

論文内容の要旨

申請者氏名 渡邊 忠由

脊椎動物をもっとも特徴づけている体の前後軸に沿った分節構造は、初期胚における体節分節により規定される。分節化は、未分節中胚葉 (presomitic mesoderm; 略称 PSM) の前方から、体節が一對ずつ形成されることによって進行する。現在までに PSM の分節化機構に関して、1) 主にニワトリ胚を用いた分子操作と組織移植により、次分節部位の後方に位置する細胞が分節境界の誘導活性 (セグメンター活性) を有すること、2) ノックアウトマウスの解析から、転写因子 *Mesp2* が分節化に必須であることなどの知見がある。しかしながら、分節境界形成時における *Mesp2* とセグメンターの関係、また続いて起こるダイナミックな分節現象を説明し得る分子機構は不明であった。

そこで本研究では、この分子機構を解明する手がかりを得るため、次分節部位に特異的に発現するトリ *cMeso1* (マウス *MesP2* のホモログ) に注目し、トリ胚操作を用いてセグメンターの分子実体に迫ることとした。従来よりセグメンターアッセイで中心となる方法論は、目的とする遺伝子をエレクトロポレーション法を用いて PSM 内に強制発現させることである。このときテクニカルな制約から、原腸陥入以前の予定中胚葉細胞をターゲットとする必要がある。また、従来のエレクトロポレーション法では、もっぱら恒常活性型プロモーター (CAGGS) をもつ発現ベクターが用いられており、このプロモーターは遺伝子導入後数時間で活性化されることが知られている。本研究では、まずこのような従来の発現ベクターを用いて、*cMeso1* を PSM 内で発現させることを試みた。ところが、*cMeso1* は原腸陥入の過程そのものに影響を与えてしまい、中胚葉細胞の陥入が正常におこらず、セグメンター活性の解析ができなかった。そこでこの問題を解決するために、ニワトリ胚において時期特異的に遺伝子発現を誘導できる Tet-on システムを確立した。この系では、テトラサイクリンを投与する時期を調節することによって、外来遺伝子の発現を時期特異的にコントロールできる。実際に *cMeso1* を Tet-on 系と組み合わせると、上記の問題はおこらず、*cMeso1* 強制発現の影響を PSM 内で解析することが可能となった。そこで、本来の目的であるセグメンターアッセイをするために、組織移植と組み合わせ *cMeso1* の発現境界を異所的に作ったところ、その部分で新たな分節境界の形成が見られた。

cMeso1 は、分節境界の形成における分子カスケードの上流に位置することが予想されたため、次に *cMeso1* の下流で、どのような分子カスケードが存在するのかについて解析した。まず *cMeso1* によって発現が上昇する計 5 種類 (*EphA4* を含む) の分子を見出し、次にそれぞれについて分節誘導能を解析したところ、*EphA4* のみが分節誘導能を示した。このことから、分節境界が形成される際、次分節境界を挟んでその後方で *Eph* が作用し、その結果として前方に隣接する細胞で *ephrinB2* が活性化されることが予想された。解析の結果、次分節境界の前方細胞で *ephrinB2* が活性化されるだけで、分節境界の形成に十分であることがわかった。これらの結果から、セグメンターの分子実体は、*ephrinB2* の活性化であると結論づけられた。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 渡邊 忠由

脊椎動物における体の分節化は、脊椎動物をもっとも特徴づける重要な形態形成過程の一つであり、その分子メカニズムを解明することは、個体発生の研究のみならず、地球上における動物の多様性と生存戦略、そして進化の謎への挑戦という意味でも、重要な問題と位置づけられる。近年、細胞内における分子シグナル機構については膨大な知見が蓄積されつつあるが、それに比べて、実際に多細胞構築の中で細胞はどのようにして「かたち」を作るのか、という大局的な見地に立った解析は非常に少ないのが現状である。その理由の一つとしては、これらの問題を解くためのモデル系が乏しいことが挙げられる。申請者は本研究において、トリ胚の分子操作と移植操作を組み合わせたというユニークな解析系を發展させ、隣り合う細胞同士の、しかも片方の細胞においてのみ反発因子 (Ephrin) が活性化すれば、分節化というダイナミックな形態変化が引き起こされることを見出している。

本研究では、転写因子である cMeso1 が、境界形成を引き起こす一連の分子カスケードの上流に位置する、という知見が基軸になっている。しかし、そこにたどり着くには、従来のトリ胚 in ovo エレクトロポレーション法では不可能であった。そこでまず申請者は、トリ胚では初めてとなる、時期特異的遺伝子発現システム Tet-on 法を開発した (論文中には Tet-off の詳細な方法論の記載もある)。次にこの方法論と、トリ胚顕微移植法を組み合わせ、cMeso1 が非常に高い効率で分節境界を誘導することを見出した。この発見を引き金として、cMeso1 の複数の下流因子について解析を進め、その結果、Eph や ephrin という細胞反発分子が、分節境界の形成機構の中心的な役割を担うことが見えてきた。Eph-ephrin は、神経細胞や消化器系幹細胞において領域化に関与することが知られている、極めて重要な細胞間シグナル分子である。興味深い発見として、作られるべき境界の前方細胞で ephrin が働くだけで境界形成に十分であるという、予期しなかった知見が挙げられる。つまり後方細胞で cMeso1 が Eph の発現を誘導するのは、その Eph が前方に隣接する細胞の ephrin を活性化させるためであり、Eph の細胞内シグナル自身は必要ではないのである。この知見は、境界形成の機構を考える上で極めて新規であり、意義深い。これらをさらに進展させることにより、これまでほとんど未知であるところの、ephrin を介した細胞内シグナルと、境界形成というダイナミックな細胞挙動とのつながりについて、新たな知見を得ることができよう。体節をモデルとした境界形成の分子機構は、神経系組織の領域形成の機構とも共通することが期待される。以上のように、本論文は、体作りにおける境界形成の普遍原理の理解という意味で、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。