

# 論文の内容の要旨

論文題目

## **Molecular analysis of *nodal*-related gene, *Xtnr3*, in *Xenopus* development**

(ツメガエル初期発生における *nodal* 関連遺伝子 *Xtnr3* の分子生物学的解析)

原本 悦和

### 背景と目的

*nodal* およびその関連遺伝子は TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する分泌性タンパク質をコードし、中内胚葉形成、左右軸形成、前後軸形成に関与するなど初期発生において重要な役割を担っていることが知られている。両生類モデル生物である *Xenopus laevis* (*X. laevis*) では *Xnr1* から *Xnr6* まで6種類の *nodal* 関連遺伝子が報告されている。*Xnr3* は TGF- $\beta$ スーパーファミリー間で保存されている7つのシステイン残基のうち C 末端側の残基を欠損しており、構造的に興味深い特徴を有している。このようなタイプの *nodal* 関連遺伝子は他の生物では知られていない。*Xnr3* はツメガエル初期胚のオーガナイザー領域に限局して発現する。*Xnr3* はオーガナイザー領域特異的に発現する多くの遺伝子にみられるように BMP シグナル阻害活性を有し、神経誘導能を示すことが知られているが、そのメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。また、Nodal 関連因子の **mature region** はアクチビンレセプターを介して細胞内シグナル伝達因子 Smad2/3 を活性化し、中内胚葉を誘導することが知られているが、*Xnr3* の **mature region** はこの経路を活性化できず、その作用機序も依然として不明である。

*Xenopus tropicalis* (*X. tropicalis*) は *Xenopus* 属で唯一、二倍体ゲノムをもつ生物であり、世代交代時間が比較的短いなどの特徴から偽四倍体である *X. laevis* では不可能であった遺伝学的解析が可能なモデル生物として注目を集めている。本研究では *X. tropicalis*

をもちいて *Xnr3* の相同遺伝子をクローニングし、この特異的な *nodal* 関連遺伝子の機能メカニズムを明らかにしたい。

## 結果と考察

### 1. *Xtnr3* のクローニングと機能解析

*X. tropicalis* の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、*Xnr3* の相同遺伝子 *Xtnr3* を 3 種類単離した。*Xnr3* がもつ特徴はこれらすべてのクローンにおいて保存されており、発現パターン、活性ともに *Xnr3* と同様であった。ゲノミックサザンハイブリダイゼーション法、およびゲノミック PCR による解析の結果、*Xtnr3* が *X. tropicalis* のゲノム中で遺伝子重複していることがわかった。これは *Xtnr3* の解析を進める上で、二倍体ゲノムをもつ *X. tropicalis* の利点を十分に活かすことができないことを意味している。

TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属するタンパク質は不活性な前駆体タンパク質として合成され、ダイマーを形成し、切断部位で切断され活性化することが知られている。ダイマーはリガンドとして働く mature region に存在するシステイン残基を介して形成される。切断された pro-region が mature region の活性や拡散性を調節していることは知られているが、pro-region 独自の働きについてはこれまで報告されていない。

全長を含む *Xtnr3* を胚の腹側帯域で過剰発現させると、頭部欠損と突起の形成に加え二次軸が誘導される。*Xnr3* は BMP シグナル阻害活性をもつことが知られており、腹側で BMP シグナルを阻害すると二次軸が誘導されることからこの結果は妥当なものといえる。今回、*Xtnr3* をスクリーニングする過程で *Xtnr3* の pro-region の一部をコードする部分配列を得た。この部分配列および *Xnr3* の pro-region が二次軸誘導能をもち、BMP シグナル阻害活性を示したことから、*nodal* 関連遺伝子の pro-region が独自の機能として BMP シグナル阻害活性を持っていることがはじめて明らかになった。免疫沈降法の結果から、*Xtnr3* の pro-region が BMP の mature region に結合してそのシグナルを阻害していると考えられる。

### 2. *Xtnr3* による BMP 阻害メカニズムの解析

これまでに報告されているマウス *Nodal* と BMP の阻害関係は、以下の 3 つに大別することができる。

- ①それぞれの mature region が活性化するシグナルを介した下流遺伝子による制御
- ②双方のシグナル伝達に必要な Smad4 をめぐる競合
- ③タンパク質同士の結合による阻害

*Xtnr3* は Smad シグナルを活性化できないことから、*Xtnr3* による BMP シグナルの阻

害は①または③の様式で行われていると考えられる。pro-region を欠損させ、シグナルペプチドと mature region をコードするコンストラクトを作製し、過剰発現したところ、このコンストラクトは野生型とよく似た表現型を示す一方、BMP シグナルを阻害できないことが分かった。このことから、Xtnr3 の mature region を介したシグナルは BMP シグナルの阻害には寄与していないことが示された。従って Xtnr3 による BMP シグナルの阻害はタンパク質同士の結合（様式③）によるものと考えられる。タンパク質同士の結合による阻害としては、マウス Nodal と BMP のヘテロダイマー形成が相互のシグナルに対して阻害的に働くことが報告されている。また、本研究において Xnr3 および Xtnr3 の pro-region が BMP の mature region に結合して阻害することを明らかにした。免疫沈降法により検証した結果、Xnr5 は BMP とヘテロダイマーを形成するが、Xtnr3 は BMP とヘテロダイマーを形成しないことが明らかになった。つまり、Xtnr3 による BMP 阻害活性は pro-region によって担われているといえる。

BMP 阻害活性を示す領域を明らかにするため、様々な欠損変異体コンストラクトを作製し検証した結果、pro-region の N 末端領域と C 末端領域に BMP 阻害領域が独立して存在していることが明らかになった。Xtnr3 はこれらの領域で BMP と相互作用することで BMP シグナルを阻害していると考えられる。

### 3. Xtnr3 mature region の特性について

全長を含む Xtnr3 を過剰発現させると、頭部欠損と突起の形成が引き起こされる。この表現型は BMP 阻害活性によらないと考えられている。Xnr3 は中胚葉マーカーである *Xenopus brachyury* (*Xbra*) の発現を活性化するという報告があり、*Xbra* の異所的な過剰発現は突起の形成を引き起こすことが知られている。Xtnr3 の mature region をコードし pro-region を欠損したコンストラクトでも同様の活性が得られることから、この活性は mature region によって担われているといえる。

Nodal 関連因子は、前駆体タンパク質から pro-region が切断され、mature region がダイマーを形成して活性化する。タンパク切断を受けないように認識配列を改変したコンストラクトを過剰発現すると、不活性なダイマー形成が促進され、ドミナントネガティブ変異体として機能することが知られている。Xtnr3 の切断変異コンストラクトを作製し過剰発現すると、活性が少し弱くなるものの野生型と同様の表現型を示した。Xtnr3 の切断変異コンストラクトはドミナントネガティブ変異体として機能していないと考えられる。ドミナントネガティブ変異体の作用機序から考えて、Xtnr3 はホモダイマーを形成していないのではないかと仮説を立て、その検証を行った。免疫沈降法による解析と、還元状態、非還元状態でのウェスタンブロット解析の結果から、Xtnr3 の

mature region はホモダイマーを形成せず、モノマーで存在している可能性が示唆された。TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する因子のなかで、モノマーで機能しているものの存在は知られているが、それらはいずれもダイマー形成に関わる4番目のシステイン残基を欠損している。Xtnr3 は4番目のシステイン残基を保持しており、Xtnr3 の mature region がモノマーで機能しているとは考えられていなかった。Xtnr3 と他の Nodal 関連因子の違いとして最もよく知られているのは、7番目のシステイン残基を欠損していることである。しかし、Xtnr3 に7番目のシステイン残基を導入してもダイマー形成しないことから、それ以外の要因があると考えられる。Xtnr3 と他の TGF- $\beta$ スーパーファミリーの配列を詳細に調べた結果、Xtnr3 および Xnr3 はファミリー間で高度に保存されているグリシン残基とダイマー形成に重要と考えられる $\alpha$ -helix を欠損していることがわかった。Xtnr3 と Xnr5 のキメラコンストラクトを作製し、ダイマー形成能を調べた結果、Xtnr3 に7番目のシステイン残基、保存されたグリシン残基、 $\alpha$ -helix 領域すべてを導入したコンストラクトのみが効率よくダイマーを形成することがわかった。これら3つの要素を欠損していることが、モノマーで働くという特異な性質を規定していると考えられる。

以上より、Xtnr3 pro-region は BMP シグナルの阻害に、mature region は *Xbra* の活性化に関与していることが示された。また、Xtnr3 の mature region は他の *nodal* 関連遺伝子と異なりモノマーで働いていることが明らかになった。