

氏名	山崎 敦子
学位の種類	博士(理学)
学位記番号	博甲第1061号
学位授与の日付	平成20年9月26日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第4条第1項)
学位授与の題目	Molecular mechanisms of micromere specification and nonskeletogenic mesoderm formation in the sea urchin embryo (ウニ胚における小割球特異化と非骨片中胚葉形成の分子機構)
論文審査委員(主査)	山口 正晃(理工研究域・准教授)
論文審査委員(副査)	櫻井 勝(理事・教授), 岩見 雅史(理工研究域・教授), 福森 義宏(理工研究域・教授), 東 浩(理工研究域・准教授)

Abstract

Micromeres have two important roles on sea urchin embryogenesis; autonomous differentiation into skeletogenic cells and induction of endomesodermal tissues. Canonical Wnt pathway is essential for specification of vegetal cell fates, including micromere specification, in sea urchin embryos. In the present study, I investigated molecular mechanisms for micromere specification and mesoderm formation through analyses of *micro1* and Kruppel-like (*Krl*), both of which are direct targets of nuclear β -catenin. *micro1* is a micromere-specific, novel paired-like class homeobox gene. By constructing chimeric embryos composed of blastomeres from control and experimental embryos, I show that *micro1* is necessary and sufficient for micromere differentiation and the endoderm-inducing activity. *Krl*, which encodes a transcriptional repressor containing a Zn-finger DNA-binding domain, is activated in both micromere and macromere progenies. I show that HpKrl controls the specification of SMCs through both cell-autonomous and non-autonomous means in macromeres, and propose that two distinct pathways of endomesoderm formation exist in macromeres, a *Krl*-dependent pathway and a *Krl*-independent pathway. Recently, micromere-specific genes are activated through a double negative repression gate consisting of two repressors, *micro1* and *HesC* has been demonstrated. I molecularly dissected *micro1* and analyzed correlation between the structure and function of *micro1*. *micro1* includes a homeodomain in the N-terminus and two serine-rich repeats, each of which includes an eh1 motif, in the C-terminus. I show that *micro1* may repress *hesC* gene through specific DNA-binding via homeodomain and recruitment of co-repressors, including Groucho, via eh1 motif.

ウニ卵は動物-植物(A-V)軸にそって分極しており、この極性は16細胞期に外面的に現れる(図1)。動物半球を構成する中割球は外胚葉へ、大割球は内胚葉(原腸)とその先端から

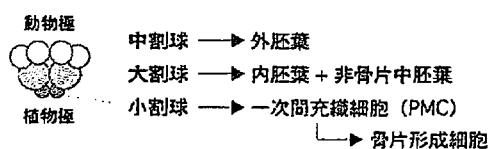


図1 ウニ16細胞期における予定運命

生じる非骨片中胚葉へと分化する。一方、小割球には2つの役割がある。それは、① 細胞自律的な一次間充織細胞 (PMC) を経た骨片形成細胞への分化、そして、② 内胚葉と非骨片中胚葉の誘導 (オーガナイザー活性)、である。(図1)。小割球の特異化を含めて、内中胚葉形成には核 β -catenin が必須である (Wikramanayake et al., 1998)。

1. *micro1* は小割球の骨片形成細胞への分化と内胚葉誘導に必要かつ十分である

バフンウニ小割球で特異的に発現する遺伝子、*micro1* が単離されている。*micro1* は (1) 新規のホメオボックス遺伝子で、(2) 小割球で一過的に活性化される (Kitamura et al., 2002)。また、(3) 遺伝的多型をもつマルチコピー遺伝子で、(4) 小割球における核 β -catenin の直接の標的遺伝子である。さらに、(5) モルフォリノアンチセンスオリゴ (MASO) によるノックダウン胚は、小割球除去胚に似た表現型を示す (Nishimura et al., 2003)。

一方、Oliveri et al. (2002) は、バフンウニの近縁種 *Strongylocentrotus purpuratus* から *micro1* の相同遺伝子、*pmar1* を単離し、その性質が *micro1* と同じであることを示した。さらに Oliveri らは、*pmar1* 過剰発現によって PMC 表現型細胞が増加することを明らかにした。この結果は、*micro1*(*pmar1*) が小割球の役割①に重要なはたらきをすることを示している。さらに Oliveri et al. (2003) は小割球除去胚を宿主とした検定によって、*pmar1* が小割球の役割②を含めて小割球特異化に十分であると結論した。しかし、小割球除去胚は内中胚葉へと前特異化されている領域を持つため、小割球の誘導を受けなくても一部の内中胚葉構造をつくることができる。そのため、この実験から *micro1* (*Pmar1*) が小割球の役割②に十分であるかを説明するのは不十分である。

本研究の第1部では、*micro1* の小割球の役割②への機能を解析した。MASO による *micro1* ノックダウンは小割球除去胚に似た表現型を示す (Nishimura et al., 2003) が、*micro1* が多型を含むマルチコピー遺伝子であるため、その表現型が現れるのは約 20% 程度であった。そこで本研究では *micro1* antimorph: *micro1*HD-VP16 activation domain (逆機能) による確実な機能阻害を行った。*micro1* が小割球の役割②に必要なかどうかを調べるため、正常胚の動物半球と *micro1* antimorph 発現胚の小割球を再構成した (図2A)。その結果、*antimorph* 発現細胞は PMC へと分化せず、胞胚壁の一部を構成し、内中胚葉も誘導しなかった。この結果は、「*micro1* が小割球の役割①と②のいずれにも必要」であることを示す。逆に、*micro1* 過剰発現胚の1つの中割球を正常動物半球へ移植すると (図2B)、*micro1* 発現細胞は PMC をへて骨片を形成するだけでなく、動物半球から原腸を誘導し、キメラ胚はプルテウス様の幼生へと発生した。ところが、この幼生には非骨片中胚葉組織 (色素細胞、筋肉細胞) がなかった。この観察は、「*micro1* は小割球の役割①と、②の一部の内胚葉誘導には十分であるが、②のもうひとつの役割である非骨片中胚葉の誘導には十分ではない」ことを示した。

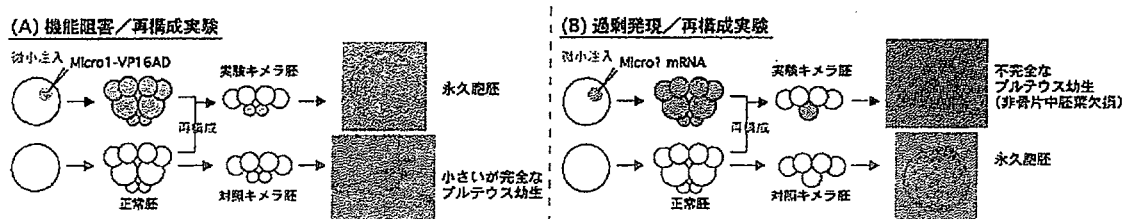


図2 *Micro1* 遺伝子の機能解析

2. Krl は非骨片中胚葉形成に必要であり、その発現は動物割球に内中胚葉形成能力を与えることができる

micro1 機能解析の結果は、小割球の役割②には *micro1* だけでは不十分であり、別の因子が非骨片中胚葉誘導に関わっている可能性を強く示唆している。その因子は 16 細胞期の小割球で発現している遺伝子である可能性が高く、その条件を満たす遺伝子のひとつに *Kruppel-like (Krl)* があった。Howard et al. (2001) は、核 β -catenin の標的遺伝子として *SpKrl* を単離した。その発現は 16 細胞期の小割球に始まり、大割球子孫細胞へと移行していく。彼らは MASO によるロックダウン胚において PMC は正常に移入するのに対して、原腸形成が遅れることから、*SpKrl* が内胚葉形成に関わっていると推論した。しかし、Howard らが行った全胚での機能阻害では原腸形成不全の原因が小割球と大割球のどちら側にあるのかわからない。また、原腸形成には内胚葉細胞だけでなく、非骨片中胚葉細胞も関わっている。しかし彼らは発生の途中までしか観察せず、非骨片中胚葉形成について注意を払っていないため、*Krl* が内胚葉形成だけに関与しているのか、あるいは非骨片中胚葉形成にも関与しているのかが不明であった。

第 2 部では、割球再構成実験を用いて *HpKrl* の各割球での機能を解析し、特に非骨片中胚葉形成に関与するかを観察した (図 3)。(1) まず Howard らの行った MASO による全胚での *Krl* ロックダウンを追試した。ロックダウン胚は原腸形成の遅れを示したが、本研究ではその後の発生の観察から、内胚葉よりもむしろ非骨片中胚葉形成が阻害されることを発見した (図 3A①)。また小割球交換実験 (図 3A②) は、(2) *Krl* は小割球特異化に必要ではない可能性を示した。小割球除去実験 (図 3A④) は、(3) *Krl* が大割球の細胞自律的な内中胚葉形成 (前特異化) に必要であることを示した。さらに、この小割球除去胚への正常小割球の再移植は (図 3A③)、(4) 大割球が小割球の誘導シグナルを受容して *Krl* 非依存的に内胚葉をつくることができる一方、大部分の非骨片中胚葉形成は *Krl* 依存的であることを示した。小割球と大割球間の相互作用には、Delta-Notch 経路が中心的な役割をしている (Sherwood et al., 1999; Sweet et al., 2002)。*Krl* はこの経路の構成要素としてではなく、平行した effector として非骨片中胚葉形成を促進すると考えられる (図 4)。これらの実験結果は、これまで不明であった *Krl* の遺伝子調節ネットワークにおける位置を明らかにするとともに、同じシグナリングが受容側の調節状態によって異なった分化状態を生み出す、という動物発生に普遍的な現象を例示した。

一方、(1) *Krl* 過剰発現は、PMC 領域を拡大させた (図 3B⑤)。(2) この PMC 領域の拡大は *micro1* 異所発現を介していた (図 3B⑥)。この観察は、小割球において *Krl* が *micro1* 発現を維持していることを示唆する (図 4)。また、(3) *Krl* 発現は動物割球に内中胚葉形成能力を与えるだけでなく、完全なオーガナイザー活性をも与えた (図 3B⑦⑧)。つまり *Krl* は *micro1* と異なり、動物割球に小割球の役割①と②の全てを与えることができた。以上の実験結果から、*micro1* と *Krl* の共発現が動物割球に完全な内中胚葉組織を作るのに十分であることが示唆された。

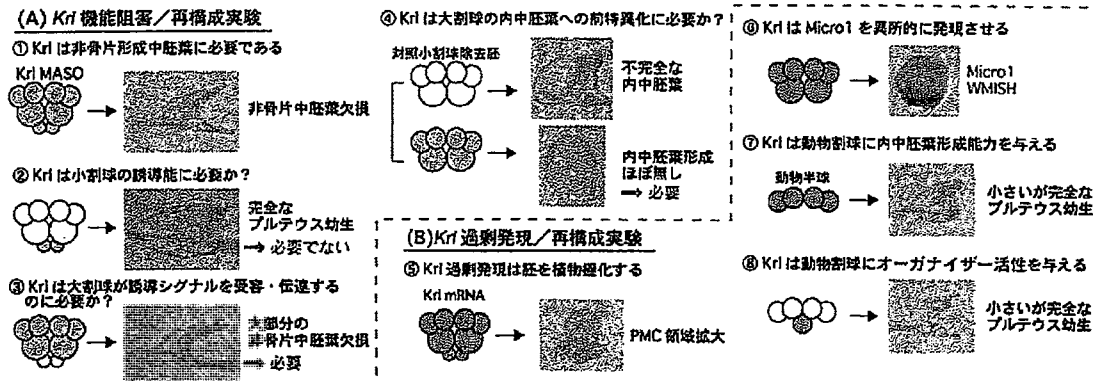


図3 *Kri* の各割球における機能解析

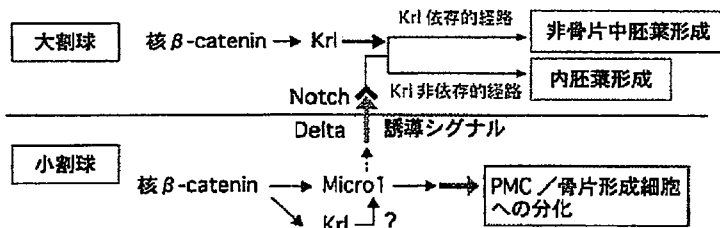


図4 小割球特異化と内中胚葉形成の分子機構

3. *micro1* の構造と機能の相関

micro1 は N 末側に paired-type のホメオドメイン (HD)、C 末側に 2 つの eh1 に似たモチーフを含む Serine-rich repeat (SR) を持つ転写抑制因子である (図

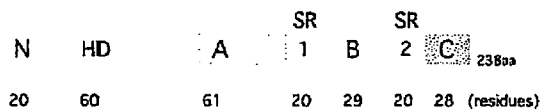


図5 *micro1* の構造

5)。Paired-type のホメオドメインはその 60 アミノ酸だけで、協力的にホモもしくはヘテロ二量体を形成することが報告されている (Wilson et al., 1993)。また、eh1 モチーフは Groucho を含む co-repressor と結合し、転写抑制にはたらくことが知られている (Copley, 2005)。しかし、これまでに *micro1* のどの領域が転写抑制機能に関与しているのかはわかっていない。

最近、Revilla-i-Domingo et al (2007) は、小割球特異化が *micro1* と HesC の二重抑制メカニズムによって調節されていることを明らかにした。つまり、小割球系譜でのみ活性化された *micro1* が、ユビキタスな転写抑制因子 *hesC* を抑制することで、下流の小割球特異化に関わる遺伝子 (*Tbr*, *Alx*, *Delta*) の活性化を positive に調節する (図 6)。しかし、実際にこの二重抑制がどのような機構でなされているのかは不明であった。

micro1 過剰発現は胚の全ての細胞を PMC 表現型細胞へと運命変更させる (図 7B-H)。第 3 部では、この活性を指標として、*micro1* の構造と機能の相関関係を調べた。便宜上、*micro1* を 7 つの領域 (N-HD-A-SR1-B-SR2-C) に分け (図 5)、各領域を削除・変異導入した変異型をコードする mRNA を卵に注入し、その表現型を解析した。その結果、以下のことが明らかになった。(1) 核移行シグナルは A 領域に存在する。(2) ホメオドメインの DNA 結合能力は *micro1*

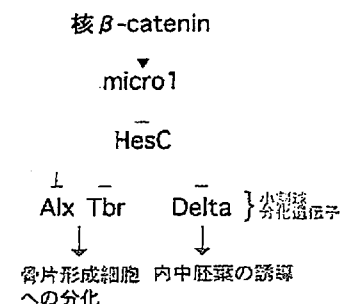


図6 小割球特異化の分子機構

の PMC 化活性に必要である(図 7I-K)、しかし、二量体化は必ずしも必要ではない。(3) PMC 化活性に十分な最小ユニットは、(N-HD-A-SR1) もしくは (N-HD-B-SR2) (図 7L-O)である。このとき、A もしくは B は、単なるスペーサーとして必要なのではない。(4) 最小ユニットの SR にある eh-1 様モチーフに、Groucho と相互作用できなくなるような変異を導入すると、PMC 化活性が失われた。この観察は、micro1 が SR の eh1 様モチーフを介して Groucho と相互作用し、*hesC* を抑制することを示唆する。

(5) しかし、2つの SR を削除・変異導入した変異型でも PMC 化活性だけでなく、*hesC* 抑制能力をも保持した(図 7P-S)。これにより、SR 以外にも、eh-1/Groucho とは異なるメカニズムで *hesC* を抑制できる領域が存在することが示された。また、この変異型から C 領域を削除すると PMC 化活性が失われることから、その領域は C である可能性が高い(図 7T, U)。以上の観察は、micro1 の転写抑制機構に SR と C 領域を介した 2つのメカニズムが存在することを示唆する。

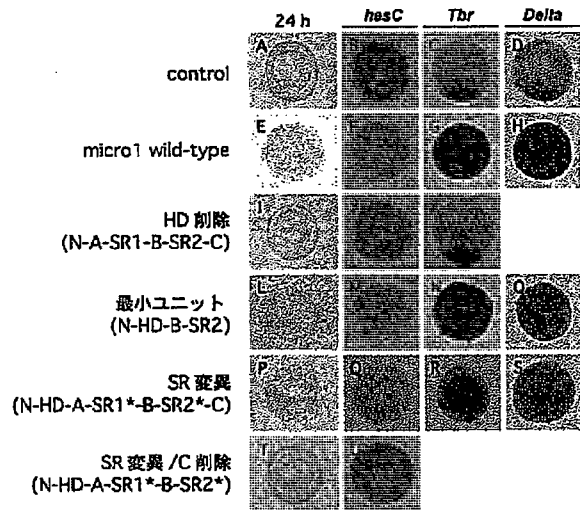


図 7 micro1 変異型過剰発現胚の表現型

学位論文審査結果の要旨

山崎氏から提出された学位論文について、上記5名の審査委員による査読の後に平成20年8月8日に口頭発表会が行われた。同日に最終の審査委員会が開かれ、審議の結果以下のとおり判定した。

ウニ 16 細胞期胚の植物極に形成される小割球は胚の形成中心である：細胞自律的に骨片形成細胞へと分化するだけでなく、隣接する大割球へ内中胚葉を誘導するシグナルを放出する。本論文は3部からなる。第1部において、小割球特異的に発現する *micro1* ホメオボックス遺伝子が小割球の分化と内胚葉誘導能に十分であることを明らかにした。第2部では、*Krüppel-like* 遺伝子の機能解析をおこない、この遺伝子が小割球子孫細胞による小割球シグナル受容と、自律的な中胚葉形成のいずれにも必要であることを示すと同時に、これまで不明であった発生調節遺伝子ネットワーク中での *Krüppel-like* 遺伝子の位置を明らかにした。第3部において、転写抑制因子である *micro1* の構造-機能相関を解析し、5つのドメイン/モチーフを同定するとともに、*micro1* が標的 *hesC* 遺伝子を2つの異なるメカニズムで抑制していることを提示した。本論文は、現在の発生生物学において中心的問題である小割球特異化と中胚葉形成の分子機構を明らかにしただけでなく、古典的な実験発生学の結果に現代的な解釈を与えたと評価され、学位論文に値すると判断した。