

論文審査の結果の要旨

氏名 池田貴史

本論文は要旨、序論、第1章、第2章、第3章、第4章、第5章、考察、図表、文献からなり、脊索動物の左右非対称性形成における Nodal シグナル制御機構について、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* およびゼブラフィッシュ *Danio rerio* 胚を用いて広汎な解析を行った結果を論じている。

脊椎動物の内部器官の多くは左右非対称な形態を持つ。この左右非対称性は初期胚の側板中胚葉において左側特異的に *Nodal* や *Pitx2* などの遺伝子が発現することに起因するが、複雑な構造を持つ胚の中で安定に左右非対称な遺伝子発現を確立する機構には未だ不明な点が多い。先行研究からは、胚後方に位置する左右軸オーガナイザー (LRO) から分泌される Nodal リガンドが左側側板中胚葉へのシグナル伝達を担う一方、胚の右側においては Nodal 阻害因子である *Dand5* が Nodal シグナルを抑制して非対称な遺伝子発現を誘導することが提唱されている。しかし、このリガンドの機能モデルは遺伝学的な解析に依拠しており、*Nodal* や *Dand5* の細胞外における挙動およびその制御機構を詳細に解析した例はない。

第1章では、アフリカツメガエル胚を用いて左右軸形成に関与するリガンド群 (左右軸リガンド) の細胞外での分布様式の観察を行い、*Nodal* 活性化因子として知られる *Gdf1* が *Nodal* とのヘテロダイマー化に伴い細胞外基質の一種であるヘパラン硫酸との相互作用をもたらすこと、および *Nodal* 阻害因子である *Dand5* も同様にヘパラン硫酸と相互作用することを見出した。さらに分泌性ヘパラン硫酸コアタンパク質である *Hspg2* と *Agrin* が背側中胚葉に発現し、左右非対称な遺伝子発現に必要であることを機能阻害実験により示した。これらの研究から、ヘパラン硫酸による細胞外での左右軸リガンドの分布制御という現象を新たに発見し、以降の解析の基盤とした。

第2章では、*Nodal-Gdf1* とヘパラン硫酸の相互作用の分子的基盤について生化学的解析を行い、*Nodal* タンパク質内のヘパリン (ヘパラン硫酸の類似体) 結合部位を同定した。さらに、*Nodal* タンパク質が従来想定されていたようなホモ二量体ではなく単量体として存在することを示し、*Gdf1* との二量体化に伴うシグナル増強機構を説明する重要な知見を得た。

第3章では、左右軸形成期における左右軸リガンドの細胞外分布様式を解析するため、ゼブラフィッシュ遺伝子組換えシステムを用いた実験系を新規に構築した。*dand5* のプロモーター配列を利用して LRO 特異的に *Nodal* と *Gdf1* を発現するシステムを作製し、膜係留型ナノボディを活用した検出系を組み合わせることにより、LRO から分泌される *Nodal-Gdf1* が側板中胚葉に直接拡散しうることを初めて示した。また、同様の手法により、LRO から分泌される *Dand5* がヘパラン硫酸との相互作用を介して脊索の周囲に蓄積することを示し、*Dand5* が脊

索周辺に蓄積することにより Nodal の右側への拡散を阻害する中軸バリアとしての機能を持つことを新たに提唱した。これらは、細胞生物学的な解析に基づいて左右軸リガンドの役割に関する従来のモデルを見直し、新たなモデルを提唱した点で意義ある成果である。

第4章では、ヘパラン硫酸による左右軸リガンドの分布制御機構が無脊椎動物においても保存されているかを検討し、脊椎動物に特有な左右非対称性形成機構に対する進化発生学的な考察を試みた。カワヤツメ *Lethenteron japonicum*、カタユウレイボヤ *Ciona intestinalis*、ヒガシナメクジウオ *Branchiostoma japonicum*、ハリサンショウウニ *Temnopleurus reevesii* の5種の後口動物の左右軸リガンドオーソログを単離し、ツメガエル胚に発現させた際の細胞外分布様式を解析したところ、カタユウレイボヤ、ヒガシナメクジウオ、ハリサンショウウニの Nodal-Gdf1 およびヒガシナメクジウオの Dand5 がヘパラン硫酸と相互作用することが見出された。さらに、先行研究において取得された一細胞 RNA シーケンスデータの再解析から、ヘパラン硫酸合成関連遺伝子が後口動物の左右軸形成期胚においても空間的に限局した発現を示すことを明らかにした。これらは、ヘパラン硫酸が Nodal シグナル制御において進化的に保存されたプラットフォームとして機能する可能性を示した新規な知見である。

第5章では、第3章において樹立したゼブラフィッシュ遺伝子組換え系統 (*dand5:EGFP*) を利用し、LRO 構成細胞の詳細な系譜解析を行った。側板中胚葉における左右非対称な遺伝子発現の確立後に LRO は退化するが、その構成細胞は一部がプログラム細胞死により除去される一方で、大半は上皮間充織転換を起こして移動能を獲得し、隣接する未分化中胚葉である沿軸中胚葉と chordoneural hinge に移動することが明らかになった。さらに、移動後の LRO 構成細胞は周囲の中胚葉細胞と類似した遺伝子発現を示し、成熟した中胚葉組織に組み込まれることが明らかになった。この知見は LRO 構成細胞が正常発生において脱分化と再分化を伴う分化転換を起こしていることを示唆しており、今後の展開が期待される。

本論文のうち、第3章の一部と第5章の内容は発生生物学の専門誌である *Development, Growth & Differentiation* 誌に受理され、出版予定である。

また、本論文における解析は全て論文提出者が主体となってなされたもので、論文提出者の寄与が十分であると判断する。

したがって、博士（理学）の学位を授与できると認める。