

## 論文の内容の要旨

論文題目 Functional analysis of novel gene *BENI* in the gastrulation of *Xenopus* embryo

ツメガエル胚における原腸陥入運動に関わる新規遺伝子 *BENI* の機能解析

氏 名 本間 幹啓

アクチビンは TGF- $\beta$  スーパーファミリーに属する蛋白質であり、アフリカツメガエルの胞胚期アニマルキャップ（未分化細胞塊）に対する中胚葉・内胚葉誘導能があることが知られている。また、アクチビン・ノーダルシグナルは正常発生の初期において中胚葉・内胚葉の形成、原腸陥入や体軸形成において重要な働きを持つことが分かっている。原腸陥入運動の一形態である収斂伸長（convergent extension）を制御する遺伝子メカニズムについては様々な知見がある。その中の一つとして、アクチビン・ノーダルシグナルによって発現が上昇する *Xbra* によって誘導される *Wnt-11* が、Wnt 経路を通じて収斂伸長（convergent extension）を調節することが知られている。

私は、短時間のアクチビン処理によって発現量が変化し、かつ発生の初期で機能している新規遺伝子の探索と、その機能解析を目的として研究を行った。

アフリカツメガエル胞胚よりアニマルキャップを切り出し、アクチビン処理後に RNA を抽出し、これを基にマイクロアレイを用いた解析によってアクチビン初期応答遺伝子を探索した。次に、結果的に見つかった 202 候補のうち新規遺伝子または初期発生における機能が未知である遺伝子に注目して 26 候補を選択し、mRNA あるいはアンチセンス Morpholino oligonucleotide (MO) の微量注入が初期発生に影響を与えるかどうか調べた。その結果、影響を与えると特定できた 14 遺伝子のうち、既知タンパク質との相同性を示さない、Unigene Code Xl.7756 (*Brachyury Expression Nuclear Inhibitor*, *BENI* と命名) について着目し、その初期発生における機能解析を行った。

*BENI* は 674 残基のタンパク質をコードする遺伝子であった。*BENI* アミノ酸配列を BRASTP 検索したところ、*BENI* に相同なアミノ酸配列が近縁種のトロピカリスだけでなく、ヒト、マウス、ラット、ミドリフグにおいて見出された。いずれにおいても、機能に関する報告はなかった。また、ショウジョウバエや酵母では見出されなかった。*BENI* はよく保存された約 60 残基の N 末端領域と、約 20 残基の C 末端領域を持ち、N 末端にも C 末端にも核移行シグナル (NLS) が見られた。*BENI* の時間的発現を RT-PCR によって調べたところ、*BENI* は未受精卵から尾芽胚期 (ステージ 34) まで発現していた。さらに、*BENI* の空間的発現をホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーション (WISH) によって調べたところ、正常発生においては原腸胚 (ステージ 11) から遊泳幼生期 (ステージ 40) を通じて表皮全体に発現することが分かった。

次に、*BENI* mRNA の過剰発現や *BENI*-MO を用いた機能阻害を行い、胚の表現型を観察した。4 細胞期胚の背側動物極側に *BENI* mRNA あるいは *BENI*-MO を微量注入し、その後の胚発生を観察した結果、いずれの場合においても胚の体軸が屈曲する表現型を示した。そこで、*BENI* が原腸陥入運動に関与しているのではないかと考え、初期原腸胚での表現型を観察した。その結果、外見上は胚の原口形成が進み、原腸陥入運動の遅滞は観察されなかったが、切片を作製して観察したところ、原腸陥入運動の進行に従って薄くなる

べき帯域の表皮層が肥厚したままであることが分かった。さらに、4細胞期胚の腹側動物極側に *BENI* mRNA を微量注入し、初期原腸胚を輪切りにして観察したところ、腹側帯域の表皮層もまた肥厚したままであった。これらの結果は *BENI* が原腸陥入運動の一つである垂直挿入 (radial intercalation) に関与していることを示唆している。さらに、中間側方挿入 (Medio-lateral intercalation) に関与しているかどうかを調べるために、アクチビン処理したアニマルキャップが伸長運動を示す系を用いた実験 (アニマルキャップアッセイ) を行った。その結果、*BENI* mRNA を微量注入したアニマルキャップは伸長運動の阻害を受けた。一方で、*BENI-MO* を微量注入したアニマルキャップは伸長運動が亢進した。これらの結果は *BENI* が中間側方挿入 (Medio-lateral intercalation) に関与していることを示唆している。

汎中胚葉マーカー *Xbrachyury* (*Xbra*) を過剰発現すると *BENI-MO* と同じようにアニマルキャップの伸長運動が亢進することが報告されている。そこで、*Xbra* を含む初期中胚葉遺伝子の発現に対して *BENI* が与える影響を RT-PCR で調べたところ、*BENI* mRNA の過剰発現によって中内胚葉マーカー *Mix. 1*、背側中胚葉マーカー *gooseoid*、*chordin* の発現は変化しなかったが、*Xbra* の発現は抑制された。そこで、*in vivo* で *BENI* が *Xbra* の発現調節に関与しているかどうかを調べるため、mRNA あるいは *BENI-MO* を微量注入した胚を用いて *Xbra* について WISH を行った。その結果、*BENI* mRNA を微量注入した領域で *Xbra* の発現は消失した。一方、*BENI-MO* を微量注入した胚では *Xbra* の発現に変化は見られなかった。さらに、*BENI* と *Xbra* の原口背唇部における空間的発現を調べた。具体的には、WISH した胚を切片にして観察した。その結果、表皮ではいずれの遺伝子も弱く発現することが分かった。

次に、*BENI* が *Xbra* の発現を抑制するメカニズムを解明する目的で、*BENI* が核移行シグナルを持つことに着目した。そこで *BENI* と蛍光タンパク質 EGFP との融合タンパク質 (*BENI-EGFP*) をコードする遺伝子を作成し、さらに、核移行シグナルを欠失するコンストラクトを作製した。これらの mRNA を合成し、マイクロ

インジェクションして細胞内での局在を観察したところ、BENI-EGFP および N 末端の核移行シグナルを欠失した BENI- $\Delta$ N-NLS-EGFP は核に局在した。一方で、C 末端の核移行シグナルを欠失した BENI- $\Delta$ C-NLS-EGFP および N 末端 C 末端両方の核移行シグナルを欠失した BENI- $\Delta$ NLS-EGFP は、細胞全体に局在した。このことは、BENI の核移行には主に C 末端側の核移行シグナルが関与していることを示唆している。また、それぞれの mRNA を 4 細胞期胚の背側動物極側に微量注入し、胚の表現型を観察した。その結果、*BENI-EGFP* mRNA および *BENI- $\Delta$ N-NLS-EGFP* mRNA 注入胚は体軸が屈曲する表現型を示したのに対し、*BENI- $\Delta$ C-NLS-EGFP* mRNA および *BENI- $\Delta$ NLS-EGFP* mRNA 注入胚は正常な表現型を示した。このことは、細胞内局在との結果とよく一致している。従って核移行することが、BENI の正常な機能のために必須であることが示唆された。

本研究により、私は新規アクチビン応答因子である *BENI* の同定に成功した。さらに *BENI* が汎中胚葉マーカー *Xbra* の発現を抑えること、そして原腸陥入運動における収斂伸長 (convergent extension) に関与することを明らかにした。また、BENI は主に C 末端側の核移行シグナルによって核移行することで機能することを示した。これらの結果は *BENI* による *Xbra* の発現調節が、正常な原腸陥入運動の制御において重要な役割を持っていることを強く示唆している。