

{別紙1}

論文の内容の要旨

論文題目 Molecular analysis of *FRL-1*, a member of the EGF-CFC family, in *Xenopus* neural induction

和訳 アフリカツメガエル胚の神経誘導における EGF-CFC 関連遺伝子 *FRL-1* の分子生物学的解析

指導教官 武谷雄二教授

 東京大学大学院医学研究科
 2001年4月入学
 医学博士過程
 生殖/発達/加齢医学専攻
 矢部 慎一郎

EGF-CFC 関連遺伝子群は脊椎動物の発生に重要な役割をはたすことが知られている。特に最近の知見により中胚葉誘導活性を有する nodal 関連遺伝子の共役因子と考えられている。今回私は、カエルの相同遺伝子 *FRL-1* の機能阻害実験を通して *FRL-1* の胚内での機能の解析を試みた。*FRL-1* が nodal の共役因子であるとすると *FRL-1* は中胚葉誘導に関与しそれに引き続き神経分化を誘導すると考えられるが、実際には *FRL-1* は中胚葉誘導を介すことなく直接神経誘導に関与することを明らかにした。また、そのシグナル伝達は *FRL-1* による MAPK シグナルの活性化が BMP シグナルを阻害することによって伝達されることを明らかにした。以上により、*FRL-1* は nodal シグナルと独立した伝達経路で直接神経分化を誘導できることが明らかになった。

アフリカツメガエル胚は受精後、卵割を繰り返し、約7時間で胞胚期（外、中、内胚葉形成期）に入り10時間で原腸陥入期を経て神経形成が始まる。そして4日で幼生になり約60日で成体となる。この発生過程で細胞間相互因子により誘導され分化していくもっとも重要な現象として、中胚葉誘導と神経誘導の2つが挙げられる。中胚葉誘導は胞胚後期に内胚葉（卵植物極側）よりの中胚葉誘導因子が卵赤道領域に分泌され、その誘導により中胚葉が形成される。これに引き続き中胚葉背側に神経誘導因子が誘導されこれが、外胚葉（卵動物極）に分泌され、その作用を受け神経が誘導される。これらの作用を担う因子は最近の分子生物学的考察により序々に明らかになってきた。中胚葉誘導活性を有する因子として TGF- β superfamily が注目されてきたが、現在ではその中の1つ nodal が、主因子であり中胚葉誘導に関与すると考えられている。一方外胚葉には TGF- β superfamily の1つ Bone Morphogenetic Protein (BMP-4)が存在しており、この因子の存在下では外胚葉は表皮に分化する。しかし、ここに中胚葉背側からの神経誘導因子 Chordin, Noggin, Follistatin が作用するとその部位のみ神経に分化する。このように中胚葉誘導と神経誘導は密接に関連していると考えられる。

EGF-CFC 遺伝子は EGF like motif と CFC motif という特有の配列をもつ因子の総称であり、現在まで脊椎動物にのみ相同遺伝子が確認されている。形態形成においてゼブラフィッシュ EGF-CFC 遺伝子 *oep* 変異体の解析より胚葉形成、前後軸形成、左右軸形成に関与することが報告され、中胚葉誘導活性を有する nodal の共役因子である可能性が示唆されている。しかし一方でマウス相同因子 Cripto の解析では、nodal と関係のないシグナル伝達経路の存在も示唆されている。アフリカツメガエルにおける EGF-CFC 相同遺伝子 FRL-1 は fibroblast growth factor (FGF)レセプターのリガンドとして単離され、過剰発現により後期神経マーカーの誘導能と共に高濃度において中胚葉マーカーの誘導能があることがわかってきた。しかし機能阻害実験は現在まで行われていない。本研究ではモルフォリノ・アンチセンス・オリゴヌクレオチドによる機能欠損実験を用い、FRL-1 が中胚葉誘導/神経誘導とどのように関与しているかを明らかにすることにより中胚葉/神経誘導のシグナルカスケードの一端を解明することを目的とした。

まず、私は機能阻害実験に先立ち、現在まで明らかにされた神経/

中胚葉誘導能の再試を試みた。*FRL-1* をアフリカツメガエル後期胞胚の未分化細胞アニマルキャップにマイクロインジェクション後培養、RNA抽出後RT-PCR法で発現解析したところ、後期神経遺伝子マーカー *N-CAM*, *otx2* の発現は認められたものの、中胚葉遺伝子マーカー *ms-actin*, *collagen type 2* は発現しなかった。これは *FRL-1* による神経誘導が中胚葉誘導を経由しないことを示している。このため次に、神経誘導のどの時期より関与するのかについて同様に調べた。すると初期神経遺伝子マーカー *zic3*, *soxD* の誘導能が確認された。この際、中胚葉遺伝子マーカー *Xbra* の発現は認めなかった。また *FRL-1* による神経誘導能は、BMP シグナルの阻害によるものかを調べた。この結果は、BMP 下流遺伝子の *Xvent-1*, *Xmsx-1* の発現が *FRL-1* の過剰発現により阻害され逆に *BMP-4* による神経誘導因子 *zic3*, *soxD* の阻害は *FRL-1* の過剰発現により回復した。これにより過剰発現において、*FRL-1* は中胚葉誘導を経由せず、直接神経誘導の初期に関与することが示唆された。

続いて機能阻害実験により *FRL-1* の胚内での機能を調べた。まず、*FRL-1* に対するモルフォリノ・アンチセンス・オリゴヌクレオチド(*FRL-1MO*) を作製し Western blotting 法により *FRL-1* に対する特異的阻害性を確認した。そして *FRL-1MO* をツメガエル胚8細胞期にマイクロインジェクションすることにより *FRL-1* 欠損胚を作製しフェノタイプ解析を行った。*FRL-1* が *nodal* の共役因子として働くとする、中胚葉性組織の欠損が予想されるが、しかし *FRL-1* 欠損胚では薄切標本において脊索、前腎管などの中胚葉性組織には欠損は見られず、神経組織に欠損が認められた。そしてその神経欠損は、神経マーカー Neu1 抗体を用いた Whole-mount in situ immunohistology 法および脊髄マーカー *BOXB9* を用いた RT-PCR 法により、前方神経にとどまった。また初期神経遺伝子マーカー *zic3*, *soxD*, *Xngnr-1*, *BF1* をプローブにして Whole-mount in situ hybridization 法により発現解析したところ *FRL-1* 欠損胚ではこれらの発現が阻害されていた。このことより過剰発現の知見と同様に *FRL-1* の神経誘導能は中胚葉誘導を伴わない直接的なものであり、かつ前方神経分化の早期に関与していることが明らかになった。その一方で、*FRL-1* が *HOXB9* の発現を *in vitro* で誘導できることから、*FRL-1* による後方神経の誘導能も示唆された。

神経分化阻害を担う BMP シグナルは細胞外蛋白である *BMP-4* がレセプターに結合することから始まる。そしてレセプターの活性化は、細胞内蛋白 Smad-1 をリン酸化し核内に移行し転写因子 *Xvent-1*, *Xmsx-1* を活性化するこ

とにより神経誘導を阻害する。一方 *FRL-1* は本知見により *Xvent-1*, *Xmsx-1* より上流で BMP シグナル伝達経路を阻害することが確認されたので、より早い時期、特に細胞内での関与を想定し、*FRL-1* が FGF レセプターのリガンドであることに着目して、FGF シグナルを担う phospholipase C- γ ($PC\gamma$)シグナル 及び mitogen-activated protein kinase (MAPK)シグナルと神経誘導との関連を解析することにした。まず、アニマルキャップにおける *FRL-1* の過剰発現による神経誘導が、 $PC\gamma$ シグナルを担う inositol triphosphate (IP3)阻害物質 LY294002 により阻害されず、MAPK シグナルの阻害物質 PD98059 により阻害されることを RT-PCR 法により確認した。これにより *FRL-1* は MAPK シグナルの活性化により神経分化に関与していることが示唆された。そこで次に実際に *FRL-1* が MAPK シグナルを活性化しているかどうかを Western blotting 法にて確認した。すると、アニマルキャップにおいて *FRL-1* の過剰発現、及び *FRL-1MO* による機能阻害により MAPK の活性化の上昇及び消失が認められた。さらに胚内でも *FRL-1* の神経誘導能が MAPK シグナルを介することを示すために、*FRL-1* 欠損胚が MAPK の活性化により代償されるかを調べた。その結果は、*FRL-1MO* による *FRL-1* 欠損胚の頭部神経欠損の表現型は *CA-MAPKK*(MAPK の常活性化体)の形質導入で回復した。これにより、*FRL-1* は MAPK シグナルを活性化することにより神経誘導に関与することが明らかになった。

では、この *FRL-1* による MAPK シグナルの活性化は実際に BMP シグナルを阻害できるのであろうか？この疑問を解くために、*FRL-1* による BMP シグナルの阻害が MAPK シグナルの阻害によって回復するかを RT-PCR 法により解析した。そしてアニマルキャップにおける *FRL-1* の過剰発現による BMP 下流遺伝子マーカー *Xvent-1*, *Xmsx-1* の発現阻害が、MAPK シグナルの阻害物質 PD98059 により回復することがわかった。したがって、*FRL-1* は MAPK シグナルを活性化することにより BMP シグナルを阻害することができその結果神経誘導に関与することが明らかになった。

最後に *FRL-1* は BMP レセプター直下の細胞内蛋白 Smad1 のリン酸化を阻害することで BMP シグナルを阻害することを Western blotting 法にて明らかにした。これにより、*FRL-1* は、BMP シグナルのもっとも早期での阻害、すなわち、表皮/神経への分化の運命を決定する時期に神経誘導因子として作用することが示唆された。