

論文の内容の要旨

論文題目 **The role of fibroblast growth factor (FGF) signaling in the regulation of gastrulation in *Xenopus***
(アフリカツメガエル胚を用いた FGF シグナルの原腸形成制御における機能解析)

氏名 鄭 恵英

生物の形作りの仕組みは、厳密な遺伝子発現の制御による細胞分化と、これら細胞の秩序正しい運動や巧妙な相互作用による位置情報獲得が基本である。原腸形成は発生過程における最初の形態形成であり、これにより球状の受精卵は外胚葉、中胚葉、内胚葉の三胚葉を有する桿状の胚へと変化する。原腸形成の制御機構の解明に関わる様々な研究がなされ、Wnt, FGF, BMP 等の細胞増殖因子が非常に大事な役割を担っている。初期発生において、FGF (線維芽細胞増殖因子, Fibroblast growth factor) は Ras-MAPK 依存的に中胚葉誘導やパターン形成を制御することが以前から知られていた。近年、FGF が MAPK 非依存的に原腸形成運動制御にも関わっていることを強く示唆する論文が報告されている。FGF の標的因子である Xsprouty2 の機能解析により、胚を前後方向に伸長させるのに最も重要であると言われている収斂と伸長 (convergent extension、以下 CE とする) の阻害が報告された。しかしながら、発生過程で様々な機能を担う FGF シグナルがどのように制御され、どのように相互作用しているのかはまだ未知の部分が多い。そこで、FGF シグナルを非可逆的に阻害できる化学的阻害剤とゲノムレベルの網羅的な解析が可能である cDNA microarray 法を駆使し、初期発生過程、特に原腸形成における FGF シグナルの機能解析を試みた。

ツメカエルの原腸 10.5 胚から切出した Keller explant を DMSO と阻害剤である SU5402 を添加、原腸胚 11.5 になるまで培養し、組織から mRNA を抽出した。NIBB 4.6K non-redundant cDNA microarray を利用し、遺伝子の発現変化を検討した。その結果 DMSO に比べ 2 倍以上または 2 倍以下遺伝子発現の変動が見られた、43 個の遺伝子が同定された。そのうち 38 遺伝子は 2 倍以上の発現上昇が、5 遺伝子は 2 倍以下の発現減少が見られた。BLAST 検索を行った結果、同定された因子群は機知の FGF 標的因子も多数含まれており、全体の約 6 割が未知の因子だった。次に whole-mount *in situ* hybridization 法を用い、これら遺伝子の時間的、空間的な発現パターンを調べた。発現パターンを解析することで、これら因子がどのような制御に関わっているのかが推定できると思われる。さらに、これら遺伝子は FGFR1 の標的遺伝子として同定されたことから、FGFR1 の機能との密接な関係にあると考えられる。各々の発現パターンの比較を行った結果、特に原腸胚で FGFR1 と類似の発現パターンを示す 6 個の新規遺伝子を同定した。これら新規遺伝子群を synexpression factor (共発現因子群) とする。

次に、新規遺伝子と FGF シグナルの関連をもっと詳しく調べるため、FGF シグナルの標的因子である Xbra, Xspry2, Xmc を予定外胚葉や背側中胚葉に顕微注入し、新規遺伝子の発現量を調べた。新規遺伝子のうち Xmig6 と名づけた因子のみ Xbra による発現上昇が見られ、他の因子に関しては発現量の変化は認められなかった。これら新規遺伝子群の発現が MAPK の活性に依存しているかどうかを MAPKK の阻害剤である、U0126 を用いて発現量の変化を調べた。すると、新規因子のう

ち Xmig6 のみが U0126 添加により、発現が著しく減少した。即ち、新規 FGF の標的因子 Xmig6 は MAPK 依存的に FGF シグナルによって制御される。さらに解析を進め、Xmig6 は Xbra の下流因子であり、筋分化に関わっていることが解った。これに対し G protein coupled receptor 4 タンパク質をコードする新規因子 XGPCR4 は MAPK 非依存的な経路で転写調節され、原腸形成における細胞運動を制御していることが解った。阻害剤を使うことで、FGF シグナルの時期と領域特異的な機能を調べることができた。

また、microarray を使うことで、FGF シグナルをゲノムレベルで網羅的に解析することが可能である。この結果は今回の実験方法が発生過程特に、原腸形成における FGF シグナルの多様な機能を知る上で有効なツールであると言えるだろう。

次に、FGFR1 の synexpression 因子である NRH に注目した。NRH は原腸胚初期に blastopore の周りに発現し、in situ hybridization を行った胚の cross-section からその発現パターンを詳しく調べた結果、背側中胚葉に強く発現が認められ、神経胚では後方側と axial mesoderm, midline に強く発現が見られた。NRH は N 末端側に cystein repeats、C 末端に death domain と PDZ motif を持つ一回膜貫通型のタンパク質をコードする。antisense morpholino oligonucleotide (以下 Mo とする) による機能阻害実験の結果、前後軸が短くなる表現形や *spina bifida* の表現形が見られたのと共に、CE の際背側中胚葉細胞群が内外側方向に微小突起を形成し相互に滑りこむ細胞運動である intercalation が阻害された。NRH Mo が導入された背側中胚葉細胞は微小突起を消失しており、この表現形は全長の NRH と細胞内領域により回復した。また、このような微小突起形成には Wnt/PCP 経路が重要な役割を果たしていることが知られていたため、NRH と Wnt/PCP 経路の関係を調べた。結果、両者は微小突起形成において、協調的な作用があり、低分子長 GTPases の Rho と Rac がその下流で細胞骨格を制御していることが今回の実験により明らかになった。面白いことに、NRH は FGF シグナル依存的な微小突起形成を正に制御しており、mRNA を顕微注入することで SU5402 処理に伴う微小突起消失を救済できた。

今までの研究により初期発生における FGF シグナルの (1) 時間的、空間的制御パターンを網羅的に解析、(2) その過程で細胞分化や誘導に関わる canonical と細胞運動と骨格制御に関わる non-canonical 経路に分かれる、(3) 細胞運動と骨格制御に重要な役割を果たす分子 NRH が FGF シグナルの下流で、FGF シグナルによる細胞運動と骨格制御を制御する key molecule であることを明らかにした。また、細胞増殖因子の機能はショウジョウバエから人間までよく保存されており、これら因子の制御異常による先天性疾患やがん化などが数多く報告されているため、FGF シグナルを網羅的に解析することで、医学的応用にも繋がることを期待している。今後は FGF シグナルが原腸形成の細胞運動と極性を制御するのにどのように関わっているのかについてさらに解析を続ける予定である。