

## 論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称	博 士 ( 理 学 )	氏名	VIRGINIA REGINA PUTRI
学位授与の要件	学位規則第4条第①項該当		
論文題目			
<p>Investigation of the role of Clk family proteins in <i>Xenopus</i> neural development            ( ツメガエル神経形成における Clk ファミリータンパク質の機能解析 )</p>			
論文審査担当者			
主 査	准教授	鈴木 厚 (両生類研究センター)	
審査委員	教 授	荻野 肇 (両生類研究センター)	
審査委員	教 授	菊池 裕	
審査委員	教 授	千原 崇裕	
〔論文審査の要旨〕			
<p>脊椎動物の発生過程において、初期胚の細胞は複数の誘導因子の作用によって増殖・分化し、背腹軸と頭尾軸に沿って様々な組織・器官を作り出す。背腹軸の形成は骨形成タンパク質 (BMP) によって制御されており、背側中胚葉から分泌される神経誘導因子が BMP の表皮誘導作用を抑制することによって、背側外胚葉から神経細胞が分化する。さらに、誘導された神経に対して Wnt や FGF が作用すると、頭尾軸に沿って脳や脊髄が作り出されることが知られている。このように、背腹軸と頭尾軸の形態形成には、複数の異なった誘導因子が連携して働くことが必要であるが、初期胚の細胞内において誘導因子群のシグナル伝達を統合・制御する機構は十分に分かっていない。</p> <p>Virginia 氏は、発生過程においてツメガエルの神経組織に強く発現する Clk2 に着目して研究を開始した。Clk2 は mRNA スプライシング、細胞周期、幹細胞維持、自閉症に関与することが哺乳類の研究から明らかになっているが、神経発生における解析はほとんど行われていなかった。そこで、Virginia 氏は、ツメガエル神経形成における Clk2 の役割を解析した結果、Clk2 は BMP と FGF のシグナル伝達を制御することによって神経形成を促進することを明らかにした (本学位請求論文の参考文献)。次に、ネッタイツメガエルのゲノム配列を検索したところ、clk2 のパラログとして clk1 と clk3 が存在しており、これら 3 つの遺伝子がファミリーを形成していた。この結果に基づき、本学位請求論文および公表論文では Clk ファミリータンパク質の Clk1 と Clk3 について機能解析を行った。</p> <p>Virginia 氏は、RT-PCR 法によってネッタイツメガエル初期胚から clk1 と clk3 の cDNA をクローニングすることに成功した。また、Clk2 とのアミノ酸配列の比較を行い、Clk1 と Clk3 のキナーゼドメインは相同性が約 60% と最も高く、N 末端側と C 末端側は 35% 以下の低い相同性を持つことを示した。半定量的な RT-PCR 法によって発生ステージ別の発現プロファイルを調べると、clk1 と clk3 は母性 mRNA として発現し、それぞれ神経胚期 (ステージ 17) と原腸胚期 (ステージ 10.5) から発現が上昇することが分かった。さらに、組織特異的な発現パターンについてホールマウント <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション解析を行った結果、clk1 と clk3 は原腸胚の背側領域に発現が認められ、神経胚期と尾芽胚期では、主に神経組織で高い発現が見られた。これらの結果から、Clk1 と Clk3 は、Clk2</p>			

と同様に神経形成に關与する可能性が示唆された。

この可能性を検証するために、ネツタイツメガエルの初期発生過程において Clk1 と Clk3 の過剰発現実験を行った。Clk1 と Clk3 をツメガエルの外胚葉組織片で過剰発現すると、Clk1 の神経誘導活性は非常に弱かったが、Clk3 は Clk2 と同等の高い神経誘導活性を示すことが分かった。次に、ノックダウン解析によって、神経形成過程における Clk ファミリータンパク質の必要性を検討した。*clk1*, *clk2*, *clk3* mRNA 配列にそれぞれ特異的なモルフォリノアンチセンスオリゴヌクレオチド (MO) を合成し、2 細胞期のネツタイツメガエル胚に顕微注入した。後期尾芽胚期で形態を観察すると、Clk3 MO 胚では頭部や眼の縮小および体軸の形成異常が認められ、非常に強い表現型を示した。一方、Clk1 MO 胚と Clk2 MO 胚では、Clk3 MO 胚と同様に頭部と眼の縮小および体軸の形成異常が見られたが、その表現型の程度は Clk3 MO 胚に比べて弱かった。強い表現型を示した Clk3 MO 胚についてマーカー遺伝子の発現を定量したところ、複数の神経マーカー遺伝子の発現が低下し、中胚葉マーカー遺伝子の発現には変化が無かった。したがって、少なくとも Clk3 はネツタイツメガエルの神経形成に必須と考えられた。今後は、Clk3 MO 胚における初期の神経・中胚葉マーカー遺伝子の発現を RNA-seq 法などを用いて網羅的に解析することで、神経誘導過程における Clk ファミリータンパク質の機能を明らかにする必要がある。さらに、Clk3 MO が *clk1*, *clk2* mRNA へ与える影響 (Clk3 MO の特異性) や、Clk1, Clk2, Clk3 間の機能的な相補性についても解析を進める必要がある。また、神経誘導に関わる誘導因子群 (BMP, Wnt, FGF) のシグナル伝達の変化を Clk3 MO 胚において解析し、複数の誘導因子シグナルが統合・制御される機構をより詳細に調べる予定である。学位請求論文では、これらの将来的な研究課題についても議論を深め、検証実験を提案した。上記の研究によって、Virginia 氏は、脊椎動物の神経形成において Clk3 が重要な役割を果たすことを実証し、初期発生過程における誘導因子シグナルの統合・制御機構の研究について、新たな道筋を示した。

以上、審査の結果、本論文の著者は博士 (理学) の学位を授与される十分な資格があるものと認める。

公表論文

**The dual-specificity protein kinase Clk3 is essential for *Xenopus* neural development.**

Regina Putri Virgirinia, Makoto Nakamura, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Fatchiyah Fatchiyah, and Atsushi Suzuki

Biochemical and Biophysical Research Communications 567: 99-105 (2021).

参考論文

**Cdc2-like kinase 2 (Clk2) promotes early neural development in *Xenopus* embryos.**

Regina Putri Virgirinia, Nusrat Jahan, Maya Okada, Kimiko Takebayashi-Suzuki, Hitoshi Yoshida, Makoto Nakamura, Hajime Akao, Yuta Yoshimoto, Fatchiyah

Fatchiyah, Naoto Ueno, and Atsushi Suzuki

Development, Growth and Differentiation 61: 365-377 (2019).