

別紙 2

論文審査の結果の要旨

論文提出者 衞次金 進

Hippo シグナル経路は、細胞増殖や細胞分化を制御するシグナルとして近年注目されている。Hippo シグナルの構成因子はショウジョウバエからヒトまで高度に保存されており、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。Hippo シグナリングの細胞内挙動は徐々に明らかにされてきたものの、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く残されている。本論文では、初期発生過程における Hippo シグナル分子の発現パターンに基づき、その役割について研究を進めている。

第一章では、Hippo シグナルの最終的なアウトプットである 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、初期発生における Yap/TAZ の発現パターンを全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて詳細に調べている。Yap は胚発生において胚葉に限定されない広範な発現を示し、その転写産物は未受精卵にも存在している。一方で、尾芽胚期の血島では一過的にその転写が抑制されている。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、軸下筋芽細胞、心臓など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ていない。これらの結果は、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を示唆している。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を示唆している。

第二章では、まず Hippo シグナルのコアキナーゼである Mst1/2 の Lats1/2 の初期発生過程における発現パターンを全胚 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて詳細に調べ、続いて、血島特異的に発現していた Mst1/2 に着目し、血島における Mst1/2 の機能を Loss-of-Function 解析を行うことで明らかにしている。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が見られている。また Lats1 はユビキタスな発現パターンを示しているが、Lats2 は体節に強い局在が見られている。これらの結果は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を示唆している。血島に強い発現が見られた 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ている。まず Mst1/2 阻害胚において Yap のリン酸化が減少していることを確認し、Mst1/2 の機能が阻害され Hippo シグナルの活性が減少していることを示している。この Mst1/2 の阻害胚の表現型は Mst1 および Mst2 単独阻害時より低濃度の MO 注入で形態形成異常が起こることから、Mst1/2 は相乗的に働いていることを示している。続いて 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ている。Mst1/2 の阻害は赤血球マーカー骨髄芽球マーカー、血管内皮マーカーの発現が減少しており、これらの結果から Mst1/2 は赤血球・骨髄球・血管内皮の形成に必須な遺伝子であることを示している。この結果が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において Mst1/2 が何らかの機能を有していることを示唆していたため、Mst1/2 阻害胚における血球・血管内皮前駆細胞および初期分化マーカーの発現を調べている。骨髄球系前駆細胞マーカーである *C/EBPa* および *Spib*、血球・血管内皮前駆細胞マーカーの *Scf*、*Runx1*、*Lmo2*、*Gata2* の発現を調べており、分化に伴い減少するこれらの発現が Mst1/2 阻害胚において維持されていることを示している。この結果は Mst1/2 が血球・血管内皮前駆細胞の形成に機能しているのではなく、血球および血管内皮への分化段階で機能することを示唆している。ノックアウトマウスを用いた先行研究の結果から 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も調べている。Yap 阻害により、ネッタ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すること示している。加えて、新たに前駆細胞マーカーの発現領域が減少していることを明らかにし、Yap は前駆細胞の形成や増殖に必要であることを示している。

以上の様に本研究は、近年大きく注目されているにも関わらず不明な点が多い、初期発生における Hippo シグナルの役割に関する新しい知見が提示されている。また、今後血球分化の分子メカニズムを解明する上で重要となる結果を含んでおり、新規性も高く研究の意義も大きい。以上の結果から、本審査委員会は博士（学術）の学位を授与するにふさわしいと認定する。