

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

#### Functional analysis of ADAMTS1, a modulator of FGF signaling in early *Xenopus* embryogenesis

(アフリカツメガエル初期発生における FGF シグナル調節因子、ADAMTS1 の機能解析)

氏名 須賀 晶子

脊椎動物の発生において、分泌性の因子によって活性化されるシグナルが細胞運命の決定、パターン形成、細胞運動などに重要な働きをしている。初期発生における誘導シグナルの中心として知られるシュペーマン・オーガナイザーは TGF- $\beta$ スーパーファミリーの一つである Nodal と Wnt によって誘導され、次いでオーガナイザーから分泌される因子が BMP 及び Wnt と拮抗することによって中胚葉の背側化、外胚葉の神経化、前後のパターン形成が行われる。これらの組織分化には、オーガナイザーを含むより広い領域で発現している分泌性因子も関わっており、例えば FGF シグナルは中胚葉誘導、原腸形成運動、神経化、前後のパターン形成に、レチノイン酸は前後のパターン形成とニューロン分化に重要なことがこれまでの研究で示されている。これらの誘導シグナルの多くは細胞外に分泌されたリガンドが細胞膜貫通型の受容体と結合し、細胞内シグナル伝達を介して遺伝子の発現を活性化又は抑制する。そしてさらに近年の研究で、このシグナル伝達経路は細胞膜及び細胞内の様々な位置で正または負に調節されていることが明らかになってきた。私は、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) のオーガナイザー特異的転写活性化因子 Xlim-1 によって発現が上昇する因子として同定された分泌型のメタロプロテアーゼ、*Xenopus* ADAMTS1 (XADAMTS1) に注目し、初期発生における細胞外因子の役割とその作用機序を明らかにする目的で研究を行った。

ヒト及びマウスでは、ADAMTS (A Disintegrin and Metalloprotease with thrombospondin motifs) ファミリー遺伝子はゲノム中に 19 個存在することが報告されている。XADAMTS1 は全長が 928 アミノ酸残基からなり、哺乳類の ADAMTS1 と同様に、シグナルペプチド (SP)、プロドメイン、メタロプロテアーゼドメイン (MP)、ディスインテグリンドメイン (D)、システインに富む領域 (CR)、スパーサー領域 (SR)、そして 3 つのトロンボスポンジン 1 型リピート (TSP) を持つ (図 1、WT)。プロドメインを除いた成熟型 XADAMTS1 のマウスに対するアミノ酸レベルでの一致率は 79.5% である。ニシツメガエル (*Xenopus tropicalis*) のゲノムデータベースからは、哺乳類と同じく 19 個の ADAMTS 遺伝子がゲノム中に見出された。ホヤやショウジョウバエからも ADAMTS 遺伝子のオーソログが報告されており、これらの結果は XADAMTS1 が進化的に保存された役割を持つことを予想させる。アフリカツメガエルは偽 4 倍体と考えられているため、私は偽対立遺伝子 XADAMTS1b を公開 EST データベースから検索し、第一エクソンを含む部分的な cDNA クローン (XL180c03) を同定した。XADAMTS1 と XL180c03 との一致率は DNA レベルで 91.1% であり、アミノ酸配列を基に系統樹を作製した結果、アフリカツメガエルの系統で倍加したと考えられた。

ADAMTS1 遺伝子の脊椎動物初期胚における発現領域は、特に原腸形成前後については解析されていないことから、まず XADAMTS1 の初期胚における発現パターンを全胚 in situ ハイブリダイゼーションで検討した。XADAMTS1 mRNA は後期胞胚期から外胚葉で発現を開始し、原腸胚期にはオーガナイザー領域と背側の外胚葉で強く発現していた。原腸胚期から神経胚期にかけては後方のオーガナイザー領域と外胚葉で発現が見られた。尾芽胚期には鰓弓、神経管の一部、真皮節で発現が見られたが、尾芽胚後期には脊索と、マウスで報告されている発現箇所に対応して前腎、心臓原基にも発現していた。

XADAMTS1 の初期胚における機能と活性に必要な領域を調べるために、アフリカツメガエル胚を用いた mRNA 微量注入実験を行った (図 1)。野生型 XADAMTS1 を頭部領域に過剰発現させると前方外胚葉組織であるセメント腺が横に拡大し、また背側帯域に過剰発現させると背側に反り返った胚となり原腸形成が阻害されたと考えられた。これらの表現型をもたらす活性に必要な機能ドメインを決定するために、欠失型コンストラクトを作製して同様の実験を行った結果、予想に反して、プロテアーゼドメインは活性に必要ではなく、C 末側の CR、SR、TSP が活性に必要かつ十分であった。原腸形成阻害胚では中胚葉性組織である脊索の形成が阻害されていたため、XADAMTS1 が中胚葉分化に影響している可能性を考え中胚葉マーカー *Xbra* の発現を調べたところ、XADAMTS1 過剰発現領域で *Xbra* の発現は著しく阻害され、またこの活性には原腸形成阻害と同じく C 末の CR、SR、TSP が十分であった。これまでの報告から、*Xbra* の発現には Nodal/activin、FGF、Wnt シ

グナルが各々必要なことが示されている。私はこのうち Nodal/activin と FGF シグナルに対して XADAMTS1 が阻害的に作用するか否かをアニマルキャップ・アッセイで検討した。activin 又は FGF 処理によって誘導される遺伝子の発現を real-time RT-PCR により検出した結果、XADAMTS1 は FGF シグナル特異的に阻害することが示された。さらに、FGF シグナルの下流である Ras/MAPK シグナル伝達経路に含まれる ERK (MAPK) のリン酸化を調べた結果、XADAMTS1 による阻害は Ras より下流ではないことが示された。原腸形成阻害活性には XADAMTS1 のシグナルペプチドが必要であり、タグ付き XADAMTS1 タンパク質が細胞膜に沿って局在していた事、またマウス ADAMTS1 タンパク質は細胞外マトリクスに存在するとの報告があることから、XADAMTS1 は細胞膜の外側で FGF シグナルを阻害していると推測された。

XADAMTS1 が細胞外でどのように FGF シグナル伝達に作用するかを検討するため、FGF リガンドと受容体の複合体形成に必須の因子である細胞外基質のヘパラン硫酸との相互作用について、in vitro でのヘパリンビーズを用いた結合実験を行った。その結果、XADAMTS1 の全長および C 末側領域はヘパリンと結合するが、メタロプロテアーゼドメインを含む N 末側は結合しない事が示された。しかし XADAMTS1 は FGF2 ほど強くヘパリンと結合しなかったことより、FGF とヘパラン硫酸に対して競合するのではなく、ヘパラン硫酸/FGF /FGFR 複合体との何らかの相互作用により FGF シグナルを阻害するのではないかと考えられる。

これまでの結果で示された XADAMTS1 による FGF シグナルの阻害が生体内での役割を反映しているかどうかを検討するために、アンチセンス・モルフォリーノオリゴ (MO) を用いた RNA のスプライシング阻害による機能阻害実験を行った。XADAMTS1a, XADAMTS1b 両遺伝子に対し MO を設計し (MOab)、ツメガエル胚に微量注入した。陰性コントロールには5カ所に変異を導入した 5mmMO を用いた。XADAMTS1 の発現は発生とともに動物局側外胚葉から後方の中胚葉・外胚葉と変化するため、まずアニマルキャップ・アッセイにより外胚葉の XADAMTS1 を阻害した場合の FGF シグナルに対する反応性を検討した。その結果、MOab の注入により FGF2 で誘導される中胚葉マーカー *Xbra* の発現量は 2.5 倍に増強され、ここに微量の XADAMTS1 mRNA を加えることで *Xbra* の発現は 5mmMO を注入した場合と同程度まで減少した。この結果から生体内で XADAMTS1 が FGF による中胚葉誘導、神経化、後方化、神経冠形成等を調節する可能性が示唆された。

次いで胚発生に対する影響を全胚で検討したところ、胞胚期の外胚葉に MOab を作用させると頭部の小さい胚が得られ、FGF による後方化作用が亢進したと予想された。胞胚期の外胚葉には FGF2 と FGF8 が発現しており、これらの結果から XADAMTS1 が FGF シグナルの抑制を介して後方化作用を調節する可能性が考えられた (図 2 左)。原腸胚期の

XADAMTS1 の発現は帯域における FGF8 と FGF4 の発現と重なっている。そこでこの領域での XADAMTS1 の役割を調べるために帯域に MOab を作用させたところ、中胚葉組織の分化にはあまり影響が見られなかったが、神経胚初期に神経冠のマーカである *Slug* の発現が抑制され、逆に神経組織マーカーである *Sox2* の発現が拡大した。このことは、XADAMTS1 の機能低下により FGF シグナルが増大することで神経組織が拡大し、その結果神経冠が減少したと解釈される (図 2 右)。しかし FGF8 は神経冠の誘導に必要であるという報告もあり、XADAMTS1 が FGF8 を抑制するという仮説と矛盾するが、この点に関しては今後の課題である。

本研究では ADAMTS1 遺伝子の初期胚における発現パターンを明らかにし、C 末側のドメインに FGF シグナルの抑制活性があることを示した。また機能阻害実験によって、初期胚で発現している XADAMTS1 が頭部の形成と神経冠細胞の形成に必要であることが示唆された。細胞外に分泌される因子による FGF シグナルの制御はこれまで報告がなく、本研究は ADAMTS1 遺伝子の初期発生に関わる機能を示すと共に分化誘導シグナルの制御について新たな知見を加えるものと考えている。

