子に対して弱い活性化能しか示さないが、*Ldb1* と共注入すると強く活性化した。また興味深いことに *Xlim-1* は *Otx2* と共発現させると同様の強い活性を示し、*Xlim-1*、*Ldb1*、*Otx2*、3 者を共発現させると更に強い活性を示した。また *Ldb1* と *Otx2* の共発

現ではほとんど活性を示さないことから、Xlim-1 が協調的活性化に必須な要素であることを示している。またアニマルキップにおいて Xlim-1、Ldb1、Otx2 の3者による協調的活性化を内在性 *gsc* 遺伝子に対して検討したところ、プロモーターアッセイと同様に協調的に発現が誘導された。このことは *gsc* の発現制御に3者が関わることを示唆している。

次に *gsc* プロモーター領域において Xlim-1、Ldb1、Otx2、3者による協調的活性化に必要な領域を同定するため、結合領域を欠失あるいは変異を導入した *gsc/Luc* を作製し、レポーターアッセイを行った。まず *gsc* プロモーター領域を UE を含む 256 bp の領域 (UR256) と DE、PE を含む領域 (-226) に分割したものをを用いた結果、492 bp の場合と比べて双方とも活性が大幅に減少したことから、3者による協調的活性化には UE を含む UR256 とその下流の-226 領域の両方が必要であると考えられた。そこでその中で活性に関わる領域を限定すべく、Xlim-1 の結合領域 UE、DE、PE について検討した。その結果、UE、DE、あるいは PE を欠失あるいは変異を導入したものは-492*gsc/Luc* に比べて活性が減少したが、完全には消失しなかった。このことは UE、DE、PE が3者による協調的活性化に参与する領域であり、これら複数の領域の総和として全体の活性を担っていることを示唆している。また Otx2 について、DE、PE に各々1つ存在する結合領域両方に変異を導入した場合、3者による活性が大きく減少した。更に Otx2 の代わりに Otx2 の HD に変異を導入し、DNA への結合ができない変異体 (Otx2HDm) を用いた場合も活性が大きく減少した。このことは3者による協調的活性化において Otx2 の DE、PE へ結合が必要であることを示唆している。

*gsc* プロモーター上での結合領域の存在から、発現制御に参与すると予想された Gsc、PV.1 の作用についてレポーターアッセイで検討したところ、Xlim-1、Ldb1、Otx2、3者による協調的活性化を強く阻害した。このことは Gsc、PV.1 が *gsc* プロモーターに対して抑制的に働くことを示している。更に Gsc、PV.1 の抑制効果に参与する領域を同定するため、結合領域に変異を導入した *gsc/Luc* を用いて検討した結果、Gsc については DE の変異により抑制効果が大きく解除され、また PE の変異でも部分的に抑制が解除した。これは Gsc による抑制においても複数の領域が関与するが、DE が主要な領域であることを示唆している。一方 PV.1 については結合したどの領域に変異を導入しても抑制の解除は見られなかった。これは PV.1 の抑制が複数の領域が関与し、一部が欠けても抑制効果を発揮できる可能性が考えられる。

以上の実験で同定された、個々の転写因子の反応領域が *gsc* の発現する領域の内在性因子の反応領域に対応するかを検討するため、背側、あるいは腹側帯域（後にそれぞれ背側、腹側中胚葉領域になる）に *gsc/Luc* を注入して、活性を調べた。その結果背側帯域に注入

した場合、UE あるいは DE の点変異により活性は減少するが、腹側帯域でのレベルにはならなかった。この結果はオーガナイザー領域での内在性因子による *gsc* プロモーターの活性制御においても UE、DE を含む複数の領域が関与することを示唆している。

これまでの結果の中で *Xlim-1*、*Ldb1*、*Otx2* の3者による協調的活性化はオーガナイザー領域での転写因子間相互作用を考える上で大変興味深い結果であり、その分子機構について解析を行うことはオーガナイザーの領域化の解明において大変重要であると考えられる。そこでこの3者の協調性が蛋白質間相互作用に由来することを想定し、その解析のため *in vitro* における GST pull down assay を行った。その結果、*Xlim-1* と *Ldb1* との相互作用に加えて、*Xlim-1* と *Otx2*、*Ldb1* と *Otx2* との相互作用が見いだされた。この結果から DNA 上で3者は複合体を形成し、協調性が発揮することが考えられた。そこで、DNA 上での複合体形成を検討するため、3者を共発現させた胚の抽出液を用いて EMSA を行った。その結果 *Otx2* と相互作用する何らかの因子の存在は確認されたが、3者による複合体形成を明確に示す結果は現在までのところ得られていない。

以上の結果と、脊索、腹側中胚葉に発現する転写因子 *Xbra* の発現が *gsc* によって抑制されるとの報告、更に *Xbra* により間接的に *otx2* の発現が抑制されるという知見も加えて考えると、中胚葉のパターン形成において以下のようなモデルが考えられる。頭部オーガナイザー領域（前部内中胚葉）では *Xlim-1*、*Ldb1*、*Otx2* が発現することで *gsc* の発現が維持され、更にこれにより *Xbra* の発現が抑制される。胴部オーガナイザー（予定脊索領域）では *Xbra* が発現しており、*Xbra* より *otx2* は間接的ではあるが発現が抑制されることにより、*gsc* の発現が維持されない。一方、腹側中胚葉では *PV.1/Xvent-1* が発現し、*gsc* の発現を直接抑制することで *gsc* の発現が起こらないと考えられる。このようにして上記の転写因子間相互作用が中胚葉のパターン形成に関与していると考えられる。

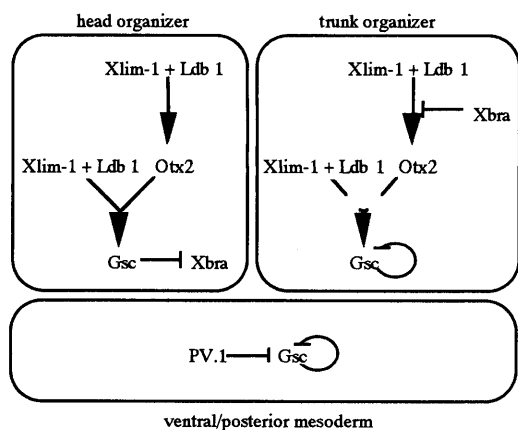


図 中胚葉領域化における転写因子の相互作用（モデル）