

## 論文内容の要旨

### 論文題目

The time-dependent regulation of mesoderm induction in early *Xenopus laevis* embryos

(アフリカツメガエル初期胚における中胚葉誘導の時間的制御)

氏名 阿部 剛典

初期発生において中胚葉誘導は非常に重要な現象であり、誘導因子の探索など中胚葉誘導の起きるメカニズムについて多くの研究がなされてきた。TGF- $\beta$ ファミリーに属するアクチビン(Actin)は強力な中胚葉誘導能を有し、未分化状態の予定外胚葉細胞(Animal cap)に作用させると様々な中胚葉組織を分化誘導する。今までアクチビンを胞胚期のAnimal capに作用させると中胚葉誘導が起きるが、原腸胚期のAnimal capに作用させても中胚葉誘導は起きないことが知られていた。このように中胚葉誘導は時間特異的なものであり、発生過程のある段階で細胞が誘導因子に対する応答能を失い、中胚葉誘導を終了させる“Loss of Mesodermal Competence (以下 LMC と略記)”という現象が起きる。LMC は中胚葉誘導の開始と同様に重要な現象であり、LMC が正常な時期に起きなければ、中胚葉組織が過剰に誘導されてしまうことが予想される。しかし、これまで LMC の起きるメカニズムや原因因子については殆んど解明されていなかった。私は、Notch シグナルに着目し LMC のメカニズムを解明しようと試みた。Notch シグナルの作用は多岐に渡っているが、その中の重要な作用の 1 つに幹細胞や前駆細胞を未分化な状態に保つというものがある。またアフリカツメガエル胚においては Notch シグナルを活性化すると中胚葉誘導が増強されるという報告がなされている。そこで私は「Notch シグナルは未分化細胞が中胚葉組織へと分化誘導される過程で LMC の起きる時期を遅らせ、中胚葉誘導を促進しているのではないか」という作業仮説を立て、Notch シグナルの中胚葉誘導への影響、及び LMC の起きる

メカニズムを解明することを目的として実験を行った。

本研究ではまず、Notch シグナルを活性化することで LMC の時期に変化が生じるかどうかを検証した。様々な発生段階のアニマルキャップにアクチビン処理し、誘導される中胚葉遺伝子の発現を調べたところ、Notch シグナルが活性化されたアニマルキャップでは原腸胚期以降も中胚葉遺伝子の発現が誘導された。この結果は、Notch シグナルはアニマルキャップにおいて LMC の時期を遅らす作用があることを示している。LMC がアニマルキャップで起きることは知られていたが、*in vivo* で LMC が実際に起きているのかどうかは確かめられていなかった。そこで私はアクチビンを染み込ませたビーズを埋め込む“アクチビンビーズ移植実験”を開発した。アクチビンビーズを胞胚期に埋め込むと異所的な中胚葉誘導が引き起こされ二次軸が形成されたが、中期原腸胚期にアクチビンビーズを埋め込んでも二次軸は形成されなかった。一方、Notch シグナルを活性化させた中期原腸胚期の胚にアクチビンビーズを埋め込むと二次軸が形成された。この結果は *in vivo* においても LMC が胞胚期から原腸胚期の間で起き、Notch シグナル活性化により LMC の時期が遅くなったことを示している。またレポーターアッセイにより、内在性の Notch シグナルは胞胚期から原腸胚期にかけて一過的に中胚葉領域で活性化し、且つ異所的な Notch シグナル活性化は内在性の中胚葉遺伝子の発現を促進することが確かめられた。これは Notch シグナルが正常発生の過程においても LMC の時期を調節していることを示唆している。

次に LMC の起きるメカニズムの解明を試みた。アクチビンシグナル経路は大きく分けて以下の 5 ステップから構成されている。①リガンドであるアクチビンが受容体と結合する。②活性化した受容体により smad2 の C 端がリン酸化される（以下 Psmad2C と表記）。③Psmad2C が smad4 と複合体を形成する。④Psmad2C/sm4 複合体が核へと移行する。⑤Psmad2C/sm4 複合体が DNA と結合し標的遺伝子の転写を引き起こす。私は LMC の前後、Notch シグナルの活性化によりどのステップに変化が生じるのかを調べることで LMC の起きるメカニズムを解明しようと試みた。その結果、①Notch シグナルを活性化してもアクチビン受容体の発現量に変化は生じなかった。②LMC の前後、及び Notch シグナル活性化により smad2 の C 末のリン酸化レベルに変化は生じなかった。③LMC 後は Psmad2C/sm4 複合体が形成されなくなっていたが、Notch シグナルを活性化することで複合体が形成された。④LMC 後は Psmad2C/sm4 複合体が核に移行しなくなっていたが、Notch シグナルを活性化することで複合体が核に移行した。⑤LMC 後は中胚葉遺伝子の転写が起きなくなっていたが、Notch シグナルを活性化することで中胚葉遺伝子の転写が起きた。以上の結果から、LMC は「発生の過程で Psmad2C が smad4 と結合する能力を失い、複合体が核に移行できなくなるため中胚葉遺伝子の転写が起きなくなる」ことで生じ、「Notch シグナルは Psmad2C と smad4 との結合を調節することで LMC の時期を調節している」ことが分かった。

さらに私は LMC の前後で Psmad2C/smad4 複合体形成を調節するメカニズムの解明を試みた。Smad2 は様々な修飾を受けており、C 端以外にリンカー部位がリン酸化されることが知られている。近年、smad2 リンカー部位のリン酸化が TGF- $\beta$  シグナルを負に調節するという報告なされた。そこで私は smad2 リンカー部位がリン酸化されると Psmad2C/smad4 複合体形成が阻害され、LMC が起きるのではないかと予想した。しかし、LMC の前後、Notch シグナルの活性化により smad2 リンカー部位のリン酸化レベルは変化せず、且つ smad2 リンカー部位のリン酸化状態によらず Psmad2C と smad4 は複合体を形成した。よって私は、smad2 リンカー部位リン酸化は Psmad2C/smad4 複合体形成、及び LMC の時期に影響を与えないと結論付けた。Notch シグナル経路で転写因子として働く Su(H) の作用を阻害すると、LMC の時期を遅くするという Notch シグナルの効果が抑制された。この結果は Notch シグナルが標的遺伝子の転写を介し LMC の時期を調節していることを示している。そこで私は DNA マイクロアレイを用い、Notch シグナルの下流で働き、LMC の時期を調節している遺伝子を検索した。私は 2 つのタイプの候補遺伝子を想定した。Type I 候補遺伝子として感受性維持遺伝子 (LMC 前でのみ発現し Psmad2C と smad4 との結合を保証しているもの) を想定した。LMC 以後発現量が減少する遺伝子は 36 個存在していた。Type I 候補遺伝子の機能を調べるため、mRNA をインジェクションしたアニマルキャップにアクチビン进行处理し誘導される中胚葉遺伝子の発現を調べた。Mcm10p、RING finger protein、sox12、oocyte-specific protein (p100)、RGS4 protein、protein phosphatase1 の mRNA をインジェクションすると原腸胚期のアニマルキャップにおいても中胚葉遺伝子の発現が誘導され、これらの遺伝子は LMC の起きる時期を遅くする作用があることが分かった。またこれら 6 つの遺伝子の発現部位を whole mount *in situ* hybridization により調べると sox12 と RGS4 protein は初期原腸胚期中胚葉領域で発現していた。Type II 候補遺伝子として感受性低減遺伝子 (LMC 後でのみ発現し Psmad2C と smad4 との結合を阻害しているもの) を想定した。LMC 以後発現が増加する遺伝子は 30 個存在していた。その内 GATA-2、Xoct-91、eukaryotic initiation factor 5、X-box binding protein、Xgadd45-gamma の mRNA をインジェクションすると胎胚期のアニマルキャップにおいても中胚葉遺伝子は発現しなくなり、これらの遺伝子は LMC の起きる時期を早くする作用があることが分かった。またこれら 5 つの遺伝子の発現部位を調べると Xoct-91、eIF5、X-box binding protein、Xgadd45-gamma は初期原腸胚期中胚葉領域で発現していた。

本研究によって LMC がアニマルキャップ、*in vivo* ともに起きその時期は Notch シグナルにより調節されていること、また LMC は Psmad2C が smad4 と結合できなくなり、複合体が核に移行できなくなるため中胚葉遺伝子の転写が起きなくなることが原因で起きていることが明らかとなった。時間的・空間的発現パターン、機能解析の結果から Notch シグナ

ルの下流で働き LMC の時期を調節している可能性のある 6 つの候補遺伝子が特定された。これら遺伝子のどれか、または幾つかが協調的に働き正常発生の過程で LMC の時期を調節していることが予想される。中胚葉誘導の起こる時間は厳密に調節されており、理解が進んでいる中胚葉誘導開始のメカニズムに加え、中胚葉誘導を終了させる LMC の解析が複雑に制御されている体制プラン形成の解明につながることを期待される。