

論文内容の要旨

論文題目

The Role of Hippo Signaling Pathway in *Xenopus* Primitive Hematopoiesis

(ツメガエル一次造血における Hippo シグナル経路の役割)

氏名 柘次金 進

背景と目的

Hippo シグナルは細胞増殖や器官サイズの制御、がん抑制に働くシグナル経路であり、その構成因子がショウジョウバエからヒトまで高度に保存されているシグナル伝達経路である。脊椎動物における Hippo シグナルの中心的な伝達機構は Hippo のオーソログである Mst1/2 キナーゼから Lats1/2 キナーゼ、そして転写共役因子の Yap/TAZ へ伝えるリン酸化カスケードである。このリン酸化カスケードは抑制型シグナルとして働き、Yap/TAZ はリン酸化されると足場タンパク質に結合し核局在が阻害されるほかに、ユビキチン-プロテアソームシステムによって分解される。リン酸化されない場合、Yap/TAZ は核内へ移行し、Tead などの転写因子と結合し転写共役因子として機能することで増殖や未分化性維持を促進することが知られている。しかし、初期発生過程における Hippo シグナルの機能については未だ不明な点が多い。私は初期発生解析に大きなアドバンテージを持つネットイツメガエル初期胚を用いて、いつ・どこで Hippo シグナルが機能しうるのか（結果 1）、またその役割が何であるのか（結果 2）を調べることを目的とした。

研究成果

結果 1 ツメガエル初期発生における Yap/TAZ の発現パターン

Hippo シグナルの最終的なアウトプットは Yap/TAZ である。すなわち Yap/TAZ が発現していることが Hippo シグナルの制御が機能する必須条件であるため、ネッタイツメガエル初期発生における Yap/TAZ の発現パターンを詳細に調べた。

Yap は胚発生において広く発現しており、その転写産物は未受精卵にも存在していた。原腸胚期までは予定表皮領域、および予定神経領域にその局在が見られ、発生の進行に伴い、顔部結合組織、鰓弓、中脳後脳境界、耳胞、前腎、脊索、後腸、尾芽に強い局在が見られた。一方、尾芽胚期の血島では一時的にその転写が抑制されていることが分かった。

TAZ は神経胚以降にその局在が見られ、沿軸中胚葉、前体節中胚葉、顔部結合組織、脳、鰓弓、神経堤細胞、軸下筋芽細胞、に強く発現していた。TAZ は沿軸中胚葉、前体節中胚葉、軸下筋芽細胞のような比較的未分化な状態の筋細胞で強い発現が見られる一方で、分化した筋細胞ではその発現が見られなかった。

これらの結果から初期発生過程において Yap と TAZ が形態形成、器官・組織形成に広く関与する可能性が示唆された。また、Yap と TAZ の制御機構である Hippo シグナルが何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

結果 2 ツメガエル一次造血における Hippo シグナルの役割

初期発生過程において Hippo シグナルがいつ・どこで機能しているかを調べるために、まず Hippo シグナルのコアキナーゼである *Mst1/2* および *Lats1/2* の発現パターンを調べた。その結果、*Mst1* は主に前方腹側血島に、*Mst2* は主に後方腹側血島で強く発現していることが分かった。また *Lats1* はユビキタスな発現パターンを示したが、*Lats2* は体節に強い局在が見られた。これらの結果から血島や体節における細胞分化や組織形成において Hippo シグナルが Yap と TAZ の制御を行っている可能性が示唆された。

近年、*Mst1/2* および Yap のノックアウトマウスによる解析により、これらの遺伝子の欠損は機能が反対であるにもかかわらず、共に血島の形成異常を引き起こすことが報告されている。しかし *Mst1/2* と Yap がどのように血島の形成に関与するかは不明であった。そこで私は、血島での一次造血における Hippo シグナルの役割に焦点を絞り、メカニズムの解析を行った。

Mst1/2 の機能を調べるために、モルフォリ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。まず *Mst1/2* 阻害胚では *Yap* のリン酸化が減少していることを確認した。続いて *Mst* 阻害胚の表現型を観察したところ、*Mst1* 阻害胚では体軸形成、表皮形成が阻害され、*Mst2* 阻害胚では眼形成異常も見られた。*Mst1/2* の二重阻害を行ったところ、単独阻害時より低濃度の MO 注入で形態形成異常が観察された。この結果から、ネットイツメガエル初期発生において *Mst1/2* はリン酸化を介して *Yap* を胚の大部分の領域において制御していること、また *Mst1/2* は相乗的に働いていることが分かった。

続いてこれらの MO を用いて *Mst1/2* 阻害が一次造血に及ぼす影響について、赤血球や骨髄球、血管内皮の分化マーカーを調べた。*Mst1/2* の阻害は赤血球マーカーの発現を著しく減少させた。また、*Mst1/2* 阻害胚では骨髄芽球の数および骨髄芽球マーカーの発現も減少していた。さらに血管内皮マーカーの発現パターンを調べたところ、コントロール胚では網状の血管内皮ネットワークが形成されるのに対し、*Mst1/2* 阻害胚では網状の血管内皮マーカーの発現がほとんど見られなかった。これらの結果から *Mst1/2* は赤血球・骨髄球・血管内皮の形成に関係することが示唆された。

Mst1/2 の強い発現が赤血球・骨髄球・血管内皮に分化する前の前駆細胞で始まること、*Mst1/2* の阻害によりこれら全てにおいて分化が正常に行われなことから、血球と血管内皮の共通の前駆細胞や分化の初期段階の細胞で *Mst1/2* が機能していることが予想されたため、血球・血管内皮前駆細胞および初期分化マーカーの発現パターンを調べた。骨髄球系前駆細胞マーカーである *C/EBPα* および *Spib* の発現を調べたところ、分化に伴い遊走する骨髄球系細胞の数が減少し、前駆細胞が前方腹側血島に蓄積している様子が観察された。この結果から *Mst1/2* は骨髄球系前駆細胞の骨髄芽球への分化に必要であることが示唆された。続いて、尾芽胚期血島の血球・血管内皮前駆細胞マーカーの発現を調べたところ、前駆細胞マーカーの発現に変化は見られなかった。しかし幼生期の血島では、血球・血管内皮の分化進行に伴い、次第に消失するはずの前駆細胞マーカーの発現が継続して維持されていることが分かった。さらに、赤芽球マーカーの *Gata1*、血管内皮前駆細胞マーカーの *Fli1*、*Etv2* の発現パターンを調べたところ、これらの発現が減少していた。これらの結果から、*Mst1/2* は後方腹側血島において、血球・血管内皮前駆細胞の形成に機能しているのではなく、前駆細胞から赤血球および血管内皮への分化に関係していることが示唆された。

ノックアウトマウスの結果から *Yap* もまた血島の形成に関与することが示唆されていたため、*Yap* 阻害胚の一次造血における影響を詳細に調べた。ネットイツメガエルにおいても、赤血球および血管内皮マーカーの発現が減少していた。前駆細胞マーカーについても調べたところ、前駆細胞マーカーの発現領域が減少していた。これらの結果から *Yap* は前駆細胞の形成や増殖に必要であることが示された。

考察

現在のところ *Mst1/2* の上流に位置すると考えられる Hippo シグナルのレセプターおよびリガンドは同定されていない。本研究から、初期発生ではリガンド非依存的に Hippo シグナルコンポーネントの発現量を転写レベルで調節することにより、シグナルの強弱を調節していることが示唆された。また初期発生過程における Hippo シグナルの転写共役因子 *Yap/TAZ* の発現パターンおよびコアキナーゼの *Mst1/2* および *Lats1/2* の発現パターンが明らかになった。*TAZ* は比較的未分化な筋細胞集団で特異的に発現していた。これは Hippo シグナルの制御に対抗し、筋前駆細胞において未分化性を維持するものと考えられる。分化した体節では *TAZ* の発現が消失する一方で、*Lats2* の強い発現が見られた。筋分化において *TAZ* の転写レベルの抑制と、*Lats2* の強い発現によって活性化された Hippo シグナルによるタンパク質レベルでの抑制の両方が必要であることが推測される。同様に、血島において血球・血管内皮の分化が起こる時期に *Yap* の転写が一過的に抑制されていたのに対し、*Mst1/2* は強く発現していた。*Mst1/2* の転写量の増加に伴う Hippo シグナルの亢進が *Yap/TAZ* をタンパク質レベルで抑制すること、*Yap* の一過的な転写抑制の両方が血島での血球・血管内皮の分化に必要とされることが示唆された。

Mst1/2 阻害胚における遺伝子発現を詳細に解析した結果、血球・血管内皮前駆細胞の未分化性が維持され、分化できない状態になっていることが明らかになった。この結果は、*Mst1/2* は前駆細胞から赤血球・血管内皮への分化段階で機能していることを示唆している。

Yap 阻害胚もまた血球・血管内皮の形成に影響を及ぼした。しかし *Mst1/2* 阻害胚と異なり、*Yap* 阻害胚では赤血球・血管内皮前駆細胞の減少を引き起こした。この結果は *Yap* が前駆細胞集団を形成する段階で必要であることを示している。

以上の結果は *Yap* が血球形成過程の初期段階において血球・血管内皮前駆細胞の増殖や維持に働いており、後の一過的な *Yap* の転写抑制および Hippo シグナルによる *Yap/TAZ* の抑制によって前駆細胞集団から血球・血管内皮が分化することを示唆している。