

氏 名	あら かわ あき こ 荒 川 明 子
学位(専攻分野)	博 士 (医 学)
学 位 記 番 号	医 博 第 3158 号
学位授与の日付	平 成 19 年 11 月 26 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	医 学 研 究 科 内 科 系 専 攻
学 位 論 文 題 目	The secreted EGF-Discoidin factor xDel1 is essential for dorsal development of the <i>Xenopus</i> embryo. (分泌タンパク xDel1 はアフリカツメガエル胚背側の発生に必須の因子である。)
論文調査委員	(主 査) 教 授 篠 原 隆 司 教 授 開 祐 司 教 授 芹 川 忠 夫

論 文 内 容 の 要 旨

脊椎動物は、受精卵から3胚葉が分化決定され、それらの相互作用でさらに分化が方向付けられる。初期胚のパターン形成に関与する新たな分泌タンパクをクローニングするために、レトロウイルスを使った **signal sequence trap** によるスクリーニングを行い、アフリカツメガエル **xDel1** (**Xenopus Developmentally-regulated endothelial locus 1**) を単離した。**In situ** ハイブリダイゼーションによる解析から、**xDel1** は受精卵から動物極に発現し、胞胚期から予定中胚葉領域の背側と腹側に発現していることが明らかとなった。原腸胚では中胚葉と外胚葉領域に発現し、神経胚では背側外胚葉と背側中胚葉に発現している。

xDel1 をターゲットとするモルフォリノアンチセンスオリゴ (**xDel1-MO**) の注入によって内在性 **xDel1** の機能を特異的に阻害すると、胚は腹側化し、背側遺伝子の発現が抑制され、腹側遺伝子は異所性に発現領域が拡大した。**xDel1-MO** による胚の腹側化は背側予定中胚葉領域外植体の伸長抑制、背腹側の遺伝子発現量の変化によっても確認された。以上から、**xDel1** が背側中胚葉の発生に必要であることが明らかとなった。

次に、**mRNA** 微量注入法による強制発現実験を行い、**xDel1** の活性を調べた。**xDel1** の **mRNA** をツメガエル胚に注入すると、背側遺伝子が異所性に発現拡大し、腹側遺伝子は発現が抑えられた。**xDel1mRNA** を注入した腹側予定中胚葉領域外植体は、背側化して伸長し、RT-PCR によるマーカー遺伝子の発現解析により、背側遺伝子の発現量が増え、腹側遺伝子の発現量は減っていた。以上より、**xDel1** の強制発現はツメガエル胚を背側化することがわかった。

これらの知見から、**xDel1** は、未分化細胞に直接背側中胚葉を誘導する可能性と、腹側中胚葉を背側化する可能性が考えられるが、予定外胚葉領域に **xDel1mRNA** を注入しても、中胚葉が誘導されないため、**xDel1** は中胚葉の背側化に働くと考えられた。

Del1 は、マウスにおいては、**RGD** モチーフを介してインテグリン受容体と結合し、血管新生因子として働く。そこで、アフリカツメガエルの背側化活性を有する領域を調べる目的で、さまざまな部分欠損変異型の **xDel1** の強制発現を行い、背側化活性を調べた。アスパラギン酸をグルタミン酸に置換した **RGE** 型 **xDel1** や、**RGD** モチーフと **EGF** 領域を欠損したアミノ末端欠損変異型 **xDel1** は野生型 **xDel1** と同様の活性を示した。一方、**Discoidin** 領域を欠損した **C** 末欠損変異型 **xDel1** は中胚葉の背側化活性を持たなかった。**xDel1** の背側化活性は、**RGD** モチーフや **EGF** 領域ではなく、**Discoidin** 領域を含むカルボキシル末端に存在していることがわかった。

さて、中胚葉の背側化は、**BMP** 経路が抑えられるか、**Wnt** や **Nodal** 経路のシグナルが亢進して起こることが既に知られている。また、**xDel1** は予定外胚葉領域の外植体を神経化することから、**xDel1** の活性は **BMP** シグナル抑制を介しているという仮説がなりたつ。さらにこれを検証するため、**BMP** シグナルのレポーター遺伝子を使い、**BMP** シグナル活性に対する **xDel1** の効果を検証した。その結果、**xDel1** は、細胞外から作用する **BMP** のシグナル活性のみならず、恒常的活性型 **BMP** レセプターが伝える細胞膜レベルからの **BMP** シグナルの亢進をも抑制した。このことから、**xDel1** の背側化活性は、**BMP**

を抑制することにより惹起されること、さらに、細胞外における BMP との直接の相互作用ではなく、BMP レセプターを介する経路と別の経路を介して、BMP シグナルを抑制していることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

初期発生では、時間上、空間上統制された分化がおこり、多様な組織や器官が形成される。細胞が正しく分化するために、細胞が胚全体のなかでの自身の位置情報と正しい分化の方向性とタイミングを知らなければならない。これらの情報の多くは、分泌因子によって細胞に伝達される。

そこで、申請者らは既知の BMP, Wnt, Nodal, FGF などの経路以外の新規の分泌因子を同定すれば、既存のシグナル経路で説明出来なかった初期発生のパターンニングの機構を明らかにできるのではないかと考え、分泌タンパクのスクリーニングを行った。

実際には、前後軸が形成される時期の鶏前脳のライブラリーで SST-rex (Signal Sequence Trap-retrovirus mediated) を用いて、分泌タンパクのスクリーニングを行い、Del1 (Developmentally-regulated endothelial locus 1) を新規に単離した。アフリカツメガエルの xDel1 は受精卵の時期から動物極に発現し、背側中胚葉と背側外胚葉に発現する。機能欠損実験と、強制発現実験により、分泌タンパク xDel1 はアフリカツメガエル胚背側の発生に必須の因子であり、この活性の一部は、BMP シグナルの抑制でおこるが、既存の BMP レセプターを介さず、別の経路を介して細胞内に情報が伝達されることがわかった。

以上の研究は、初期胚の背側発生に必要な新規の因子の解明に貢献し、既知の分泌シグナルでは説明されなかった初期胚パターンニングの分子機構の解明に寄与するところが多い。したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値があるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 19 年 10 月 17 日実施の論文内容とそれに関連した試問をうけ、合格と認められたものである。