

## 論文内容の要旨

### 論文題目

#### Analysis of post-transcriptional regulation of the RNA binding protein Mex3B in early *Xenopus* embryogenesis

(アフリカツメガエル胚初期発生における RNA 結合タンパク質 Mex3B の  
転写後制御の解析)

氏名 高田 仁実

動物の発生において、細胞運命決定やパターン形成を的確に制御するためには、遺伝子発現量の厳密な調節機構を含む制御システムの頑強性が必要と考えられる。RNA 結合タンパク質による mRNA の転写後調節は、遺伝子発現量を素早くかつ厳密に制御することが可能であるため、初期発生において重要な役割を果たしていると考えられる。これまで RNA 結合蛋白質は多数知られているが、脊椎動物の初期発生に関わることが示された RNA 結合タンパク質は少ない。当研究室の先行研究において、初期神経発生に関わる新規遺伝子を同定することを目的としたアフリカツメガエル前部神経板由来の cDNA を用いた発現スクリーニングにより、RNA との結合が示唆される KH (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K homology) ドメインとタンパク質間相互作用を行う RING ドメインを持った Mex3B が同定された。注目すべきことに、Mex3B の 3'非翻訳領域 (UTR) には約 800 塩基にわたって脊椎動物間で高度に保存された領域 (3' long conserved untranslated region; 3'LCU と命名) が存在する。これほど長くかつ高度に保存されている 3'UTR は非常に稀であった。これらの特徴から Mex3B は KH ドメインを介して何らかの RNA を制御すると同時に、3'LCU が存在することによって自身の mRNA が制御されていると予想し、Mex3B における RNA 制御メカニズムを明らかにすることを目的として以下の解析を行った。(図

## 1; Mex3B の構造)

まず *Mex3B* の発現パターンを全胚 *in situ* ハイブリダイゼーションによって検討した結果、*Mex3B* mRNA は母性因子として存在し、原腸胚期には外胚葉全体と中胚葉の一部に発現が見られた。神経胚初期には神経板全体に発現が限局し、尾芽胚期には頭部、鰓弓、尾芽に発現することが分った。

*Mex3B* の初期発生における機能を明らかにするため、アフリカツメガエル胚を用いた合成 mRNA 顕微注入による過剰発現実験を行った。*Mex3B* を背側外胚葉に発現させた胚では後方の神経板に発現する *Xcad3* (*Cdx4*) や *Hoxd1* の減少が見られ、尾芽胚期では体軸伸長が阻害された。背側中胚葉に発現させると中胚葉形成に関わる *Xbra* の発現が抑制された。逆に、アンチセンスモルフォリーノ(MO)による機能低下実験では、前方に発現する *Otx2* と *Rx2* の発現減少が見られ、尾芽胚期では眼の縮小が認められた。背側中胚葉においては *Xbra* の発現が阻害された。これらの結果から *Mex3B* は初期発生において神経板の前後軸パターン形成と中胚葉形成に関与していることが示唆された。ここで注目すべき点は、*Mex3b* の過剰発現と機能喪失で神経板での表現型がそれぞれ後方と前方の異なる領域に現れること、および中胚葉の *Xbra* は共に発現阻害を生じることである。これらの現象は、*Mex3b* は適切な発現量を保つことが正常発生に必要なことを示唆している。

過剰発現、機能阻害実験において *Mex3B* が影響を与えた *Xcad3* と *Xbra* の遺伝子はどちらも FGF シグナルの下流であることから、*Mex3B* が FGF シグナルに関与する可能性が示唆された。そこで、*Mex3B* が FGF シグナル伝達に関わるかどうかを検討するため FGF 反応性のルシフェラーゼ・レポーター遺伝子を用いた解析を行った。その結果、FGF8 によるレポーター遺伝子の活性化は *Mex3B* の共発現によって著しく減少した。逆に、*Mex3BMO* の共発現によって FGF8 によるレポーターの活性化が増強されたことから、*Mex3B* は FGF シグナルに対して阻害的に働くことが示された。以上の結果から、*Mex3B* は FGF シグナル伝達因子の量あるいは活性を制御することにより、初期発生における前後軸パターン形成と中胚葉形成に関与することが示唆された。

次に進化的に保存されている 3'LCU の機能を解析するため、この領域を GFP につないだレポーターコンストラクト GFP-3'LCU mRNA を *in vitro* 合成し胚に顕微注入した。その結果、3'LCU は mRNA のタンパク質合成を促進する作用と共に、mRNA を不安定化させる作用ももつことを見いだした。タンパク質合成を促進する領域と不安定化に関わる領域を特定するため、3'LCU を 4 つの領域 A~D に分割したコンストラクトを作成した所、A 領域が不安定化に必要な十分であることを見いだした。しかしながら翻訳促進活性は領域 A~D のいずれにも認められたことから、翻訳促進に関わるエレメントは 3'LCU 中に 4 箇所以上存在すると考えられる。以上の結果は、3'LCU が何らかの RNA 結合タンパク質によ

って制御されている可能性を示唆するものであるが、Mex3B 自身も RNA 結合タンパク質でありこの制御に関わる可能性が考えられた。そこで Mex3B の自己制御機構を検討するため、レポーターmRNA と Mex3B mRNA の共注入実験を行った。その結果、Mex3B の発現はレポーターmRNA の分解をさらに促進させたことから、Mex3B は自身の 3'LCU を介して mRNA の不安定化に働くことが示唆された。興味深いことに Mex3B によるレポーターmRNA の分解には 3'LCU の D 領域が必要であり、内在性の因子による不安定化に必要な A 領域とは異なる領域を認識することが明らかとなった。このことは、長い 3'LCU に種々の因子が結合することで Mex3B mRNA の安定性と翻訳量が制御されていることを示唆するものである。そこで次に、レポーターmRNA の実験で示唆された Mex3B の自己制御機構が生体内でも起こっているかどうかを検討するため、Mex3B の過剰発現もしくは機能阻害による内在性 Mex3B mRNA の量的変動を検討した。その結果、予想通り Mex3B の mRNA 量は Mex3B の過剰発現によって減少し、MO による機能低下によって増加した。さらに、3'LCU の領域のみを注入しても mex3b mRNA 量が増大すること、また 3'LCU に相補的な RNA を注入しても増大したことから、Mex3B による 3'LCU を介した自己抑制の制御機構の存在が強く支持された。この制御機構は Mex3b の発現量を適切に保つためのものと考えられる。これはまた Mex3b の過剰発現と機能低下実験の結果から予想された「Mex3b の適切な量が正常発現に必要である」との予想に呼応するものである。

以上の結果から、Mex3B は mRNA の 3'UTR に作用して不安定化させる機能を持つということが明らかとなった。そこで次に、自身の mRNA 以外に Mex3B が制御する RNA を探索するため、マイクロアレイによるディファレンシャル・スクリーニングを行った。マイクロアレイは 2 セット行い、(1) 野生型 Mex3B で発現減少する mRNA、(2) Mex3B-MO によって発現上昇する mRNA を探索した。これまでの機能解析結果から Mex3B は FGF シグナルを阻害することが示されていたので、マイクロアレイの結果から予想された Mex3B の標的遺伝子の中で、FGF シグナル伝達に関わる因子である FGF20、syndecan-2、ets1b、syndecan binding protein(syntenin)に注目した。これらの因子が Mex3B の標的 mRNA であるなら、Mex3B はこれら mRNA の 3'UTR を介して mRNA を不安定化させるはずである。そこでそれぞれの遺伝子の 3'UTR を GFP につないだレポーターmRNA が、Mex3B によって不安定化するかどうかを検討した。その結果、FGF20 あるいは syntenin の 3'UTR が付いたレポーターmRNA は影響を受けなかったが、syndecan-2 の 3'UTR をつないだレポーターmRNA は Mex3B によって顕著に分解が促進されたことから、syndecan-2 が Mex3B の標的 mRNA の 1 つであることが示された。Syndecan-2 は FGF のコレセプターとして働くことが知られているが、初期発生過程における syndecan-2 と FGF シグナルとの関連については不明であり今後検討すべき課題である。

本研究で得られた以上の結果を基に、Mex3b を中心とした mRNA の翻訳制御機構による初期発生の分子メカニズムを提唱する (図 2)。RNA 結合タンパク質 Mex3B の mRNA は、その 3'UTR に存在する制御配列 3'LCU を介して、Mex3b および他の因子により安定性と翻訳効率が制御される。この Mex3b による自己抑制作用により Mex3b の発現量は適切なレベルに保たれると考えられる。このようにして決定された Mex3B の発現量に従い、syndecan-2 などの Mex3b 標的 mRNA 量が制御され、その結果、前後軸形成に必要な FGF シグナル伝達量が保たれることになる。一般に、遺伝子発現量の決定には転写調節だけでは不十分であり、迅速で微調節が可能な転写後調節が重要な役割を果たしていると考えられている。そのような発現量の調節機構が、シグナル伝達経路におけるある種の構成因子の発現量を決め、それがシグナル伝達の強度を左右するようになることは十分に考えられることである。しかしこれまでそのような実例は示されていなかった。このような状況において、本研究は、Mex3B の発現量が mRNA レベルでの転写後自己調節によって適切に保たれること、さらに Mex3B により FGF シグナル伝達のコンポーネントの量が制御されること、およびそれにより胚の前後軸パターン形成が調節されることを示唆するものである。このように本研究は、シグナル伝達の量的調節における mRNA の制御メカニズムという、新たな概念を与えるものである。

