

論文の内容の要旨

論文題目 Regulation of hedgehog gene expression in early development of *Xenopus laevis*

(アフリカツメガエル hedgehog 遺伝子の初期胚における発現制御機構の解析)

氏名 伊藤 弓弦

多細胞生物は発生過程を通じてそれぞれに特徴的な形態を形作ってゆく。この形態形成は、様々な因子の相互作用によって緻密にプログラムされており、それゆえ形態形成に関わる因子群が「どの様に限局して発現制御され」、「どの様に限局して作用していくか」は最も興味深い問題である。そこで脊椎動物の初期発生における形態形成を更に詳しく解明するため、位置や方向の決定に関与する因子、hedgehog(hh)に注目した。hh はショウジョウバエで最初に報告された分泌性因子で、ショウジョウバエの体節、肢芽、羽芽等の前後の方向を決定すると報告され、脊椎動物においても同様の働きを担うと考えられている。本研究では *Xenopus hedgehog*(Xhh)のツメガエル初期胚における発現、発現制御機構の解析を行った。

まず初めにアフリカツメガエルから3種類の hh のホモログを単離した。マウスの hh とそれぞれ比較したところ、receptor に結合する N 端側は3種類を通じて保存性が高かった。続いて、これらの Xhh mRNA の発現場所を同定した。*Xenopus sonic hedgehog*(Xshh) mRNA は中胚葉ではシュペーマン・オーガナイザー、脊索、外胚葉では神経底板、脳においてまず限局した発現が見られた。これらと同様の発現は多種でも報告されており、ツメガエルにおいて

も Xshh は神経管及び体節の背腹軸を決定していることが示唆された。その後さらに内胚葉領域の咽頭、肛門、胆嚢での発現がみられた。これより Xshh は初期発生において尾芽胚期以降の内胚葉形成にも関わっていることが予想された。一方 *Xenopus cephalic hedgehog*(Xchh) mRNA は囊胚期から神経胚期にかけては内胚葉全域での発現がみられ、その後尾芽胚期になると内胚葉の前端及び後端におけるシグナルが強く検出された。これより Xchh は初期発生から内胚葉分化に関わっていると考えられる。以上のことから、この2種の Xhh は発生過程の様々な局面において分化に関与していることが示唆された。

次に、Xhh 遺伝子の限局した発現を制御する因子について解析を行った。囊胚期以降、内胚葉で発現する Xchh について解析した。胞胚期に植物極を取り出し神経胚期まで培養した細胞において Xchh mRNA の発現が検出された。これより Xchh mRNA の発現は胞胚期以前に決定されており、母性成分による自律的な制御を受けていると考えられる。これまで、内胚葉分化への TGF- β 及び FGF の関与が報告されている。そこでこれらの因子が Xchh mRNA の発現に対して与える影響を調べた。8細胞期に種々の因子に対する dominant negative 型 receptor mRNA を injection した胚の植物極を単離して培養したところ、Vg-1 や activin のシグナルを阻害する dominant negative 型-activin receptor を発現させた場合に、Xchh mRNA の発現量が減少した。これより Vg-1 や activin 様の活性が、Xchh mRNA の発現制御に重要であることが判明した。

続いて脊索、神経底板における Xshh の発現制御機構を解析した。胞胚期に切り出した動物極、植物極どちらにおいても、無処理の条件下では Xshh mRNA の発現は認められなかった。一方、植物極において dominant negative 型-activin receptor や-BMP receptor を発現させることにより Xshh mRNA の発現が誘導されたが、動物極においては同様の処理によっても誘導されなかった。このことから、Xshh mRNA の発現には①TGF- β family のアンタゴニスト及び②植物極側に局在する未知の因子、の2つが必要であると考えられた。そこで内在していることが知られる種々の因子のうち TGF- β family のアンタゴニストとして Follistatin と Noggin、植物極に局在する因子として TGF- β family に属する *Xenopus nodal related gene-1*(Xnr-1)に注目し、それらの因子を作用させた動物極における Xshh mRNA 発現を解析した。その結果、Xshh mRNA の発現は Xnr-1、follistatin、noggin 単独では誘導されなかったが、Xnr-1 と Noggin もしくは Xnr-1 と Follistatin とによって相乗的に誘導された。whole embryo 内にこれらの因子を発現させたところ、Xnr-1、noggin、follistatin 単独及び Xnr-1 と follistatin の共発現では、不完全な二次軸が誘導され、Xnr-1 と noggin を共発現した場合には頭部まで含んだ完全な二次軸が誘導された。これらの因子によって誘導された2次軸内

における神経マーカー・N-CAM mRNA の発現を調べたところ、すべてのタイプの2次軸において検出された。これよりどの因子も2次軸内に神経組織を誘導していることが示された。一方、2次軸内におけるXshh mRNA の発現を解析したところ、Xnr-1、noggin、follistatin 単独で誘導した2次軸内にはXshh mRNA の発現は検出されなかったが、Xnr-1 と Noggin もしくはXnr-1 と follistatin の共発現による2次軸内にはXshh mRNA の発現が検出された。組織切片によって解析したところ、Xshh mRNA は2次軸内に形成された脊索及びそれに隣接する神経管において発現していることが判明した。これより、whole embryo 内においてもXshh mRNA の発現はXnr-1 と Noggin もしくはXnr-1 と Follistatin とによって相乗的に制御されることが示された。以上のことからXshh mRNA の初期胚における発現は2つの因子 (noggin もしくは follistatin と Xnr-1) によって制御され、限局した発現が2種類のシグナルの重なりによって引き起こされることが明らかとなった。

このメカニズムをさらに詳しく解析するために、これら2種類のシグナルがXshh のゲノム領域にどのように作用するかを解析した。ツメガエルゲノムライブラリーよりXshh をコードするゲノム領域を単離した。シーケンスを決定したところ3つのエクソンによりXshh はコードされていた。ルシフェラーゼレポーターを用いて、ゲノム上のXnr-1 と noggin に応答するシスエレメントを探索し、Xnr-1 と noggin によって相乗的に活性化される領域- second intronic enhancer fragment (SIEF)をセカンドイントロン内に同定した。このSIEF内における転写因子の結合配列を検索したところ、Forkhead family に属する転写因子 HNF3 の結合配列及び、TGF- β family のシグナル伝達に関わる Smad の結合配列等の存在が予想された。そこでこれらの結合配列を中心にXnr-1 と noggin に対する応答能を詳細に解析した結果、SIEFの中央に位置するHNF3 と Smad の結合配列がXnr-1 と noggin に応答することが判明した。次にSIEFが脊索、神経底板領域における発現を制御するかについてtransgenic frogを作成し解析した。その結果プロモーター上にSIEFを組み込んだレポーター GFP mRNA の発現は脊索、神経底板において検出された。以上のことから、SIEFが脊索、神経底板におけるXshh mRNA の発現を制御しているシスエレメントであり、細胞外シグナルとしてXnr-1 及びnoggin が作用していることが明らかとなった。

本研究において以下のことを明らかにした。

1. Xshh mRNA は外、中、内胚葉性組織において時間的にも空間的にも限局して発現している。これはXshhが初期発生において、様々な局面で位置情報を担う可能性を示唆している。
2. Xshh mRNA の発現は、内胚葉領域においてVg-1/activin 様の因子によって制御されている。

3. Xshh mRNA の発現は脊索、神経底板において Xnr-1 と BMP のアンタゴニストの協調作用によってなされている。
4. Xshh mRNA の転写制御は、Xshh ゲノム上、第2イントロン内に存在するエンハンサーによって行われる。そのエンハンサーには HNF3 と Smad が作用すると予想される。