

論文審査の結果の要旨

氏名 山元 進司

本論文は脊椎動物の初期発生における誘導連鎖の分子メカニズムを明らかにするため、シュペーマンオーガナイザーにおける頭部誘導因子 Cerberus の遺伝子発現に注目し、中胚葉誘導因子や背側化因子で直接発現誘導される転写因子 Xlim-1、Siamois、Xotx2、Mix.1 による発現調節機構を、主にレポーター解析を用いて検討した結果について述べている。

オーガナイザー形成から神経誘導に至る誘導連鎖の分子カスケードは未だ充分には明らかにされていないことより、神経誘導を担うと考えられている分泌性因子の遺伝子発現の調節機構を理解することは重要である。そこでオーガナイザー特異的転写因子 Xlim-1 の活性化型変異体 Xlim-1/3m により発現上昇する頭部誘導因子 Cerberus の遺伝子発現調節機構を解析した。

まず Xlim-1/3m による内在性 *cerberus* 遺伝子の活性化について検討したところ、Xlim-1/3m による *cerberus* の発現上昇は翻訳阻害剤の存在下でも認められた。このことは Xlim-1/3m は他の転写因子の合成を介さず直接 *cerberus* 遺伝子を活性化できることを示している。また Xlim-1 と *cerberus* の発現領域は、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たことから、*cerberus* が Xlim-1 の標的遺伝子である可能性が支持された。そこで *cerberus* のゲノム遺伝子をクローニングし、構造と転写開始部位を決定したのち、約 2 kb の 5'プロモーター領域をレポーター遺伝子につないだコンストラクトを作成しプロモーター解析を行った。その結果、*cerberus* レポーター遺伝子は内在性の *cerberus* 遺伝子と同様なオーガナイザーでの発現を示し、かつ Xlim-1/3m により活性化された。このオーガナイザー領域での発現と Xlim-1/3m に対する反応性はどちらの場合も 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連続した 3つの TAAT エlement (3xTAAT エlement と命名)が必要であった。さらに、ドミナント・ネガティブ型 Xlim-1 の Xlim1-enR により背側でのレポーター遺伝子の活性化は抑制され、これは野生型の Xlim-1 により回復したことより、内在性因子による *cerberus* レポーター遺伝子の活性化には Xlim-1 の関与が考えられる。これらの結果から、*cerberus* 遺伝子の発現がオーガナイザー領域で Xlim-1 により直接活性化されることが示唆された。しかし Xlim-1 の活性化制御因子と考えられている LIM ドメイン結合因子 Ldb1 との共発現では Xlim-1 は内在性 *cerberus* 遺伝子およびその

レポーター遺伝子を活性化することができなかった。そこで *cerberus* 遺伝子の活性化には Xlim-1 と協調的に働く他の因子の存在が予想された。

一方、オーガナイザーを形成するシグナルである Nodal シグナル（内中胚葉を誘導する）と Wnt シグナル（背側化する）によって *cerberus* レポーター遺伝子は活性化され、その活性化には 3xTAAT エlementが必要であった。そこで Nodal シグナルの標的遺伝子 Xotx2、Mix.1 と Wnt シグナルの標的遺伝子 Siamois が、Xlim-1 と協調的に働く転写因子である可能性が考えられた。この点を検討した結果、これら4つの転写因子により協調的に内在性の *cerberus* 遺伝子が活性化されること、レポーター遺伝子の協調的な活性化には 3xTAAT エlement、および Xlim-1 の LIM ドメインが必要であることが示された。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した。DNA エlementへの転写因子の結合を検討したところ、Xlim-1、Mix.1 および Siamois は3者共存下でのみ 3xTAAT エlement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。これらの結果から、Xlim-1、Mix.1、Xotx2、Siamois は Nodal、Wnt シグナルの下流で *cerberus* 遺伝子の発現を直接活性化していることが示唆された。

以上のように本研究により、オーガナイザーを誘導する 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のモデルが示唆された。

なお、本論文は日笠弘基、小野裕史、平良眞規との共同研究であるが、論文提出者が主体となって分析と検証を行ったもので、論文提出者の寄与は十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。