

論文内容の要旨

論文題目

Molecular analysis of *bowline* gene in *Xenopus* somitogenesis

(ツメガエル体節形成における *bowline* 遺伝子の分子生物学的解析)

氏名 常陸圭介

体節は脊椎動物の発生初期に形成される分節構造である。体節の形成過程はきわめてダイナミックであり、体節は未分節中胚葉 (PSM) の前端から一定幅で一つずつ順番にくびれ切れる (分節する) ことで形成される。体節の分節構造は血管系、骨格筋、末梢神経系など将来分節構造を示す器官の基礎となる構造であるため、体節の分節構造の形成に異常が生じた場合、Spondylocostal Dysostosis (脊椎肋骨異形成症) 等の疾病が引き起こされると考えられている。将来の体節の分節位置は、PSM の前端で縞状に発現する遺伝子群によりあらかじめ規定されることが知られている。分節位置決定に関わる遺伝子群は体節の分節直前にその発現が誘導され、体節の分節終了後にその発現が抑制される。しかしながら、これらの遺伝子群の発現がどのような分子機構により適切なタイミングで抑制されるのかは明らかとされていない。

我々の研究室では、これまでに体節の分節直前に PSM の前端で縞状に発現する新規遺伝子 *bowline* をアフリカツメガエル胚から単離した。Bowline は、転写共役抑制因子 Groucho/TLE と相互作用することが知られている WRPW ドメインを持つ153アミノ酸からなるタンパク質である。Bowline 遺伝子の機能をモルフォリノアンチセンスオリゴにより阻害すると、体節の分節位置決定に関わることが知られている遺伝子群 (*Thylacine1* 遺伝子等) の発現が正しく終了せず、正常な体節の分節構造が形成されない。そのため、Bowline 因子が分節位置決定に関わる遺伝子群の発現を抑制することが示唆されていた。しかしながら、どのような分子機構で Bowline 因子が体節の分節位置決定に関わる遺伝子群の発現を抑制するかは明らかではない。また、*bowline*

遺伝子をアフリカツメガエル胚に過剰発現させ、*bowline* 遺伝子の発現領域を拡大した場合、体節の分節位置決定に関わる遺伝子群の発現が抑制される。このことから、体節が分節する直前に PSM の前端領域特異的に *bowline* 遺伝子が発現することが、正常な体節の形成に必要であることが示唆されていた。しかしながら、どのような機構により *bowline* 遺伝子の発現が時間空間的に制御されているのかは明らかではない。本研究では第一章において *bowline* 遺伝子の発現を PSM の前端領域特異的に誘導する分子機構 (*bowline* 遺伝子上流解析) の解析を、第二章において Bowline 因子が分節位置決定に関わる遺伝子群の発現を抑制する分子機構 (Bowline 因子の機能解析) の解析を行った。

第一章において、私は *bowline* 遺伝子の発現を制御する機構の解析を行った。先行研究において私は、*bowline* 遺伝子の発現をアフリカツメガエルトランスジェニック胚において再現するためには *bowline* 遺伝子上流領域 (-226bp/+41bp) が必要であることを明らかにしている。そのため、本研究ではまず、*bowline* 遺伝子上流領域 (転写調節領域) 内に存在する転写因子結合配列に注目した。*bowline* 遺伝子の転写調節領域内に存在するベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 因子の結合配列である E-box 配列や、T-box 因子の結合配列である T-box 配列を欠損させてトランスジェニック胚を作成した場合、内在性の *bowline* 遺伝子と同様のレポータ遺伝子の発現を示すトランスジェニック胚の個数が減少した。このことから、転写因子結合配列 (E-box、T-box) が *bowline* 遺伝子の発現に必要であることが示された。さらに、*bowline* 遺伝子の転写調節領域を用いて培養細胞においてプロモーターアッセイを行うことで、私はアフリカツメガエルの PSM 領域に発現している種々の転写因子の中から T-box 因子である Tbx6 と、bHLH 因子である Thylacine1 と E47 が協調的に働き *bowline* 遺伝子の転写を活性化することを明らかにした。次に、アフリカツメガエル胚に、Tbx6、Thylacine1、E47 遺伝子をコードする DNA をそれぞれ微量注入することで、Tbx6、Thylacine1、E47 がアフリカツメガエルの体節形成期においても *bowline* 遺伝子の発現を活性化できることを示した。さらに、Tbx6 因子と Thylacine1 因子が互いに相互作用すること、また、Thylacine1 因子と E47 因子が互いに相互作用することを免疫沈降実験により示した。これらの結果より、アフリカツメガエルの PSM 前方では、Tbx6、Thylacine1、E47 が互いに相互作用し合い協調的に働くことで、*bowline* 遺伝子の発現を調節していることが示唆された。

前述のように *bowline* 遺伝子の機能阻害実験により Bowline 因子が体節の分節位置決定に関わる遺伝子群の発現を抑制していることが示唆されていた。しかしながら、Bowline 因子には既知の DNA 結合ドメインが存在しないため、どのようにして遺伝子発現を抑制しているのかは不明であった。そこで私は、第二章において Bowline 因子により発現が抑制される遺伝子の

転写調節領域を用いることで、Bowline 因子による遺伝子発現抑制機構の解明を目指した。先行研究により、Bowline 因子が *Thylacinel*、*X-Delta-2*、*bowline* 遺伝子自身の発現を抑制することが報告されていたため、私はすでに転写調節領域が単離されている *Thylacinel* 遺伝子に注目した。*Thylacinel* 遺伝子の相同遺伝子であるマウス *Mesp2* 遺伝子の発現は Tbx6 因子と Notch シグナルにより制御されていることがすでに報告されている。そこで私は、*Thylacinel* 遺伝子の発現も *Mesp2* 遺伝子と同様に Tbx6 因子と Notch シグナルにより制御されていると予想し、*Thylacinel* 遺伝子の転写調節領域を用いたプロモーターアッセイを行った。その結果、*Thylacinel* 遺伝子の発現も Tbx6 因子と Notch シグナルにより制御されていることを明らかにした。この *Thylacinel* の転写活性は、Tbx6 因子と Notch シグナルと共に Bowline 因子と転写共役抑制因子 Grg4（アフリカツメガエルにおける Groucho の相同遺伝子）を加えることで大きく減少した。このことから、Bowline 因子が *Thylacinel* 遺伝子の発現を転写レベルで抑制していることが明らかとなった。興味深いことに、Bowline 因子と Grg4 因子は、Tbx6 と *Thylacinel* によって上昇した自分自身の発現も転写レベルで抑制することがわかった。さらに、Grg4 との相互作用に必要な WRPW ドメインを欠損させた変異型の Bowline 因子を作成し、同様にプロモーターアッセイを行ったところ、Bowline 因子による *Thylacinel* の転写抑制作用が大きく低下した。また、脊椎動物における *bowline* 遺伝子の相同遺伝子間でよく保存されている BDLC (Bowline-DSCR-Ledgerline conserved) 領域を欠損させた変異型の Bowline 因子を用いた場合も、Bowline による *Thylacinel* の転写抑制作用が大きく低下することがわかった。これらの実験結果より、私は Bowline 因子が Tbx6 因子と相互作用して *Thylacinel* と *bowline* 遺伝子の転写抑制を行っているのではないかと考えた。この仮説を証明するために、Bowline 因子と Tbx6 因子の相互作用が存在するかを免疫沈降法により調べ、両因子間の相互作用を検出した。Bowline 因子は、先行研究により Grg4 因子と相互作用することが知られている。そこで、Bowline 因子を介して、Tbx6 因子と Grg4 因子が相互作用するかを免疫沈降法で調べたところ、Bowline 因子存在下でのみ Tbx6 因子と Grg4 因子が相互作用することを明らかにした。これらの結果より、Bowline 因子は、転写共役抑制因子である Grg4 と転写活性化因子である Tbx6 の結合を仲介することで、Tbx6 因子の転写活性化能を抑制し、Tbx6 因子により活性化される *Thylacinel* や *bowline* 遺伝子等の発現を抑制していることが示唆された。

本研究の結果より、アフリカツメガエル胚において、体節が分節する直前に、Tbx6、*Thylacinel*、E47 因子が *bowline* 遺伝子の発現を誘導し、次に Bowline 因子が Tbx6 因子により制御されている遺伝子発現を抑制することで、体節の分節位置決定に関わる遺伝子の発現を正確に抑制していると考えられる。