

論文内容の要旨

論文題目 **Analysis of stepwise formation of the Spemann–Mangold organizer by dynamic in vivo binding of transcription factors to cis-regulatory modules of *cerberus* and *gooseoid***

(*cerberus* と *gooseoid* 遺伝子のシス制御モジュールへの転写因子群のダイナミックな in vivo 結合によるシュペーマン - マンゴールド・オーガナイザーの段階的な形成の解析)

氏名 須藤則広

アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*)のSpemann–Mangoldオーガナイザーは初期発生において中心的な役割を果たすことで知られる。予定オーガナイザー領域では、NodalシグナルとWnt/ β -cateninシグナルにより種々の転写因子が誘導され、続いて神経誘導や頭部形成に必要な分泌性因子の遺伝子発現が引き起こされる。しかしこれら個々のシグナルや転写因子に関する解析は行われているが、NodalシグナルとWnt/ β -cateninシグナルの2つがどのように統合され次の誘導作用に至るのかなど、その遺伝子カスケードにおける転写制御ネットワークの詳細は未だ十分に解析が進んでいない。そこでこれらの点を明らかにするため、私はオーガナイザーに発現する分泌性因子である*cerberus* (*cer*) および転写因子の*gooseoid* (*gsc*)に注目してその転写制御機構について解析を行った。*cer*は背側の中内胚葉で広く発現し、腹側化または後方化因子であるWnt、Nodals、BMPなどを抑制していると考えられている。また原腸胚期には予定神経外胚葉に働きかけることで、その後の神経誘導や頭部形成を促進すると考えられる。これまでに当研究室の先行研究において、オーガナイザーに発現する転写因子であるホメオドメイン蛋白質のLim1、Siamois (Sia)、Otx2、Mix1が頭部誘導因子である*cer*の発現に関わることを、*X. laevis*胚を用いたDNA顕微注入法によるレポーター解析により示唆されている(Yamamoto et al., 2003, Dev. Biol. 257:190)。一方、*gsc*はオーガナイザーで発現するとともに、その後頭部オーガナイザーで転写抑制因子として機能する。*gsc*はNodalシグナルとWnt/ β -cateninシグナルが協調してオーガナイザー領域に発現誘導を受けるが、*cer*と*gsc*が発現を開始する領域は異なる。以上を背景に、初めに私はトランスジェニック法を用いたレポーター解析ならびに*X. laevis*の近縁種である*X. tropicalis*との比較により*cer*の制御に関わる新たな転写因子VegTを見出し、さらにVegTは、Lim1、Sia、Otx2、Mix1と共に*gsc*の制御にも関わることを見出した。そこでLim1、Sia、Otx2、Mix1、

VegTの5種類の転写因子について、*cer*および*gsc*のシス制御モジュール（CRM）への結合を経時的および空間的に明らかにする為に、ステージを追ったクロマチン免疫沈降-PCR法（ChIP-PCR法）と *in situ hybridization*によるmRNAの発現領域の詳細な比較を行った。その結果、2つの異なる領域が統合される形で、段階的にオーガナイザーが形成されること、およびそれに至る過程で、5つの転写因子の段階的なCRMへの結合を明らかにした。

*X. laevis*の*cer*プロモーター近傍のシス制御モジュール（CRM）を含む約2 kb領域に対応する配列を*X. tropicalis*よりクローニングし、比較した。その結果、Lim1、Sia、Mix1、Otx2に対して応答するCRMであり、5つのホメオドメイン結合部位をもつABCDEエレメントを含む転写開始部位からその上流-229にかけて高い保存性が見られた。しかし、このABCDEエレメントは完全には保存されていなかった。そこでトランスジェニック法を用いたレポーター解析を行ったところ、*X. laevis*と*X. tropicalis*共に上流-229までの配列でオーガナイザーにおけるレポーター遺伝子の発現に十分であることが示されたが、-166領域ではABCDEエレメントを含むにも関わらず十分な活性を示さなかった。この実験から、-229から-166の領域が新たなシス制御領域として見出だされ、そこには両種間で完全に保存されたT-box 結合配列が3つ存在したことから、母性因子としてオーガナイザー領域に発現するT-box型転写調節因子VegTによる反応性をDNA顕微注入法によるルシフェラーゼレポーター解析により検討した。その結果、VegT単独では大きな活性化はみられないが、Lim1、Sia、Mix1、Otx2と共発現させるとレポーター遺伝子が大きく活性化した。以上の結果は、-229領域に存在するCRM（*cer*-U1と命名）が、初期発生過程における3種の主要合図（developmental cues）、すなわち母性因子（VegT）、Nodalシグナル（Lim1、Otx2、Mix1）、Wntシグナル（Sia）を統合することで*cer*の発現を引き起こすことを示唆している。

VegTは、*gsc*の発現を活性化することが報告されていたが、反応エレメントは未だ同定されていなかった。そこで、*gsc*のプロモーター上流の-492領域のCRM（*gsc*-U1と命名）の配列解析とDNA顕微注入法によるルシフェラーゼレポーター解析を行った結果、3カ所のT-box 結合配列見いだされ、かつVegTへの反応に必要なことが示された。*gsc*は既にLim1、Sia、Otx2、Mix1で活性化されることが報告されているので、これらを総合すると、*cer*と同様に、*gsc*も1つのCRMである*gsc*-U1を介して、初期発生過程における3種の主要合図を統合することで発現を開始することが示唆された。

以上のように5つの転写因子が1つのCRMを介してオーガナイザー遺伝子の発現を誘導することが、レポーター解析により示されたが、実際にこれらの転写因子が内在性の*cer*および*gsc*遺伝子のCRMに結合しているかを示すことが、次の重要な課題となった。そこでこの点を検討するため、5つの転写因子（Lim1、Sia、Otx2、Mix1、VegT）に対するポリクローナル抗体を作成し、胞胚期、原腸胚期、初期神経胚期におけるChIP-qPCR解析を行った。ChIP-qPCR解析は*X. laevis*の初期原腸胚のクロマチンを用いた。その結果、VegTおよびSiaは、胞胚後期に両遺伝子のCRMである*cer*-U1と*gsc*-U1に結合していること、原腸胚期では5つの転写因子が全て結合していること、さらに神経胚期になると*cer*遺伝子では全ての結合が減少または見られなくなるが、*gsc*遺伝子ではLim1とOtx2の結合のみが維持されていた。これらの経時的な転写因子の結合パターンが、5つの転写因子とその標的遺伝子である*cer*と*gsc*の発現パターンの経時変化と果たして合致するか否かを次に検討した。

そのために、*cer*、*gsc*、*lim1*、*sia*、*otx2*、*mix1*、*vegt*、*chordin*、*sox17b*、*sox2*遺伝子の発現パターンを、*in situ hybridization*法により、胚発生のステージを細かく追って詳細に比較検討した。その結果、胞胚中期から後期において、*lim1*、*otx2*遺伝子は*cer*の発現が開始する背側内胚葉で発現が始まる一方、

sia、*gsc*、*chordin*遺伝子は背側動物極側領域（予定中胚葉）で発現が始まることが示された。すなわち、*cer*と*gsc*は共にオーガナイザーに発現する遺伝子ではあるが、異なる2つの領域において発現を開始する。次いで胞胚後期から原腸胚期にかけては、*cer*と*gsc*の発現領域はそれぞれ内胚葉から中胚葉、中胚葉から内胚葉へと広がり、原腸胚のオーガナイザー領域で最終的に両者の発現領域はほぼ重なった。

これらの詳細な発現解析の結果とChIP-qPCR解析の結果を統合することで、私はオーガナイザー形成が段階的に進行する以下のモデルを提唱した。すなわち、VegTにより背側内胚葉で発現を開始した*cer*は、同じ領域で発現を開始する*Lim1*、*Otx2*、*Mix1*（Nodalシグナルに応答）と*Sia*（Wntシグナルに応答）により発現が増大維持される。一方、*Sia*とNodalシグナルにより背側動物極側領域に発現を開始した*gsc*は、原腸胚期に発現を拡大した*Lim1*、*Otx2*、*Mix1*、および接合子発現のVegTにより発現が増大維持される。最終的に*cer*と*gsc*は原腸胚オーガナイザー領域にて*Lim1*、*Sia*、*Otx2*、*Mix1*、VegTと共に、オーガナイザーの形成と機能に関与することになるが、それに至る過程は、2つの異なる領域が別々のシグナルを受けつつ統合されて1つになっていく過程であることが本研究により初めて明らかとなった。これは発生初期における種々のシグナルの統合とそれに基づく領域化の分子メカニズムの範例となるものである。