

学位論文要旨

Analysis of the molecular mechanisms regulating *Xenopus* tail elongation

ツメガエル幼生尾部の伸長を司る分子機構の解析

氏名 吉田 和史

多くの脊椎動物は、その身体の後方に尾部構造を持ち、胚発生過程において尾部の末端に位置する脊索-神経管尾端境界 (chordoneural hinge, CNH) と神経-中胚葉前駆細胞 (neuromesodermal progenitors, NMPs) の 2 つの幹細胞領域が脊索、神経、および体節になる前駆細胞を供給するとともに、尾部の伸長を制御している。CNH は主に脊索と神経管の腹側を作り、NMPs は神経と体節を生み出しながら尾部を伸長させる。また、これらの幹細胞領域を維持し、尾部を伸長させるためには、少なくとも 3 つのモルフォゲンシグナル (BMP、Wnt、FGF シグナル) が重要であることがわかっている。さらに、ゼブラフィッシュにおいて BMP、Wnt、および Nodal シグナルを活性化すると、尾部様構造が誘導されることも知られており、複数のモルフォゲンシグナルが協調して働くことが尾部の伸長に重要であると考えられる。しかしながら尾部伸長において、どのようにして複数のモルフォゲンシグナルが統合・制御されているかはいまだよく知られていない。

本学位申請論文において、JunB 転写因子が尾部伸長を制御する新奇の因子であり、かつ尾部の幹細胞領域の維持に必要な BMP、Wnt、および FGF シグナルを統合・制御していることを示す。上述のように、複数のモルフォゲンシグナルを制御することは尾部の伸長において重要であるが、過去の研究によって、いくつかの因子が複数のモルフォゲンシグナルを制御することが示されている。ツメガエルにおいて、マウス *oct4* 遺伝子のホモログが 3 つ (*oct-25*、*oct-60*、*oct-91*) 存在しており、これらの遺伝子の過剰発現および機能阻害を行うと、BMP、Wnt、Activin/Nodal、および FGF シグナル伝達経路で働く遺伝子の発現量が変化し、体軸の形成や尾部の伸長が異常になることが示されている。また、所属研究室において、Oct-25 の下流因子として同定された FoxB1 転写因子が BMP と Wnt シグナルを制御し、後方神経の形成に重要な役割を果たすことが示された。そこで、私は、Oct-25 によって発現が制御される遺伝子の中から胚発生における機能が不明であった JunB に着目し、機能解析を行った。

はじめに、ツメガエル胚発生における JunB の機能を推定するために、*junb* 遺伝子の発現パターンを調べた。発生ステージ別のサンプルを用いた RT-PCR 解析によって、*junb* 遺伝子は初期神経胚期から胚性遺伝子の発現が上昇することが分かった。ホールマウント *in situ* hybridization 法により *junb* 遺伝子の発現領域を調べると、初期神経胚の後方神経板に *junb* の強い発現が見られた。中期神経胚では、*junb* は後方の神経溝に加えて原口周辺に発現していた。また、尾芽胚期になると神経組織の発現は消失し、

原口周辺および尾びれに *junb* の発現が観察された。神経胚期における *junb* の発現は尾部を形成する領域と部分的に重なっており、これらの結果は JunB がツメガエル胚発生において胚の後方および尾部の形成に関与することを示唆する。続いて *junb* 遺伝子の過剰発現を行い、胚発生における JunB の機能を解析した。野生型 *junb* 遺伝子の過剰発現はツメガエル初期発生において頭部が縮小した後方化の表現型、および過剰な尾部様構造の形成を誘導したものの、野生型によるこれらの表現型の誘導活性は弱かった。ヒト JunB では、2つの GSK3 リン酸化部位および1つの MAPK リン酸化部位が隣接した領域に存在しており、これら3つの部位をアラニンへ変異させた JunB は安定化するとともに、その転写活性が上昇することが知られている。そこで、ツメガエル JunB において同様の3つの部位ならびにこれらの部位の間に存在する1つのスレオニン残基の、計4箇所へアラニン変異を導入した変異型 *junb* を作製した。この変異型と野生型との間でその活性を比較したところ、変異型 *junb* の過剰発現によって後方化の表現型、および過剰な尾部様構造の形成がより高頻度で発生した。この結果により、JunB の尾部誘導活性が GSK3 を抑制する Wnt シグナル、および MAPK を活性化する FGF シグナルによって、それぞれ活性化および抑制されることが示唆された。また、JunB の尾部誘導活性が細胞自律的かどうかを調べるために β -ガラクトシダーゼ mRNA と変異型 *junb* mRNA の共注入を行い、 β -ガラクトシダーゼ染色によって *junb* を過剰発現している細胞を追跡した。その結果、尾部様構造において β -ガラクトシダーゼの強い発色が観察されたことから、JunB は、自身を発現している細胞において尾部様構造を誘導することが示唆された。次に JunB が誘導した組織を調べるために、JunB によって誘導された尾部様構造におけるマーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、*xcd3* などの尾部幹細胞マーカー遺伝子および神経マーカー遺伝子の強い発現が見られる一方で、尾部幹細胞領域の1つである CNH のマーカー遺伝子および体節マーカー遺伝子の発現は観察されなかった。さらに、JunB を外胚葉組織で過剰発現させると、原腸胚期の時点ですでに、尾部の伸長を誘導する活性を持ち BMP 応答遺伝子でもある *xhox3*、尾部の形成に重要な *xcd3* および *xbra*、モルフォゲンの *wnt8* と *fgf3* の発現が誘導されることが分かった。以上の結果から、尾部伸長の過程において、JunB は Wnt と FGF のリガンドや BMP シグナル下流の *xhox3* といった尾部幹細胞領域の維持に重要な遺伝子を誘導するにも関わらず、CNH マーカー遺伝子を誘導しないことが判明した。したがって、JunB は、2種類の尾部幹細胞領域のうち NMPs の形成・維持に関与する可能性が考えられた。上述したように、*junb* の発現が、NMPs に相当する予定尾部形成領域と重なることも、この可能性を支持している。また、JunB は GSK3 および MAPK によるリン酸化を介した活性制御という Wnt と FGF シグナルからのフィードバック制御を受けており、これら2つのシグナルを統合していることが示唆された。すなわち、ツメガエル胚発生では、JunB を中心として、尾部幹細胞領域の維持に重要な BMP、Wnt、FGF シグナルを統合・制御するネットワークが形成されており、これによって尾部の伸長が制御されると考えられる。