

論文審査の結果の要旨

氏名 須賀 晶子

本論文は、一部構成で要旨、序論、方法、結果、考察、文献、図表から成っており、アフリカツメガエル胚の初期発生における分泌型のメタロプロテアーゼの ADAMTS1 の機能解析結果について述べられている。

動物の胚発生の過程には数多くの遺伝子が関与すると考えられているが、それぞれがどのように機能と役割をもつかの知見は未だ十分ではない。脊椎動物の発生における組織の誘導と分化には様々な分泌性の因子が関わっており、例えば TGF- β スーパーファミリーの Nodal と Wnt によるシュペーマン・オーガナイザーの誘導、BMP 阻害因子及び Wnt による中胚葉の背側化、外胚葉の神経化と前後のパターン形成、FGF による中胚葉誘導、原腸形成運動、神経化と前後のパターン形成などが報告されている。細胞外に分泌されたりガンドは多くの場合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が、近年の研究で、正常発生には細胞内外でのシグナル伝達の調節が重要なことが示唆されてきた。本研究では、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メタロプロテアーゼ、*Xenopus* ADAMTS1 (XADAMTS1) の機能解析を行った。その結果、XADAMTS1 が FGF の負の制御因子として働くことを初期胚においては初めて示し、またこの活性には XADAMTS1 のプロテアーゼドメインでは必要なく C 末側の領域が必要十分であることを示した。さらに機能喪失実験を行い、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。

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)、スペーサー領域 (SR)、そして 3 つのトロンボスポンジン 1 型リピート (TSR) を持つ。本研究ではまずゲノムデータベースから近縁種のニシツメガエルの *ADAMTS* オースログがほ乳類と同数の 19 個存在することを示し、ADAMTS1 の進化的保存性が示唆された。また公開 EST データベースからのアフリカツメガエルの偽対立遺伝子 *ADAMTS1b* を同定した。次に *ADAMTS1* 遺伝子の原腸形成前後における遺伝子発現領域を知るためにアフリカツメガエル初期胚を用いた全胚 in situ ハイブリダイゼーションを行い、*XADAMTS1* mRNA が後期胞胚期から外胚葉領域で発現

を開始した後、原腸胚期から神経胚期にかけてオーガナイザー領域と背側外胚葉で強く発現することを見出した。この結果より、ADAMTS1 が、形態形成の中心となるオーガナイザーで機能する可能性が初めて示唆された。

次に XADAMTS1 の初期胚における機能と活性に必要な領域を mRNA 微量注入実験によって検討した。野生型 XADAMTS1 は頭部領域で前方外胚葉組織であるセメント腺を横に拡大させ、また背側帯域では XADAMTS1 過剰発現領域で中胚葉由来組織の形成と中胚葉マーカー遺伝子 Xbra の発現が著しく阻害された。しかし予想外なことに、これらの活性にはプロテアーゼドメインは必要ではなく、C 末の CR、SR、TSR 領域が十分であった。C 末側領域のみの活性はこれまでに培養細胞や生化学的実験で示されていたが、初期胚内で示したのは本研究が初めてである。さらにアニマルキャップ・アッセイにより遺伝子発現と Ras/MAPK シグナル伝達経路因子 ERK1/2 のリン酸化状態の変化を検討し、XADAMTS1 が Xbra の発現に必要な activin 又は FGF のうち、FGF シグナルを阻害することが示された。XADAMTS1 による FGF シグナル阻害の作用機序は、本研究では明確には示されなかったが、*in vitro* で XADAMTS1 の全長および C 末側領域がヘパリンと結合することが示されたため、XADAMTS1 は細胞外基質のヘパラン硫酸との結合を介して FGF シグナル伝達に作用すると予想された。

最後にアンチセンス・モルフォリーノオリゴを用いた翻訳抑制による XADAMTS1 の機能喪失実験を行った。アニマルキャップを用いた実験では、XADAMTS1 は胎胚期の外胚葉で FGF シグナルを抑制していることが示された。この結果は初期胚における FGF シグナルの活性として知られる中胚葉化、神経化、後方化、神経冠形成などに対する XADAMTS1 の調節作用を示唆している。一方、全胚を用いた解析では、XADAMTS1 は神経冠細胞の形成に必要なことが示された。これらの結果からは、FGF シグナルが関わる初期発生過程の中で主として神経冠形成に XADAMTS1 が関わっていると考えられる。なお神経冠の誘導には FGF8 や本研究で検討されていない Wnt シグナルの関与も知られており、それらと XADAMTS1 との関わりについては今後の課題として残された。

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、本研究は脊椎動物の初期発生に関わる ADAMTS1 遺伝子の機能を示すと共に、分化誘導に関わる FGF シグナルの制御について新たな知見を加えるものといえる。

なお、印刷公表した論文中の XADAMTS1 のクローニングと塩基配列決定は共著者の日笠弘基によるものであが、本論文に記載されている解析は全て論文提出者が主体となって分析および検証を行ったもので、論文提出者の寄与が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。