

論文の内容の要旨

論文題目

Functional analysis of *XTSC-22* gene in *Xenopus laevis* development.

(ツメガエルの初期発生における *XTSC-22* 遺伝子の機能解析)

氏名 橋口晶子

多細胞生物の発生過程では単一の受精卵が細胞分裂を繰り返して多数の細胞からなる個体が作られる。この過程では細胞分裂と細胞の運命決定、形態形成運動およびアポトーシスなどが複雑に制御されることが必要である。アフリカツメガエル *Xenopus laevis* においては初期の卵割（第2卵割-第12卵割）は同調しており、分裂周期はG期を含まない。St. 9以後、G期が現れるとともに形態形成運動が見られるようになる。近年、形態形成に関して細胞分裂の制御が重要な役割を果たすことが知られるようになってきた。例えば最初の大規模な形態形成運動である原腸陥入では、陥入していく中胚葉において特定の時期に局所的に細胞分裂が抑制される。この細胞分裂の抑制が阻害されると細胞の移動に影響が生じる。例としては St. 9 の bottle cells や St. 12-13 の中軸中胚葉があげられ、この領域での細胞分裂の抑制は TGF- β シグナルに依存すると考えられている。このように、分裂停止-形態形成という系は原腸陥入の各局面で用いられている。しかしながら、原腸陥入の主要な推進力の一つである St. 10 の外胚葉においては、この領域特異的に細胞分裂を抑制して細胞の移動を促進するような因子は知られていない。そこで私は、Transforming growth factor- β 1 stimulated clone 22 (*TSC-22*) に着目した。*TSC-22* はマウス骨芽細胞において TGF- β 1 応答性の因子として同定された遺伝子であり、哺乳類ではがん抑制因子として知られている。*TSC-22* はショウジョウバエの発生において複数の成長因子に応答し、各成長因子が誘導する発生運命の境界を決定することが調べられているが、細胞分裂抑制能に注目した研究は少ない。興味深いことに、*TSC-22* はマウスの発生過程では受精後 6.5 日という

初期において外胚葉に発現することが分かっている。

本研究では、初期発生における細胞分裂と形態形成との関係について知見を得る目的で Transforming growth factor- β 1 stimulated clone 22 (TSC-22) のアフリカツメガエルにおけるホモログ (XTSC-22) を単離し、機能解析を行った。はじめにツメガエルの初期発生での発現パターンを調べた。この因子は原腸陥入の起こる時期 (St. 9) に発現を開始し、その際外胚葉において局所的な発現を示した。モルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を用いて XTSC-22 の機能阻害を行った結果、XTSC-22 機能阻害胚では原腸陥入の際の原口の閉鎖に顕著な遅延が認められた。XTSC-22 がこの時期の外胚葉に発現していることから外胚葉細胞の運動について調べたところ、外胚葉細胞の原口への運動が乱されていることが示された。しかし、whole-mount *in situ* hybridization や RT-PCR では、*Xbra* や *chordin* といった中胚葉のマーカ遺伝子の発現に変化は認められなかった。このことから XTSC-22 機能阻害胚における陥入の遅延は中胚葉誘導に阻害に起因するものではないことが示された。ツメガエルでは未分化状態の予定外胚葉 (アニマルキャップ) を切り出してアクチビン処理を行うと、中胚葉組織を分化誘導して伸長する。XTSC-22 機能阻害胚でのこの運動の様子を調べたが、影響は見られなかった。哺乳類の TSC-22 はがん抑制因子として知られている。一方ツメガエルの初期発生では、細胞分裂の制御が形態形成における細胞の移動に重要な役割を果たしていることがわかっている。そこで XTSC-22 機能阻害胚における陥入の遅延が細胞分裂の異常によるものであるか否かを、抗リン酸化ヒストン H3 抗体 (分裂マーカー) を用いた免疫染色によって調べた。その結果、XTSC-22 機能阻害胚においては細胞分裂が亢進していた。一方、XTSC-22 をわずかに過剰発現した胚では細胞分裂が抑制されていた。このことから XTSC-22 には細胞分裂抑制能があることがわかった。さらに XTSC-22 機能阻害による細胞分裂の亢進を、*p27Xic1* の過剰発現によって抑制することを試みた。*p27Xic1* はアフリカツメガエルにおける主要な細胞分裂抑制因子である。*p27Xic1* を導入したところ、XTSC-22 機能阻害によって引き起こされた原腸陥入の遅延は見られなくなった。この際、外胚葉細胞の原口へと向かう運動も正常に近い状態になっていた。以上の結果から、XTSC-22 は原腸陥入の際に外胚葉に特異的に発現して当該領域の細胞分裂を制御することで原腸陥入運動を調節していると考えられた。ツメガエル胚では、移動する細胞群に特異的に発現してその領域の細胞分裂を抑制することを通じて形態形成を調節する因子が存在する。本研究の結果は、そのような調節機構のうち最初期のものとして XTSC-22 の存在を明らかにしたと考えている。

哺乳類の TSC-22 は転写因子として働き、細胞分裂抑制因子である *p21* の発現を上昇させることで細胞分裂を停止させることが分かっている。そこでツメガエルで XTSC-22 が細胞分裂を抑制する機構も同様のものであるかを調べるために、XTSC-22 機能阻害胚を用いて

RT-PCR による検討を行った。検討の結果、ツメガエルにおける p21 ファミリーの因子である p16Xic1、p17Xic2 および p27Xic1 の発現には変化は見られず、XTSC-22 による分裂阻害の機構は哺乳類の場合とは異なっているということが示唆された。そのため XTSC-22 の作用機序に関する知見を得る目的で、XTSC-22 の欠失変異体を作成して解析を行った。各欠失変異体の細胞分裂抑制能を調べたところ、TSC-box と呼ばれる領域を書いた変異体では細胞分裂を抑制する能力が弱いことが示された。これらの変異体の細胞内局在を調べた結果、XTSC-22 全長や多くの欠失変異体は核に局在していたのに対して、TSC-box を持たない変異体は核および細胞質で検出された。また TSC-box のみからなる変異体は、細胞分裂を抑制する能力があることおよび核存在することがわかった。このことから、TSC box と呼ばれる領域が XTSC-22 の核局在に必要であり、これによって分裂が抑制されると考えられた。これを確認するために、TSC-box を含み核局在する変異体または TSC-box を含まず核局在しない含まない変異体に、それぞれ核外輸送シグナル (NES) または核移行シグナル (NLS) を付加して、このときの細胞分裂抑制能および細胞内局在を調べた。その結果、TSC-box が核に存在しない場合には細胞分裂が抑制されないことが示された。TSC-box は、TSC-22 をはじめとする TSC ファミリーに属する分子群で高度に保存されている領域であり、ファミリー因子である *GILZ* では他の調節因子 (AP-1、Raf-1、NF- κ B) と結合する可能性が示唆されている領域である。したがって XTSC-22 もこの領域を介して何らかの因子と相互作用している可能性が考えられた。一方過剰発現実験の結果は、XTSC-22 には単独で細胞分裂を休止させる活性はないことを示唆した。すなわち XTSC-22 を過剰発現しても、St. 9 以前には影響は現れず、St. 9 以降になってはじめて細胞分裂に異常が生じた。St. 9 以前の分裂周期は S 期と M 期だけから構成されている。一方、St. 9 以降の周期は G 期を含む通常の分裂周期である。細胞分裂抑制因子 p27Xic1 は St. 9 以前に細胞分裂を停止させることができるが、これは p27Xic1 が分裂周期に G 期を導入することによる。このことから、XTSC-22 の細胞分裂抑制能は分裂周期へ G 期を挿入するものではなく、G 期を延長することによると考えられた。ここまでの結果から、XTSC-22 が細胞分裂を制御する因子と相互作用してその因子の働きを助けるのではないかと考え、XTSC-22 と結合する因子の候補を発現パターンなどから選定して相互作用を調べた。免疫共沈降を行った結果から、XTSC-22 は分裂抑制因子 p27Xic1 と相互作用する可能性が示された。このとき p27Xic1 の近縁分子である p16Xic2 とのあいだには相互作用は見出せなかった。p27Xic1 は細胞増殖抑制シグナルに反応して核内へと移動し、そこで cyclin/cdk 複合体の働きを阻害する。p27Xic1 の調節は主として翻訳後調節によっており、核内での役割を終えた p27Xic1 はリン酸化やユビキチン化を受けて核外へと輸送されて分解される。XTSC-22 が細胞分裂を抑制する際には核への局在が重要であり、またこの因子が p27Xic1 と相互作用することから、XTSC-22 は p27Xic1 と結合して

p27Xic1 と共に核内へと移動し、そこで p27Xic1 の細胞分裂抑制能を強めるのではないかと考えられた。

本研究では XTSC-22 は原腸陥入の際に外胚葉特異的に発現して細胞分裂を抑制することで原腸陥入を調節していることを明らかにした。また、XTSC-22 による細胞分裂の抑制には TSC-box と呼ばれる領域が核局在することが必要であることを示した。さらに、このとき p27Xic1 が関与している可能性を示した。