

Title	The role of <i>Xenopus hairy2b</i> for specification of the organizer tissues during gastrulation.
Author(s)	山口, 真未
Citation	大阪大学, 2006, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/46484">https://hdl.handle.net/11094/46484</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏名	山 口 真 未
博士の専攻分野の名称	博士 (理 学)
学位記番号	第 20039 号
学位授与年月日	平成 18 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 理学研究科生物科学専攻
学位論文名	The role of <i>Xenopus hairy2b</i> for specification of the organizer tissues during gastrulation. (アフリカツメガエル原腸形成期のオーガナイザー組織における <i>Xhairy2b</i> の役割)
論文審査委員	(主査) 招聘教授 宮田 隆  (副査) 教授 近藤 寿人 教授 西田 宏記 招聘助教授 橋本 主税

#### 論 文 内 容 の 要 旨

Spemann's organizer is a region of the gastrula stage embryo that contains future anterior endodermal and dorsal mesodermal tissues, and is essential for the gastrulation movement and the neural induction. During gastrulation, the organizer is further divided into the prechordal mesoderm, the chordamesoderm and the floor plate. To understand a fundamental mechanism of the regionalization in vertebrate development, we investigated how these subdivisions of the organizer are established. We analyzed the role of the dorsal mesoderm-specific gene *Xenopus hairy2b* (*Xhairy2b*) in the regionalization of the organizer tissues. We found that mesoderm-inducing TGF- $\beta$  signaling, especially Nodal signaling, induced *Xhairy2b* expression at early gastrula stage. During gastrulation, *Xhairy2b* expression is restricted in the anterior prechordal mesoderm and the floor plate located in the dorsal midline. In addition to Nodal signaling, Notch signaling was necessary for regulation of these *Xhairy2b* expressions. Whereas *Xhairy2b* induced by Nodal signaling regulated the expression of Notch signaling factors, such as *Xotch* and *deltas*, which inversely restricted *Xhairy2b* expression during gastrulation. These results suggest that *Xhairy2b* converts the loose regionalization by Nodal signaling into the distinct boundary formation by Notch signaling. On the other hand, the ectopic expression of *Xhairy2b* induced the expression of organizer-specific genes and resulted in the formation of a secondary dorsal axis lacking head and notochord structures. We also showed that *Xhairy2b* downregulated the expression of ventral mesodermal, anterior endodermal and chordamesodermal genes. In *Xhairy2b* depleted embryos, defects in the specification of anterior prechordal mesoderm identity were observed as the border between the prechordal mesoderm and the chordamesoderm was anteriorly shifted. These results suggest that *Xhairy2b* establishes the identity of the anterior prechordal mesoderm within the organizer by inhibiting the formation of neighboring tissues. Finally, we showed that *Xhairy2b* in both anterior prechordal mesoderm and floor plate was crucial for induction of the hypothalamus, where *nkx2.4* was expressed. The anterior prechordal mesoderm and the floor plate gradually made subtle contact, and the interplay of both regions eventually specified the hypothalamus.

This result suggests the new mechanism defined a subtle region in the neural plate. These findings revealed that *Xhairy2b* acted on various steps in the regionalization of the organizer tissues and the neural tissues during gastrulation.

アフリカツメガエル初期原腸胚の背側中胚葉（オーガナイザー領域）は、最初の形態形成運動の原動力となり、かつ神経の誘導や領域化に必須の働きをする組織であり、それ自身は、原腸形成に伴って領域化されて脊索前板・脊索・底板といった背側正中組織を形成する。これら発生のごく初期におこる領域化機構を解明することで、脊椎動物の発生の基本メカニズムを知りたいと考えた。そこで私は、初期原腸胚の背側中胚葉に発現を開始し、その後、前方部脊索前板・底板に発現が局在する転写因子 *Xhairy2b* が背側正中組織の領域化にどのように働くのか、また、その後の神経の領域化にどのように働くのかを明らかにしようと研究を行った。

初めに、どのようなオーガナイザー形成シグナルによって初期原腸胚の背側中胚葉に *Xhairy2b* が誘導されるのか過剰発現と機能阻害の系を用いて調べた。その結果、*Xhairy2b* の発現には背側での *Nodal* シグナルの高活性が必須であることが示された。また、*Nodal* シグナルによって誘導された *Xhairy2b* は、背側中胚葉領域で *Xotch* の発現を誘導し *delta* の発現を抑制することで、中胚葉領域での *Notch* シグナル因子の発現領域の制御をおこなっていた。原腸形成に伴って *Xhairy2b* は前方部脊索前板と底板に発現が局在する。この発現制御には、*Nodal* シグナルに加えて *Notch* シグナルが必要であることが明らかとなった。これらのことから、*Xhairy2b* は、中胚葉領域に存在する *Nodal* シグナルによるおおまかな領域の形成から、*Notch* シグナルによる厳密な領域の形成への橋渡しをおこなっており、さらに自身も *Notch* シグナルによる厳密な発現制御を受けていくという、原腸胚の中胚葉における一連の領域化機構が示唆された。

次に、*Xhairy2b* のオーガナイザー領域での働きを調べた。腹側領域への *Xhairy2b* 異所発現の結果、*Xhairy2b* は、オーガナイザーの因子を誘導することで二次体軸の形成を促進することが明らかとなった。一方で *Xhairy2b* は、背側中胚葉に隣接する組織である腹側中胚葉や頭部オーガナイザーで働く因子の発現を抑制していた。さらに、*Xhairy2b* は原腸形成に伴って、同じく背側中胚葉からできる脊索で働く因子の発現を抑制することによって、前方部脊索前板・底板の形成と維持に必須の働きをすることも示された。よって *Xhairy2b* は、原腸形成時に自身の発現する組織の性質を促進する一方で、隣接する組織の性質を抑制することにより、自身の発現する領域の形成・維持に働いていることが示唆された。

最後に、前方部脊索前板・底板それぞれでの機能阻害実験により、*Xhairy2b* の発現する前方部脊索前板と底板はともに、予定視床下部領域での *nkx2.4* の発現誘導に必須であることが明らかとなった。また、初期には離れて存在する両組織は徐々に移動して接した直後に *nkx2.4* が発現開始することから、中胚葉と神経外胚葉の微細な領域が形態形成運動に従って接することで、そこに新たな領域が決定するメカニズムが示唆された。

以上のように、*Xhairy2b* が原腸形成時の様々な領域の形成に働く機構を解明したことで、初期発生の基本的なメカニズムの一端が明らかとなった。

#### 論文審査の結果の要旨

山口さんの学位論文は、アフリカツメガエルの初期発生で、オーガナイザーと呼ばれる機能領域がどのように成立し、また原腸形成に伴ってどのように領域化されるのかについて、*Xhairy2b* と呼ばれる遺伝子の働きから見てみようというものです。

*Xhairy2b* は、HES 関連遺伝子として標的遺伝子の発現を抑制的に制御するもので、多くの生きものの形づくりの過程で領域境界の形成に働くことが知られています。この遺伝子が、初期原腸胚において背側中胚葉（オーガナイザー）に特異的に発現し、原腸形成が進むにつれてオーガナイザー由来組織のうち、特に脊索前板と底板にその発現が限局することに山口さんは着目し、異所発現や機能阻害実験を行なうことによりその働きを解析しました。

山口さんが明らかにしたことは大きく次の4点です。

1・原腸形成期の Xhairy2b の発現は、Nodal シグナルによって誘導されますが、多くのオーガナイザー特異的遺伝子の発現に重要であるとされる Wnt/ $\beta$ -catenin シグナルによっては誘導されません。原腸形成運動の進行に伴って Xhairy2b は、Delta-Xotch シグナルによってその発現が誘導されるようになりました。また、この時期には Xhairy2b 自身が Delta の発現を抑え、Xotch の発現を誘導することから、Nodal によって大まかな領域に誘導された Xhairy2b の発現が、その後の Delta-Xotch による厳密な制御を受けて詳細な領域形成へと向かう発生過程の一翼を担っていると結論づけました。

2・Xhairy2b は、背側中胚葉組織を腹側に異所誘導する活性を持ち、同時に頭部組織を抑制する活性を持つことを明らかとしました。このように腹側組織が背側に、頭部組織が体幹部に変化した現象を、腹側中胚葉特異遺伝子と前方内胚葉（頭部オーガナイザー）など隣接する組織に特異的な遺伝子の発現を積極的に Xhairy2b が抑制することによると結論づけました。

3・原腸形成が進むに伴い、Xhairy2b が発現していた背側中胚葉はさらに領域化され脊索前板・脊索・底板の三つの組織となりますが、Xhairy2b は、脊索には発現しません。これが、Xhairy2b 遺伝子産物によって脊索特異的遺伝子の発現抑制の結果であることを明確に示しました。さらに、Xhairy2b の機能を抑制することにより、本来 Xhairy2b が発現している領域に脊索特異的遺伝子の発現が広がり、その結果として脊索前板前方領域の形成が阻害されることを見いだしました。

4・Xhairy2b の機能阻害により脊索前板前方部の形成を阻害すると、視床下部（間脳腹側領域）の形成が阻害されることを明らかとしました。同時に、予定視床下部領域に発現している Xhairy2b の機能阻害によっても視床下部の形成が阻害されることを見いだしています。これらの事実から、Xhairy2b は、神経板（底板）に発現してその領域が視床下部に誘導される能力を与え、さらに脊索前板に発現することにより脊索前板が視床下部を誘導する能力を与えるというモデルを提唱しました。山口さんは、このモデルをさらに発展させて、Xhairy2b が発現する予定視床下部領域と脊索前板領域が形態形成運動によって互いに会った瞬間に視床下部の決定が起こるという魅力的なモデルを提出しました。時間的制約により、このモデルを支持する実験結果はまだ不足していますが、どのような実験によってこのモデルの是非を検証できるかについて明確に計画を提出していることは大いに評価できます。本研究は、実験の量と緻密さ、研究者による考察のいずれにおいても力作であり、よって、本論文は博士（理学）の学位論文として十分価値あるものと認めます。