

氏名	やすなが たか ゆき 安永隆亨
学位(専攻分野)	博士(生命科学)
学位記番号	生博第30号
学位授与の日付	平成17年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	生命科学 研究科 統合生命科学 専攻
学位論文題目	アフリカツメガエル ILK (integrin-linked kinase) の同定と初期胚発生における機能解析
論文調査委員	(主査) 教授 西田 栄介    教授 上村 匡    教授 米原 伸

### 論文内容の要旨

インテグリンを介した細胞と細胞外基質との接着は、遺伝子発現、細胞の生存・増殖及び、胚発生などにおいて重要な役割を果たしている。インテグリン結合分子として同定された ILK (integrin-linked kinase) は、ショウジョウバエや線虫を用いた遺伝学的な解析から、筋形成に重要な役割を果たしており、細胞と細胞外基質との接着においてアダプター分子として働いていることが示されていた。また、培養細胞を用いた解析からは、ILK は Wnt シグナル伝達経路や、PKB/AKT シグナル経路などのシグナル分子として、細胞の生存、分化、細胞周期の進行などを制御していることが示されていた。最近 ILK のノックアウトマウスが報告され、着床前後の時期において胎生致死であり、ILK が胚盤葉上層の形成に必須の役割を果たしていることが報告された。着床は、初期胚発生の中でも比較的早い時期に起こる、ほ乳類特有の発現現象であるため、原腸陥入運動や中胚葉誘導といったような、脊椎動物に共通の初期発生過程における ILK の機能は不明であった。そこで私は、アフリカツメガエルをモデル系として用い、脊椎動物初期胚発生過程における ILK の機能解析を行った。まず私は、卵母細胞遺伝子ライブラリーからアフリカツメガエルの ILK (XeILK) を単離した。XeILK は452アミノ酸からなり、ヒト、ショウジョウバエ、線虫 ILK とは、アミノ酸レベルでそれぞれ、88%、59%、56%の相同性を示した。Whole mount *in situ* hybridization 及び、RT-PCR により、XeILK はアフリカツメガエル初期胚内で、継続的かつ遍的に発現することがわかった。次に、XeILK に対するモルフォリノアンチセンスオリゴ (MO) を作成し、4細胞期の背側赤道領域に微量注入したところ、原口の閉鎖の遅延及び頭尾軸方向への体軸の伸長の阻害が観察された。XeILK の機能を詳細に解析するために、アニマルキャップアッセイを行った。アニマルキャップをアクチビン処理すると、中胚葉が誘導されると共に、原腸陥入の細胞運動と類似した組織の伸長が見られることが知られている。ILK に対する MO の微量注入は、アクチビンによる中胚葉マーカーの発現は阻害しなかったが、ILK の発現を抑えられた細胞が特異的に組織から脱落するという現象が観察された。背側赤道領域の組織を用いた実験でも同様に接着性の異常が観察された。また、培養細胞系の実験から示唆されていた、ILK が Wnt シグナル伝達経路を制御する可能性についても、レポーターアッセイなどによる検討を行ったが、アフリカツメガエル初期胚発生過程においては、XeILK が Wnt シグナル伝達経路の活性化能を持たないことが示された。以上の結果から、XeILK は、脊椎動物の初期胚発生過程において、細胞同士及び細胞と細胞外マトリクスとの接着性を制御する分子として機能しており、原腸陥入期における細胞運動の制御に必須の役割を果たしていることが示された。

### 論文審査の結果の要旨

ILK (integrin-linked kinase) はインテグリン  $\beta_1$  サブユニット結合分子として同定された、多細胞生物間で広く保存されている分子である。ショウジョウバエや線虫を用いた遺伝学的な解析から、ILK は筋形成に重要な役割を果たしており、インテグリンを介した細胞と細胞外マトリクスとの接着においてアダプター分子として機能していることが示されていた。

また、培養細胞系を用いた解析からは、ILKはWntシグナル伝達経路やPKB/AKTシグナル伝達経路を制御するシグナル分子として機能し、細胞の生存や分化、細胞周期の進行、細胞外マトリクスの修飾などを制御することが報告されていた。最近になってILKのノックアウトマウスが報告され、ILKは胚盤葉上層の形成及び腔所形成に必須の役割を果たしており、ノックアウトマウスは着床前後の時期に胎生致死であることが報告された。着床は、初期胚発生の中でも比較的早い時期に起こる、ほ乳類特有の発現現象であり、その為、それ以降の原腸陥入運動や中胚葉誘導といったような脊椎動物に共通の発生過程におけるILKの機能に関しては依然不明であった。そこで、申請者はアフリカツメガエルをモデル生物として用い、ILKの初期胚発生過程における機能の解析を行った。

本論文において申請者はまず、ILKのアフリカツメガエル相同遺伝子(XeILK)を同定し、XeILKが初期胚発生過程を通じて継続的かつ偏在的に発現していることを示した。次に、XeILKに対するアンチセンスモルフォリノオリゴヌクレオチド(MO)を作成し、背側領域において内在性のXeILKの発現をノックダウンする実験を行い、XeILKが原口の閉鎖及び、頭尾軸方向への体軸の伸長等の形態形成運動において重要な役割を果たしていることを見出した。さらに、アニマルキャップ、或いは、背側赤道領域の組織を用いた解析により、XeILKは中胚葉誘導を制御しているというよりは、細胞同士及び、細胞と細胞外マトリクスとの接着性を制御していることを見出した。これらの結果より、XeILKが細胞の接着性を介して、初期胚発生過程における形態形成運動に重要な役割を果たしていることを示し、これは、脊椎動物に共通の初期胚発生過程におけるILKの機能を初めて明らかにしたものである。

また、培養細胞系を用いた実験から、ILKがWntシグナル伝達経路を制御することが示唆されていたことから、申請者はアニマルキャップを用いたレポーターアッセイ、及び、ILKの過剰発現が形態形成に与える影響などについて検討を行った。その結果、XeILKはアフリカツメガエル初期胚発生過程においてはWntシグナル伝達経路の活性化能を持たないことを示し、ILKがシグナル分子としてよりは、アダプター分子として主に機能することを示した。

以上のように、本論文で述べられた成果は非常に重要であり、本論文は博士(生命科学)の学位論文として価値あるものと認められる。さらに、平成17年1月24日に行った、論文内容とそれに関連した口頭試問の結果、合格と認めた。