

論文内容の要旨

論文題目

Analysis of a novel nuclear envelope protein, Nemp1, in early *Xenopus* eye development

(アフリカツメガエル初期眼発生における新規核膜タンパク質 Nemp1 の解析)

理学系研究科 生物科学専攻

氏名：儘田 博志

指導教員：平良 眞規

脊椎動物の神経形成やオーガナイザー活性に関与する分子の実体は、主にアフリカツメガエル胚を用いた解析により、オーガナイザー特異的転写因子や分泌性因子などの発生制御因子の発見を経て急速に進展した。しかし、原腸形成から神経管形成を経て脳形成に至るまでの一連の分子カスケードのうち、転写因子や分泌性因子、あるいは細胞内シグナル伝達因子以外の分子の役割は十分に明らかにされていない。脊椎動物の眼は前脳由来の眼杯と表皮由来の水晶体により形成されるが、最近種々の転写因子の相互作用が眼の領域化・初期形成に関わっていることが明らかにされつつある。それによると眼の発生は初め *Noggin* や *Otx2*, *Sox2* の制御を受けて *rax*, *tbx3*, *pax6*, *six3* 等の転写因子が誘導されることによって眼の領域化と初期形態形成が行われていくと考えられている。しかしこれら転写因子の直接の標的遺伝子とその作用機序について、その多くは未だ明らかにされていない。このように、眼の発生に関わる制御因子群は明らかになりつつあるが、その多くは転写因子であり、他の因子やそれらとの相互作用についての知見は未だ少ない。当研究室ではこれまで、神経誘導や頭部形成の分子機構を解明する目的で、アフリカツメガエル予定脳領域である前方神経外胚葉 (anterior neuroectoderm 以下 ANE) の cDNA ライブラリーを作製し、ANE に発現する新規因子の同定と機能解析を行ってきた。

私は頭部形成に関わる新規遺伝子を同定・解析するため、ANE ライブラリーから、22 個の新規遺伝子候補に関して ESTs 検索や cDNA クローニングを行い、そのうち全翻訳領域の得られたクローンについては、タグをつけたコンストラクトを培養細胞 COS7 に遺伝子導入し、タンパク質の細胞内局在を共焦点顕微鏡により観察した。その結果、核膜に局在する新規のクローンを見出し、それに注目した。核膜は核内膜と核外膜、核膜孔複合体で構成され、核膜タンパク質は細胞分裂時の核膜の消失と再構築や核構造の維持に関わると考えられている。これまで核膜タンパク質のそのような役割が主として解析されてきたが、発生過程における核膜タンパク質の役割についての解析は殆どなされていなかった。そこで私はこの遺伝子の全翻訳領域を同定し、Nemp1(Nuclear envelope integral membrane

protein 1)と名付け、この因子の発生現象における核膜タンパク質の役割を明らかにすることを目的とした。

アミノ酸配列の構造予想プログラムにより、Nemp1 は、N 末側にシグナルペプチド様の配列と、5つの膜貫通領域が予測されたが、既知のドメインやモチーフは持っていなかった。また Nemp1 遺伝子のオーソログはヒトから線虫まで存在することを見出したが、いずれも機能未知であった。我々は進化的に保存された領域は何らかの機能ドメインとして働くのではないかと予測し、相同性の高い領域を2ヶ所決定し、それぞれ領域 A、領域 B とした。領域 A は膜貫通領域内に、領域 B は C 末端側に存在した。次に Nemp1 の時間的空間的発現パターンを解析したところ、*nemp1* mRNA は母性 mRNA として存在し、中期胚変移後でも発現しており、また神経胚期には前方神経外胚葉に発現し、尾芽胚期では眼を含む頭部に強く発現が見られた。

次に Nemp1 の核膜での局在を検討した。これまで核内膜への局在性や N 末端や C 末端の配向性は免疫電子顕微鏡観察を用いて行われてきたが、私はそれらを解析するための簡便な方法を考案した。まず核膜の内腔側と核質側を識別するための指標として、それぞれに配向するようにタグを付けた核内膜タンパク質 MAN1-HAi (内腔側) と Emerin-HAc (内腔側)、HAn-Emerin (核質側) を作成した。次いでそれらを発現させた培養細胞を、細胞膜の抗体透過性を引き起こす digitonin を用いて処理したところ、時間依存的に核外膜の抗体透過性が上がるのに対して、核内膜の透過性がそれほど上がらないことを見出した。この digitonin 透過性免疫染色法により、Nemp1 の C 末端領域は核質側に向いていることが示され、したがって Nemp1 は核内膜に局在していることが示唆された。

Nemp1 の機能解析を行うために mRNA による過剰発現実験、アンチセンス・モルフォリーノオリゴ (MO) による機能低下実験を行った。興味深いことに、いずれの場合においても神経胚期において予定眼領域に発現するマーカー遺伝子である *rax*, *tbx3*, *pax6* の発現が低下し、また尾芽胚期においては眼の欠損した表現型が得られた。対照的に前脳中脳マーカー遺伝子である *otx2* や神経板マーカー遺伝子である *sox2* の発現には影響は見られなかった。これは Nemp1 が眼の発生に特異的に働くことを示唆する。さらに Nemp1 の各種欠失型コンストラクトを作製し、mRNA の顕微注入実験を行った結果、シグナルペプチドと膜貫通領域が Nemp1 の活性と核膜局在に必要で、特に Nemp1 の C 末端領域の核膜への局在が必要であることが示された。以上の結果から、Nemp1 は核内膜に局在し、核質側で化学量論的に制御された複合体を形成する可能性が考えられた。

そこで次に Nemp1 の C 末端領域と相互作用する因子としてクロマチンタンパク質の BAF (barrier to autointegration factor) に注目した。BAF は核内膜タンパク質や眼の発生に関わる転写因子と相互作用することが知られている。解析の結果、*baf* は *nemp1* と眼胞領域で共発現すること、Nemp1 の領域 B に存在する BAF 結合配列を介して相互作用することが示された。さらに、*nemp1* MO による眼の形成阻害は *nemp1* mRNA の共注入では回復するが、BAF 結合配列を欠いたコンストラクトでは回復効率が著しく低下した。これらの結果から Nemp1 は核内膜において、少なくとも BAF を介して眼特異的マーカー遺伝子の発現制御に関与することが示唆された。

本研究は、核膜タンパク質が発生過程の組織特異的な遺伝子発現を制御する可能性を初めて示したものであり、核膜タンパク質の役割に新たな知見を与えるものである。