

Title	ホヤ胚の脊索誘導における応答能消失の分子メカニズム
Author(s)	橋本, 秀彦
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59431
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"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

【9】

氏名	橋本秀彦
博士の専攻分野の名称	博士(理学)
学位記番号	第24881号
学位授与年月日	平成23年9月20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	ホヤ胚の脊索誘導における応答能消失の分子メカニズム
論文審査委員	(主査) 教授 西田 宏記 (副査) 教授 柿本 辰男 招へい教授 橋本 主税

論文内容の要旨

胚発生の過程において、多様な組織をつくるための基本的かつ重要なメカニズムの一つが誘導的細胞間相互作用である。誘導が起こるかどうかは、誘導シグナルの有無だけでなく、誘導シグナルを受け取る側の細胞の応答する能力“応答能”の有無によっても制御されている。そのため誘導的細胞間相互作用を理解する上で、応答能がどのように制御されるかを明らかにすることは重要である。一般に応答能は時間的に制御されており、一定時間後に応答能が消失し、それ以後、誘導シグナルを受け取ったとしても細胞は応答しなくなることが知られている。応答能消失は本来誘導されてはならない時期に、誘導された組織をつくらないために重要だと考えられているが、応答能消失の分子メカニズムはほとんど報告されておらず、応答能消失が一般的にどのようなメカニズムによって引き起こされるか明らかとなっていない。

マボヤ (*Halocynthia roretzi*) 胚の割球単離実験の結果から、脊索誘導において時間的な応答能消失が起こることが明らかになっている。マボヤの脊索運命は FGF シグナルによって 32 細胞期から誘導され、脊索/神経索運命をもつ親細胞は予定脊索細胞と予定神経索細胞に非対称分裂する。脊索/神経索の発生運命をもつ親細胞を 32 細胞期に単離し、FGF タンパク質で処理しなかった場合、娘細胞は共にデフォルト運命である神経索に分化する。一方、FGF 処理した場合、脊索形成のキー転写因子 *Brachyury* の転写が活性化し、二つの娘細胞は共に脊索に誘導される。しかし、単離後、一定時間が過ぎると予定脊索/神経索細胞は FGF に対する応答能が消失し、もはや FGF 処理しても *Brachyury* の発現が起こらず脊索が誘導されない。これまでの結果より、応答能消失後に FGF 処理しても FGF シグナル伝達系のリン酸化 MAPK が核移行することがわかってきた。そのためリン酸化 MAPK の核移行から *Brachyury* が発現するまでの伝達過程の間に、応答能が消失する原因があると考えられていたが、依然として応答能消失がどのように起こるのか明らかでなかった。

そこで、脊索誘導における時間的な応答能の消失が、どのように起こるか調べるため、応答能消失時期あたりから発現を開始し、*Brachyury* の発現を抑制する因子が存在すると仮定し、その候補因子として Forkhead family の転写抑制因子、FoxB に注目した。FoxB のアンチセンスモノフォリノオリゴ (MO) を受精卵に注入すると、初期 32 細胞期に単離した予定脊索/神経索細胞を通常なら応答能が消失している時期に FGF 処理した場合でも、*Brachyury* の発現が見られた。これとは逆に、FoxB mRNA を注入し早く FoxB を発現させると応答能消失以前に FGF 処理したにもかかわらず、*Brachyury* の発現が見られなかった。これらのことから、誘導が起こらないまま一定時間経過すると FoxB が発現を開始することで FGF による *Brachyury* の発現を抑制し、応答能消失を引き起こすことが考えられた。

次に、単離割球 (部分胚) ではなく発生している全胚で、応答能消失に関わる FoxB がどのような役割をしているかを解析した。動物半球の一部の細胞を脳に誘導するため予定神経索細胞自身が FGF を分泌しており、自らが FGF に曝されて、脊索に誘導されてしまう可能性がある。単離実験で明らかとなったように、予定神経索細胞で発現する FoxB は、*Brachyury* 遺伝子の発現を妨げることによって脊索誘導が完了した後も神経索割球においてデフォルトである神経索の運命を維持する役割があると考えられる。これまでの研究から、動物半球から来る抑制シグナルが予定神経索細胞でのみ受け取られ、FGF のシグナルカスケードを不活性化することによって *Brachyury* の発現を妨げることが知られていた。今回の解析の結果 FoxB と動物半球からの抑制シグナルが相乗的に予定神経索細胞で *Brachyury* の発現を妨げることがわかった。このことから全胚で、予定神経索細胞がデフォルト運命である神経索の運命を維持できるようにするために、FoxB が予定神経索細胞で *Brachyury* の発現を妨げることによって脊索に誘導されないようにしていると考えられた。

最後に FoxB が *Brachyury* の発現をどのように抑制するかを調べた。*Brachyury* 遺伝子の転写調節 cis 領域の解析から、*Brachyury* の発現を予定神経索細胞で妨げるために必要だと考えられる領域があり、Fox 結合コンセンサス配列を含むことが明らかにされていた。可能性として、FoxB タンパク質が転写抑制因子ならば *Brachyury* 遺伝子の転写調節領域上に結合し、その転写を抑制するという可能性が考えられる。まず FoxB が転写抑制因子か否かを調べるため、FoxB の DNA 結合領域である Forkhead (FK) ドメインと強力な転写活性化ドメインとして知られる VP16、もしくは転写抑制化ドメインの EnR を融合させた mRNA を注入し、これらのタンパク質を強制発現させた。その結果、活性化ドメインをもつ FK-VP16 タンパク質は異所的に *Brachyury* を発現させるが、FoxB 全長タンパク質と FK-EnR タンパク質は *Brachyury* の発現を抑制することから FoxB が抑制転写因子として働くことが示唆された。また上述した *Brachyury* の 5' 転写調節領域の Fox 結合コンセンサス配列に FoxB タンパク質が結合することをゲルシフトアッセイによって示すことができた。このことから応答能消失は、FoxB が *Brachyury* の転写調節領域に直接結合し、その発現を抑制することによって起こると考えられた。

以上のことから脊索誘導における応答能消失は、FGF 誘導シグナルによって発現する脊索特異的遺伝子の発現を FoxB が妨げることによって起こり、全胚では応答能消失を引き起こすことにより予定神経索の運命を維持するために機能すると考えられた。FoxB は *Brachyury* の転写調節領域上に直接結合してその発現を妨げると考えられ、これまで明らかとなっている数少ない例における応答能消失のしくみ、すなわち、細胞内シグナルトランスダクションが途中で遮断されることによって起こるという分子メカニズムとは異なる。本研究で明らかとなったメカニズムでは細胞内シグナルトランスダクションは遮断されていないので、FGF シグナルを再びすぐに利用できる、その時には *Brachyury* 以外の下流遺伝子の発現を制御できることを示唆している。生物では繰り返し同じシグナルが時間と場所を変えて働くことがわかっており、発生において繰り返し同じシグナルトランスダクションが利用される。このことと本研究で明らかとなった応答能消失の分子メカニズムはよく整合性がとれており、今後、同様のメカニズムが様々な動物でも働いていることが明らかになってくることを期待したい。

論文審査の結果の要旨

胚発生過程において、多様な組織をつくるための基本的かつ重要なメカニズムの一つが誘導的細胞間相互作用である。誘導が起こるかどうかは、誘導シグナルの有無だけでなく、誘導シグナルを受け取る側の細胞の応答する能力“応答能”の有無によっても制御されている。一般に応答能は時間的に制御されており、一定時間後に応答能が消失し、それ以後、誘導シグナルを受け取ったとしても細胞は応答しなくなることが知られている。応答能消失は本来誘導されてはならない時期に、誘導が起こらないようにするために重要だと考えられているが、応答能消失の分子メカニズムはほとんど報告されておらず、応答能消失が一般的にどのようなメカニズムによって引き起こされるかは明らかとなっていない。そこで橋本氏は、マボヤ胚の脊索誘導における応答能消失の分子メカニズムを解析した。

マボヤの細胞は単離が可能かつ容易であり、脊索を誘導する FGF タンパク質を含んだ海水で単離割球を飼育することによって脊索を誘導でき、応答能消失時期を解析できる系である。この系をうまく使い、橋本氏は応答能消失時期から発現するフォークヘッド型転写因子である FoxB に注目し、FoxB のアンチセンスモノフォリノオリゴ (MO) による機能阻害をした場合に応答能消失が遅延し、FoxB mRNA 注入によって FoxB を早く発現させると応答能消失が通常より早く起こることを突きとめた。このことは FoxB が発現すると、これが応答能消失を引き起こすことを示している。さらに通常発生している胚では、FoxB は脊索に誘導されずデフォルト運命を辿る神経索細胞で発現しており、FoxB は発生が進行する途中で FGF によって不適切に脊索に誘導されてしまうのを妨げていることを申請者は明らかにした。さらに申請者は、FoxB が脊索誘導をどのように妨げるかのしくみを解析した。FGF によって発現が誘導される脊索形成に必要なキー転写因子である *Brachyury* の遺伝子の転写調節領域に FoxB タンパク質が結合することをゲルシフトアッセイによって確認し、また FoxB が転写抑制因子として働く可能性を示した。この結果から FoxB が *Brachyury* の転写調節領域に結合しその発現を妨げることによって応答能消失が起こるというしくみを提案した。

少数例ではあるが、これまで知られている応答能消失は誘導シグナルが核に伝達されないことによって起こる。橋本氏が示した応答能消失の分子メカニズムは、シグナルは核に伝達されるが、シグナルの下流で活性化される組織特異的遺伝子の発現を直接妨げるというものであり、新しい応答能消失の分子メカニズムだといえる。また、生物は同じシグナルを繰り返し異なる時期に利用することを考えると、橋本氏が明らかにした応答能消失の分子メカニズムは再び同じシグナルを他の制御に活用できることから、広く生物においてこのメカニズムが働くことが予想され、重要性が高いと考えられる。

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る。