

論文内容の要旨

Molecular analysis of zygotic *VegT* in *Xenopus* early development

(ツメガエル初期発生における接合体性 *VegT* の分子生物学的解析)

福田 雅和

<序論>

動物の発生において胚葉形成は、ボディープランを規定する重要なプロセスである。三胚葉は胚発生過程で形成される層状の細胞集団であり、将来異なる器官や組織に分化する。なかでも中胚葉は筋肉、心臓、腎臓、血球などに分化する細胞群である。両生類の中胚葉は予定内胚葉細胞から分泌される複数の因子により予定外胚葉細胞から誘導される。また背側中胚葉に形成されるオーガナイザーは原腸陥入運動に伴い裏打ちする予定外胚葉細胞を神経に誘導する。このように中胚葉は、脊椎動物の体づくりのセンターとして重要な役割を担っており、その誘導、形成及び領域化機構の解明は発生学における最も重要な課題のひとつである。これまで種々のモデル動物を用いた先行研究により、中胚葉特異的に発現する多数の遺伝子が同定され、そのうちの数種類の遺伝子が T-box 転写因子をコードすることが知られていた。またこれら複数の T-box 遺伝子の変異体が様々な中胚葉形成異常の表現型を示すことから、T-box 転写因子は中胚葉形成に必須であり、これらが複雑に協調的に働き、中胚葉の形成及びその領域化が生じると考えられてきた。ツメガエルの中内胚葉の誘導には、T-box 転写因子である母性

VegT (mVegT) の関与が必須であることが示されている。VegT には母性及び接合体性 (zVegT) の二種類のバリエーションが存在することが報告されており、これまでは mVegT に関して盛んに研究が成されてきた。mVegT は胎胚期において中内胚葉形成に必須である TGF- β スーパーファミリーに属す分泌性のシグナル分子をコードする Nodal 関連遺伝子の発現を誘導する。また複数の内胚葉特異的遺伝子の発現を直接的に制御し、内胚葉決定因子としてツメガエル初期発生において極めて重要な役割を担っている。一方、原腸胚初期において汎中胚葉特異的に興味深い発現を示す zVegT に関しては殆ど解析が成されていない。

そこで本研究では、zVegT の機能及び転写制御機構の解明を通し、脊椎動物の中胚葉形成及びその領域化メカニズムの一端を明らかにすることを目指した。

<結果と考察>

接合体性 VegT の機能について

zVegT の機能を知る目的で、zVegT のオルソログを比較ゲノム学的アプローチと機能阻害実験により探索した。まず中胚葉形成に関与する脊椎動物の T-box 遺伝子の分子系統樹を作成した。その結果、ツメガエル VegT はゼブラフィッシュ *Spadetail* 及びニワトリ *Tbx6L* と同一の遺伝子サブファミリー (VegT/*Spadetail* サブファミリー) に分類されることが分かった。次にこの遺伝子サブファミリーに属す遺伝子のゲノム構造を比較したところ、これら遺伝子のエクソン構造及びシntenニーは高度に保存されていることが分かった。また zVegT の時間的・空間的発現を *in situ* ハイブリダイゼーションで調査したところ、初期原腸胚期においては汎中胚葉で発現し、後期原腸胚ではその発現は沿軸中胚葉に局限し、脊索が形成される背側領域の発現は消失していた。このような発現パターンはゼブラフィッシュ *Spadetail* 及びニワトリ *Tbx6L* と発現時期及び領域が同一であった。さらに zVegT のタンパク質翻訳を特異的に阻害するモルフォリーノアンチセンスオリゴ (MO) を用いた機能阻害実験を行った。その結果、zVegT の機能阻害により、脊索に影響が認められなかった一方で、体幹部中胚葉構造の乱れ、筋肉の減少及び体節の分節化に異常が観察された。この zVegT MO 顕微注入により生じる表現型は、ゼブラフィッシュ *Spadetail* 変異体の表現型と著しく似通っていた。これらの結

果から、ツメガエル α VegT はゼブラフィッシュ *Spadetail* 及びニワトリ *Tbx6L* のオルソログであり、沿軸中胚葉形成に重要な働きを担うことが明らかとなった。

接合体性 VegT の転写制御機構について

α VegT のシス制御領域を同定するため、まず VegT 遺伝子のゲノム構造を *Xenopus tropicalis* (*X. tropicalis*) のゲノム情報を用いて明らかにした。その結果、*mVegT* 及び α VegT は各9つのエクソンから構成され、第2エクソンから第9エクソンは両者で共有し、 α VegT の第1エクソンは *mVegT* の第1イントロンに位置していた。まず *mVegT* 及び α VegT の各第1エクソンの間をクローニングし、トランスジェニック胚を作製した。その結果、作製したトランスジェニック胚において内在性の α VegT の発現パターンを模倣したレポーター遺伝子の中胚葉特異的な発現が観察された。この結果は *mVegT* と α VegT の各第1エクソン間約6 kb の領域内に α VegT の転写を中胚葉特異的に活性化するシス制御領域が存在することを示唆している。次にこのシス制御領域をより絞り込む目的で欠失解析を行い、シス制御領域が2箇所に分れて存在することを明らかにした。これら領域中には、Nodal シグナルのメディエーターである FoxH1 及び Smad の結合配列、FGF-Ras-MAPK シグナルのメディエーターである Ets 及び T-box 転写因子の結合配列が複数存在していた。そこで α VegT の中胚葉特異的な発現に Nodal シグナル及び FGF シグナルが寄与していることを予想し、これらの関与を調査するため、各シグナルを特異的に抑制することが報告されている Cerberus-short (*CerS*) 及びドミナントネガティブ型 FGF レセプター (*XFD*) の各 mRNA をツメガエル初期胚に顕微注入し、機能阻害実験を行った。その結果、*XFD* mRNA 過剰発現胚においては α VegT の発現に影響は見られなかった一方、*CerS* mRNA 過剰発現胚においては α VegT の発現に顕著な消失が観察され、 α VegT の発現に対する Nodal シグナルの関与が示された。さらに、FoxH1 転写因子及び T-box 転写因子の各結合配列に対する点変異導入により、ルシフェラーゼアッセイ及びトランスジェニック胚作製において α VegT の中胚葉特異的なシス制御活性に著しい減少が生じることを確認した。さらにゲルシフトアッセイにより、*in vitro* において FoxH1 タンパク質及び T-box タンパク質 Eomesodermin (*Eomes*)、*Tbx6* が α VegT のシス制御領域の各結合配列に結合することを明らか

にした。次に T-box タンパク質であるトランス制御因子の更なる絞り込みを目的に、まず原腸胚期において発現が報告されている T-box 遺伝子 *zVegT*、*Eomes*、*Xbra*、及び *Tbx6* の時間的・空間的発現パターンを詳細に比較した。その結果、これら遺伝子のうち *Eomes* のみが *zVegT* よりも早く発現し、トランス制御因子の最有力候補であると予想された。この仮説を実証するため、*Eomes* の pre-mRNA スプライシングを特異的に阻害する *Eomes* MO を用いた機能阻害実験を行った。その結果、*Eomes* の機能阻害により、*in vivo* において内在性 *zVegT* の発現の消失が認められ、*zVegT* の発現に *Eomes* が寄与していることが明らかとなった。興味深い事に、*zVegT* の中胚葉特異的シスエレメントである FoxH1 転写因子及び T-box 転写因子の各結合配列は、ゼブラフィッシュ *Spadetail* の上流配列においても多数存在し、今回同定した転写制御機構が種を越えて保存されていることが予想される。

本研究により、*VegT/Spadetail* サブファミリー遺伝子の種間における対応関係が明らかとなり、*zVegT* がゼブラフィッシュ *Spadetail* 及びニワトリ *Tbx6L* のオルソログであり、沿軸中胚葉形成に重要な役割を果たすことが示された。また *zVegT* の中胚葉特異的な転写が *Nodal* シグナル及び T-box 転写因子 *Eomes* により 2箇所から離れた存在するシス制御領域を介して活性化されることが明らかとなった。これらの知見は、複雑に制御される中胚葉形成及びその領域化における T-box 遺伝子の役割分担の一端を明らかにしたものである。