

論文の内容の要旨

論文題目

Study of the functional domains and the regulatory mechanisms underlying the transcriptional activity of the LIM homeodomain transcription factor Xlim-1 in the Spemann organizer

(オーガナイザーにおける LIM ホメオドメイン型転写因子 Xlim-1 の機能ドメインと
活性調節機構に関する研究)

氏名 平谷 伊智朗

シュペーマン・オーガナイザーは脊椎動物の初期形態形成において中心的役割を担う。オーガナイザーは中胚葉に対しては背側の組織を、外胚葉に対しては神経組織を誘導するが、この誘導因子の実体は BMP、Wnt、Nodal といったシグナル分子に対する複数の分泌性阻害因子であることが近年明らかになりつつある。これらの因子をコードする遺伝子の発現を司るのがオーガナイザー特異的に発現するいくつかの転写活性化因子であり、その一つが LIM ホメオドメイン (LIM-HD) 型転写因子 Xlim-1 である。アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) において Xlim-1 は正の制御因子 Ldb1 (LIM-domain-binding protein 1) と協調的に *goosecoid*、*chordin*、*Otx2* といったオーガナイザー特異的遺伝子を活性化し、2 次体軸を誘導するなどのオーガナイザー活性を示す。一方、マウス・オーソログ *Lim1* のノックアウト・マウスは前脳・中脳の頭部構造を完全に欠失するという劇的な表現型を示す。以上のように Xlim-1/Lim1 は種を越えてオーガナイザーにおいて重要な役割を担う因子であるが、表現型に至るまでの作用機序あるいはその活性調節機構に関しては不明な点が多い。そこで私は Xlim-1 の活性調節機構に焦点を当てアフリカツメガエル胚を用いて解析を行い、オーガナイザーの分子基盤の一端を明らかにすることを目指した。

第一部：Xlim-1 の C 末側領域の機能ドメインの解析

これまで解析が不十分だった Xlim-1 のホメオドメインの C 末側領域 (amino acids (aa) 239–403 ; 以下、CT239-403) に注目し、その詳細な機能ドメイン解析を行った。CT239-403 を進化的保存性をもとに5つの領域 CCR1–5(C-terminal conserved regions)に分けて種々の CCR 変異体を作製し、2次軸形成能を指標に各領域の役割を検討した。まず、CCR1 (aa 239–260) 欠失変異体及び CCR2 (aa 275–295) 欠失変異体を調べたところ、両者は Ldb1 非存在下で高濃度 (1 ng/胚) で2次軸誘導活性を示した。野生型 Xlim-1 は Ldb1 の非存在下においては2次軸誘導活性をほとんど示さないことから CCR1 及び CCR2 が負の制御領域であることが示唆された。

Ldb1 との共発現により Xlim-1 は低濃度 (0.25 ng/胚) でも高率で2次軸を誘導する。この活性に必要な領域を欠失変異体を用いて検討した結果、最大活性には CCR2 と CCR4 が必要であった。一方、Ldb1 存在下では CCR1 の欠失による影響はほぼ見られなかった。また CCR2 の欠失、あるいは驚くべきことに CCR2 の保存された5つのチロシン残基のアラニンへの置換により活性がほぼ消失した。さらに CCR2 及びその近傍領域を含む aa 261–315 領域 (CT261-315) をホメオドメインの C 末側につないだ Xlim-1(1-240/261-315)は全長 Xlim-1 に匹敵する活性を示したことから、CT239-403 の持つ活性の大部分は CT261-315 に依存することが示された。CCR2 の重要性は、Xlim-1 と Ldb1 の複合体形成を模倣した融合蛋白質 Ldb-Xlim1 を用いた解析でもほぼ同様に示されたことより、CCR2 は Xlim-1 と Ldb1 との相互作用には関与せず直接 Xlim-1 の転写活性に関わっていることが示唆された。

同定した種々の機能ドメインを他の転写因子 GAL4 の DNA 結合ドメイン (GAL4DBD) と融合させても同様に機能するか否かを検討するために、アフリカツメガエル胚を用いた UAS-GAL4 の one-hybrid レポーター・アッセイを行った。その結果、2次軸誘導実験の結果と同様に CT261-315 はチロシン残基依存的な転写活性化ドメインとして機能した。CCR1 はこの系においても負の制御ドメインとして機能し、主に CCR2 による活性を抑制することが示唆された。また GST プルダウン・アッセイの結果、既知のコアクティベーター CBP、SRC-1、TIF2 と CT261-315 との相互作用は認められず、これら以外の未知のコアクティベーターの存在が示唆された。

以上の結果から CT239-403 には過去にほとんど報告がないチロシン残基依存的な転写活性化ドメイン (CCR2 を含む aa 261-315 領域) が存在するだけでなく抑制的に働く領域 CCR1 及び CCR2 が存在することが明らかになり、CT239-403 と相互作用してその転写活性に影響を与える様々な転写共役因子の存在が示唆された。これらの結果をもとに「Ldb1 非存在下において CCR1–CCR2 には何らか

の抑制補助因子が結合しており、Ldb1 が存在することでこれらが Xlim-1 からはずれ、CCR2 に何らかのコアクティベーターが結合することで Xlim-1 が活性型に移行する」という一つのモデルを想定している。

第二部：RING フィンガー蛋白質 XRnf12 による Xlim-1/Ldb1 の活性調節機構：XRnf12 による Xlim-1/Ldb1 の量比制御の可能性

LIM-HD 蛋白質 Lhx3/Lim3 の新規の抑制性の制御因子として RING フィンガー蛋白質 Rnf12/RLIM が報告された (Bach et al., 1999, *Nat. Genet.* 22, 394-9)。Rnf12 は同じ LIM-HD 蛋白質である Xlim-1 の制御因子の有力な候補と考えられたため、アフリカツメガエル・オーソログ *XRnf12* を同定し XRnf12、Xlim-1、Ldb1 の機能的相互作用を検討した。*XRnf12* と *Ldb1* の発現は酷似しており両者は原腸胚期の外・中胚葉に一様に発現していた。この時期 Xlim-1 は背側中胚葉に強く発現しており、3 者は背側中胚葉において共発現していることになる。mRNA 顕微注入実験により、XRnf12 は Xlim-1 と Ldb1 による 2 次軸形成を RING フィンガー依存的に抑制することが示された。また XRnf12 は背側帯域への過剰発現により頭部形成を RING フィンガー依存的に阻害した。これはオーガナイザーにおける Xlim-1 の標的遺伝子と考えられる *gooseoid*、*chordin* の発現量の減少を伴っており、内在性 Xlim-1 の活性を抑制した結果と考えて矛盾しない。一方、近年多くの RING フィンガー蛋白質がユビキチン・リガーゼ活性を持ち、特異的な基質のプロテアソーム依存的分解を引き起こすことが明らかになってきた。そこで XRnf12 による蛋白質分解の可能性を検討したところ、XRnf12 は RING フィンガー依存的にユビキチン・プロテアソーム経路による Ldb1 蛋白質の分解を引き起こした。しかし Xlim-1 の分解は引き起こさないことより、XRnf12 が Ldb1 の分解を介して Xlim-1 の活性を抑制することが示唆された。

一方、興味深いことに高濃度の Xlim-1 の共発現により、XRnf12 による Ldb1 の分解が抑制されることを見出した。この抑制には Xlim-1 の LIM ドメインと Ldb1 の LIM 結合ドメインが必要であり、Ldb1 は Xlim-1 と結合することで XRnf12 による分解を免れることが示唆された。これはオーガナイザーにおいて必要と考えられる Xlim-1/Ldb1 の活性が XRnf12 の存在下でどのように保証されているかを上手く説明すると思われた。では、Ldb1 の分解を引き起こす XRnf12 が Ldb1 と共発現することの意義は何であろうか？そこで私は 2 つの可能性を検討した。1 つは、Xlim-1 がないもしくは少ないと考えられる側方から腹側中胚葉において Ldb1 が XRnf12 によって特異的に分解され、背側から腹

側にかけて Ldb1 の濃度勾配ができていている可能性である。一方、Xlim-1 と Ldb1 は、Ldb1 のホモ2量体を介して4量体を形成し転写を活性化させると考えられている。ショウジョウバエの LIM-HD 蛋白質 Apterous と Ldb1 オーソログ Chip/dLDB の場合では、4量体形成に際し両者の適切な量比が4量体形成に重要であるという知見が報告されている。そこで2つ目として、XRnf12 が Xlim-1 と未結合の余剰の Ldb1 蛋白質を分解することでオーガナイザーにおける Xlim-1 と Ldb1 の適切な量比の制御を行っている可能性を考えた。

まず、抗 Ldb1 抗体を用いて背腹の Ldb1 蛋白質の発現量をウエスタン・ブロットと免疫染色で比較したところ、mRNA 分布同様ほぼ均一に Ldb1 蛋白質の発現が認められたことから第1の可能性は否定された。次に第2の可能性について検討したところ、Xlim-1/Ldb1 による2次軸誘導活性は Xlim-1 の発現量を固定した条件下で Ldb1 の発現量を増大させると量依存的に減少し、また Xlim-1 の発現量を上げることで活性が回復したことから、余剰の Ldb1 が Xlim-1/Ldb1 の量比を乱すことで活性に対して抑制的に働くことが示唆された。さらに、Ldb1 は背側帯域への過剰発現により *goosecooid*, *chordin* の発現を強く抑制し、この抑制は XRnf12 の共発現によって RING フィンガー依存的に回復した。これは XRnf12 による Ldb1 の特異的分解による結果と考えられ、第2の可能性、すなわち XRnf12 が Xlim-1 に未結合の余剰の Ldb1 を分解することで Xlim-1/Ldb1 の適切な量比及び活性の制御を行っていることが示唆された。腹側でも Ldb1 蛋白質の発現が認められた点に関しては、側方・腹側中胚葉においても何らかの LIM ドメイン蛋白質によって XRnf12 による Ldb1 の分解が阻害されていると予想している。その候補としては最近単離された LIM ドメイン蛋白質 XLMO4 の存在が考えられる (Gomez-Skarmeta, J.L., 私信)。

これまで LIM-HD/Ldb1 による4量体形成に重要と考えられる LIM-HD 蛋白質と Ldb1 の量比制御に関する解析はほとんどない。XRnf12 と Ldb1 は胚発生の時期を通して類似の遺伝子発現を示すことから XRnf12 による制御が他の LIM-HD 型転写因子にも一般化できる可能性も示唆され、興味深い。

以上 Xlim-1 の活性調節機構に焦点を当てて解析を行った結果、Xlim-1 はオーガナイザーに特異的に発現するがその活性はさらに様々な共役因子によって蛋白質レベルで厳密に制御されている可能性が示めされた。この結果はオーガナイザーの分子基盤の一端を明らかにすると共に、LIM-HD 型転写因子の活性調節に関する重要な知見をもたらすと考えられる。