

## 論文の内容の要旨

論文題目：Regulation of the head-inducing factor gene *cerberus* by organizer-specific

transcription factors in *Xenopus*

(アフリカツメガエルのオーガナイザー特異的転写因子による

頭部誘導因子 *cerberus* 遺伝子の発現制御機構)

氏名 山元進司

シュペーマンとマンゴールドによる両生類胚の原口背唇部の移植実験により発見されたオーガナイザーは、それ自身は脊索等の体軸中央の構造になるが、その周囲の組織に神経管、体節等を誘導し、完全な体軸形成を行う能力をもつ。したがってオーガナイザー形成の分子機構、およびその機能を担う分子の実体の解明は、脊椎動物の初期発生を理解するうえで重要な問題である。近年、特にアフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) を用いた研究により、オーガナイザー形成に関わる転写因子や、その機能を担うシグナル分子が多数同定されその概要が明らかになりつつある。しかし、これらの因子がどのように相互作用することでオーガナイザー形成から誘導現象へ至るのかについての分子カスケードに関しては未だ十分には明らかにされていない。オーガナイザー特異的転写因子のうち *Xlim-1* は LIM ホメオドメイン・タンパク質に属し、転写活性化因子であることが示されている。これまで、*Xenopus* や、マウスを用いた実験の結果から、*Xlim-1* はオーガナイザーのもつ機能のうち、特に頭部誘導能に関わっていることが示唆されており、このことから *Xlim-1* の

標的遺伝子の中に頭部を誘導するシグナル分子が含まれていることが予想される。当研究室の日笠らによって行われた、活性化型 Xlim-1 (Xlim-1/3m) により発現が上昇する遺伝子のスクリーニングの過程で、頭部誘導活性をもつ分泌性因子である Cerberus の遺伝子発現が、Xlim-1/3m により活性化されることが示された。このことは、Xlim-1 のもつオーガナイザー活性は cerberus 遺伝子の発現の活性化を介していることを示唆している。そこで、私は cerberus 遺伝子のプロモーター解析を行い、Xlim-1 および他の転写因子により cerberus 遺伝子の発現がどのように制御されているかを調べることにより、オーガナイザー形成から頭部誘導に至る分子カスケードを明らかにできるのではないかと考え、本研究に着手した。

はじめに、cerberus 遺伝子が Xlim-1 の直接の標的遺伝子であるか検討を行った。Xlim-1/3m とグルココルチコイド受容体のホルモン結合部位とのキメラ・タンパク質（デキサメサゾン存在に応じて、機能を発揮する）を用いたところ、翻訳阻害剤の存在下でも Xlim-1/3m は cerberus 遺伝子の発現を活性化した。この結果は Xlim-1/3m が直接 cerberus 遺伝子を活性化し得ることを示している。また、*in situ* ハイブリダイゼーションにより、Xlim-1 と cerberus の発現領域は、cerberus 遺伝子の発現が始まる初期原腸胚期においてオーガナイザー領域で重複していることが示された。これらの結果は cerberus が Xlim-1 の標的遺伝子である可能性を支持した。

次に、cerberus 遺伝子のプロモーター領域を解析するため、Xenopus ゲノム・ライブラリーから cerberus 遺伝子の 5' 上流領域を含むクローンを単離し、翻訳開始のメチオニンから約 2 kb 上流を含む領域、およびレポーター遺伝子として、ルシフェラーゼと enhanced green fluorescent protein (EGFP) を用いたレポーター・コンストラクトを作製した (-1938cer/Luc、-1938cer/EGFP)。まず、-1938cer/EGFP を胚の帯域全体に顕微注入し観察したところ、EGFP の発現は初期原腸胚期ではオーガナイザー領域で、後期原腸胚期においては前方内中胚葉領域で見られた。この発現パターンは cerberus mRNA の局在パターンと類似していることから、この 5' 上流領域には cerberus 遺伝子の発現を時間的、空間的に制御する領域が含まれていることが示唆された。そこで、次にルシフェラーゼ・レポーター・コンストラクトを用いてプロモーター解析を行った。Xlim-1/3m に対する cerberus プロモーターの反応を検討したところ、1938 bp プロモーター領域は Xlim-1/3m に反応し、この反応は 415 bp プ

ロモーター領域で十分であり、-219/-116 領域、およびこの領域に存在する、3 つの隣接したホメオドメイン・タンパク質の結合配列である TAAT 配列 (3xTAAT エlementと命名) が必要であった。次に、胚の内在性因子に対する *cerberus* プロモーターの反応を調べたところ、1938 bp プロモーター領域は、*cerberus* 遺伝子が発現している胚の背側において特異的に活性化され、その活性化は、Xlim-1/3m の場合と同様に 415-bp プロモーター領域で十分であり、3xTAAT エlementが必要であった。また、Xlim-1 の転写活性化領域と考えられる C 末側をショウジョウバエ *Engrailed* の転写抑制領域に置換した、ドミナント・ネガティブ型の Xlim-1 により、*cerberus* プロモーターの胚の背側での活性化は抑制され、この抑制は野生型の Xlim-1 により回復した。さらに、ゲル・シフト・アッセイ (EMSA) により、Xlim-1/3m は 3xTAAT エlementを含む *cerberus* プロモーター領域に結合することが示された。これらの結果は、*cerberus* 遺伝子が Xlim-1 の標的遺伝子であることを強く示唆している。

一方、LIM ホメオドメイン・タンパク質は LIM ドメインを介して他の因子と相互作用し、標的遺伝子の転写を調節することが知られている。そこで、Xlim-1 と協調的に作用し、*cerberus* 遺伝子の発現を活性化する因子の検討を行った。これまで、*cerberus* 遺伝子の発現は中胚葉誘導シグナル (Nodal/activin シグナル) と背側化シグナル (Wnt シグナル) により協調的に活性化されること、Xlim-1 は中胚葉誘導シグナルの直接の標的遺伝子であることが示されていた。さらに本研究において、*cerberus* プロモーターは中胚葉誘導シグナルである Xnr1 (*Xenopus nodal-related 1*) と背側化シグナルである Xwnt8 により協調的に活性化されるが、この活性化には 3xTAAT エlementが必要であること、および中胚葉誘導因子である activin による *cerberus* 遺伝子の発現の活性化には、タンパク質合成が必要であることが明らかとなった。これら結果は中胚葉誘導シグナルおよび背側化シグナルの標的遺伝子のホメオドメイン・タンパク質が Xlim-1 と共に *cerberus* 遺伝子の発現の活性化に関与していることを示唆した。そこで、Xnr1 と Xwnt8 シグナルの下流にある転写活性化型ホメオドメイン・タンパク質 Xotx2、Mix.1 (Nodal/activin の下流) および Siamois (Wnt の下流) に注目して検討を行った。その結果、アニマル・キャップ・アッセイにより Xlim-1 は Mix.1 および Siamois と協調的に内在性の *cerberus* 遺伝子を活性化すること、レポーター・アッセイによりこの 3 者は *cerberus* プロモーターも活性化し、この活性化には 3xTAAT エ

レメントが必要であることが示された。また、LIM ドメインに変異を導入した Xlim-1/3m では、このプロモーターの協調的な活性化は起こらないことから、この協調性には Xlim-1 の LIM ドメインが必要であることが示された。さらに、Xotx2 は、-95 に存在する TAATCT 配列を介して Mix.1、Siamois と協調的に *cerberus* プロモーターを活性化することが示された。

これらの転写因子が果たして 3xTAAT エlement に結合するか否かを EMSA で検討した。その結果、Xlim-1、Mix.1 および Siamois は 3 者共存下でのみ 3xTAAT エlement を含む領域 (-151/-80) に複合体を形成して結合すること、およびこの複合体の形成には Xlim-1 の LIM ドメインが必要であることが示された。しかし Xotx2、Mix.1、Siamois はそれぞれ単独で -151/-80 領域に結合するが、複合体は形成しなかった。

以上の結果から、「オーガナイザーを形成する Nodal と Wnt のシグナルは Xlim-1、Xotx2、Mix.1、Siamois の発現を介することで *cerberus* 遺伝子を活性化し頭部誘導をもたらす」という、オーガナイザー形成から頭部誘導に至る誘導連鎖の遺伝子カスケードを描くことが可能となった。