

論文審査の結果の要旨

氏名 須藤 則広

本論文は一部構成で、要旨、序論、結果、考察、方法、結論、図表、文献からなり、転写因子群による原腸胚オーガナイザーの段階的な形成機構について、アフリカツメガエル (*Xenopus laevis*) とネッタイツメガエル (*Xenopus/Silurana tropicalis*) を用いた詳細な解析を行った結果を述べている。

両生類の原腸胚オーガナイザー、すなわち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。オーガナイザーは、NodalシグナルとWnt/ β -cateninシグナルによって種々の転写因子が誘導されることで形成され、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。オーガナイザーに発現する転写活性化因子としてはLim1、Otx2、Mix1、Siamoisが知られており、Lim1、Otx2、Mix1はNodalシグナルによって誘導され、SiamoisはWnt/ β -cateninシグナルによって誘導される。これらの転写因子は、オーガナイザー特異的遺伝子の*goosecoid* (*gsc*)と*cerberus* (*cer*)遺伝子の発現に関わることが示唆されている。しかしこれまでの研究のほとんどはin vitroの解析であり、実際にin vivoでNodalシグナルとWnt/ β -cateninシグナルの2つがどのように遺伝子発現において統合され、次の誘導作用に至るのかなど、その遺伝子カスケードの詳細は、未だ十分に解析されていなかった。本論文では、まず*cer*遺伝子に注目してその転写制御機構について、トランスジェニック法を用いて、レポーター解析を行うことで、*cer*遺伝子の制御に関わる転写因子としてVegTを新たに見出した。次いでVegTは、Lim1、Sia、Otx2、Mix1と協調的に*cer*遺伝子を活性化し、さらに*gsc*の制御にも関わることを見出した。そこでこれら5種の転写因子が実際にin vivoで、内在性の*cer*と*gsc*遺伝子のシス制御モジュールに結合しているかをクロマチン免疫沈降一定量PCR (ChIP-qPCR) 法で解析し、さらに発現領域の詳細な解析と比較検討した結果、新たなオーガナイザーの形成機構が明らかとなった。これらの研究成果は、発生生物学の一流国際誌上で発表され、本学位審査会でも高く評価された。詳細は以下の通りである。

本研究ではまず、*X. laevis*と*X. tropicalis*の約2 kbのプロモーター領域の配列比較と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、転写開始部位上流-229から-166の領域が新たなシス制御配列として見出された。そこには保存されたT-box 結合配列が存在したことから、母性因子のT-box型転写調節因子VegTに着目した。VegTは、Lim1、Sia、Mix1、Otx2と協調的にレポーター遺伝子を活性化したことから、この領域を含むシス制御モジュールを新たに*cer*-U1と命名した。次に、VegTが*gsc*遺伝子の制御にも関わるかを検討するため、*gsc*の遺伝子のレポーター解析を行った結果、T-box 結合配列を介して、VegTはLim1、

Sia、Otx2、Mix1と協調的に活性化することが示された。そこでこのシス制御モジュールを *gsc-U1* と命名した。これらの結果は、初期発生過程における3種の主要シグナルである母性因子 (VegT)、Nodalシグナル (Lim1、Otx2、Mix1)、Wntシグナル (Sia) を統合することで、*cer*と*gsc*遺伝子がオーガナイザーで特異的な発現を引き起こすことを示唆しており、本論文の重要な結果の1つである。

以上の結果を基に、内在性の*cer*および*gsc*遺伝子のシス制御モジュール*cer-U1*と*gsc-U1*に実際に転写因子が結合しているかを検討するため、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。その結果、胞胚後期ではまずVegTとSiaが*cer-U1*と*gsc-U1*に結合し、原腸胚期では5つの転写因子が全て*cer-U1*と*gsc-U1*に結合するが、神経胚期になると*cer-U1*では全ての結合が減少または見られなくなる一方、*gsc-U1*ではLim1とOtx2の結合のみが維持されていた。次にこれらの経時的な転写因子の結合パターンが、果たして5つの転写因子と*cer*と*gsc*の発現領域の経時変化と合致するか否かをin situ hybridization法により比較検討した。その結果、胞胚中期から後期に*cer*と*gsc*は異なる2つの領域において発現を開始すること、胞胚後期から原腸胚初期にかけて*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拡大し、原腸胚中期では両者のオーガナイザー領域での発現領域はほぼ重なった。以上の結果を統合すると、原腸胚期のオーガナイザー領域では、*cer*と*gsc*はLim1、Sia、Otx2、Mix1、VegTの制御化にあってオーガナイザーの機能に関与するが、オーガナイザーが形成される前は、2つの異なる領域が別々のシグナルを受けつつ分化し、それらが次第に統合されて1つのオーガナイザーになっていくことが、本研究により初めて明らかとなった。この結論は、これまで混沌としていたオーガナイザー形成の過程を明確にした点で高く評価できるものであり、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。

なお、本論文に記載されている解析は全て論文提出者が主体となって分析および検証を行ったものであり、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士(理学)の学位を授与できると認める