

氏 名	かわ ち かつる 川 地 薫
学位(専攻分野)	博 士 (理 学)
学 位 記 番 号	理 博 第 2678 号
学位授与の日付	平 成 15 年 3 月 24 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	理 学 研 究 科 生 物 科 学 専 攻
学 位 論 文 題 目	アフリカツメガエル初期胚発生における転写因子 Ets-2 の機能解析

論文調査委員 (主 査) 教 授 西 田 栄 介 教 授 七 田 芳 則 教 授 宮 田 隆

論 文 内 容 の 要 旨

アフリカツメガエル初期胚発生においては細胞間相互作用によって分化運命が決定される誘導現象によって中胚葉が形成されることが知られている。この中胚葉誘導には FGF/MAP キナーゼ経路の活性化が重要であることが報告されている。また *Xenopus Brachyury* (Xbra) が FGF シグナルによる誘導を受け、重要な転写因子として中胚葉の形成に役割を果たすことが知られていた、しかし、FGF/MAP キナーゼ経路の下流で中胚葉の形成に関与し、Xbra へと FGF シグナルを伝達する因子については不明であった。

本研究では MAP キナーゼによるリン酸化を受け活性化することが知られている ETS ファミリーに属する転写因子 Ets-2 について、そのアフリカツメガエル初期胚発生における機能解析を行った。Ets-2 をアフリカツメガエル初期胚の赤道領域に発現させると、FGF を過剰発現させた時と同様に体軸が背側に大きく湾曲し、頭部組織の形成が阻害された表現型が得られた。また Ets-2 を胚の動物極に異所的に発現させ、アニマルキャップアッセイをおこなったところ、中胚葉マーカーである Xbra や Xcad3 を誘導した。さらに Ets-2 を FGF 受容体のドミナントネガティブ変異体 (XFD) と共発現させた。その結果、XFD 単独で発現させた時に起こる中胚葉形成の異常による胚の後部組織の欠損を回復し、ほぼ正常に発生した。一方ミ Ets-2 の N 端側の活性化ドメインを *Drosophila Engrailed* のリプレッサードメインに置換したドミナントネガティブ型変異体 Ets4N En-R を発現させると FGF や恒常的活性型 MAPKK (MAPKK SESE) によって誘導される Xbra の発現を阻害した。Ets4N En-R を赤道領域に発現させた胚は後部組織の形成に異常が見られた。Ets-2 に対するアンチセンスモルフォリノオリゴの過剰発現によっても同様の表現型が観察された。これらの表現型は FGF シグナルを阻害した時の表現型によく一致していた。このことから、Ets-2 は FGF/MAP キナーゼ経路の下流で中胚葉の形成に必要な十分である可能性が示唆された。

次に Xbra のプロモーター領域をルシフェラーゼ遺伝子と融合したコンストラクトを初期胚にインジェクションし、アニマルキャップを用いたレポーターアッセイを行い、Xbra の転写活性に対する Ets-2 の効果を検討した。その結果、Ets-2 の発現によりルシフェラーゼ活性はコントロールに比べ約 4 倍に上昇した。一方、Ets4N En-R を発現させるとコントロールに比べ、ルシフェラーゼ活性は大幅に減少した。Ets4N En-R を発現させたアニマルキャップに FGF を添加してもルシフェラーゼ活性の減少に変化はなかった。このことから、Ets-2 は FGF シグナル経路において Xbra の転写制御に必要な十分である可能性が示唆された。さらに Xbra プロモーター領域上のどの部分に Ets-2 が結合するかをゲルシフトアッセイを行い、検討した。その結果、Xbra プロモーター領域上の -310/-271 フラグメントに Ets-2 タンパクが特異的に結合し得ることを見出した。

以上の結果から、本研究は Ets-2 がアフリカツメガエル初期胚発生において FGF/MAP キナーゼ経路の下流で中胚葉形成に重要な役割を果たし、また Xbra の転写制御を行っている可能性を示唆した。

論文審査の結果の要旨

FGF/MAP キナーゼ経路はさまざまな生物種の初期胚発生、特に中胚葉の形成において、重要な役割を果たすことが知られている。FGF シグナルを伝える細胞内情報伝達経路については多くの研究がなされてきたものの、その詳細については明らかではない。転写因子 Ets-2 は細胞内シグナル伝達経路において、MAP キナーゼによるリン酸化を受け活性化する因子として、主に培養細胞を用いた実験系で解析がなされてきた。しかし、発生過程などにおける実際の生理機能は不明であった。申請者はアフリカツメガエル初期胚を用い、発生生物学および分子生物学的手法により、Ets-2 の初期胚発生における機能を検討した。その結果、アフリカツメガエル初期胚発生において、Ets-2 が FGF/MAP キナーゼ経路の下流で中胚葉の形成に必須な役割を果たすことを明らかにした。FGF や活性型 MAP キナーゼによってその発現が誘導されることが知られている *Xenopus Brachyury* (Xbra) は中胚葉形成に重要な役割を果たす転写因子であることが知られていたが、FGF シグナルを MAP キナーゼから Xbra へと中継し、中胚葉形成に機能を果たす因子については現在まで報告されていなかった。Ets-2 が FGF/MAP キナーゼ経路の下流で MAP キナーゼと Xbra との間を結ぶ因子として、中胚葉形成に必要な十分な役割を果たしていることを明らかにした本申請論文は、中胚葉形成の分子メカニズムの解明において大変価値があるものと思われる。また、現在まで解析がなされていなかったアフリカツメガエルの初期胚発生における Ets-2 の機能についての初めての知見であり、価値が高い。

次に申請者は、Xbra の転写制御について検討を行った。その結果、Ets-2 が FGF からのシグナルによる Xbra の転写活性化に必要な十分であること、すなわち Ets-2 が Xbra の転写制御を担っていることを明らかにした。Brachyury はさまざまな生物種で広く保存されており、中胚葉形成に重要な役割を果たす転写因子であることが知られているため、その転写制御機構を明らかにしたことは、今後の初期胚発生の研究の進展に寄与するところが大い。

以上、本申請論文はアフリカツメガエル初期胚発生における Ets-2 の機能解析をおこなったものであり、博士（理学）の学位論文として十分に価値があるものとして認められる。

なお、本申請論文に報告されている研究業績を中心として、これに関連した分野について試問した結果、合格と認めた。