

論文の内容の要旨

Study of Zn finger proteins and the homeodomain protein Otx2 in early *Xenopus* eye development

(ツメガエルの眼の初期発生に関わる Zn フィンガー蛋白質とホメオドメイン蛋白質 Otx2 に関する研究)

佐藤 夢子

序論

脊椎動物の眼の初期発生は、前脳領域の中央部に eye field (眼の発生野) が定まることから始まる。この形成過程において、bicoid 型転写因子をコードする *otx2* は、後方に発現する *gbx2* や *meis3* と相互に抑制し合い、脳領域を定めると共に、eye field 特異的遺伝子 *rax* や *pax6* を活性化し、eye field の特定化に関与する。このように *otx2* は、これらの遺伝子間相互作用やカスケードの上流で中心的役割を担っているが、上記の遺伝子カスケードだけでは eye field が定まる機構は十分に説明できない。また、Otx2 転写因子がもつ転写活性化作用と抑制作用の切り替え機構や、結合パートナーの存在に関しても不明な点が多い。そこで新たな転写因子の解析が必要と考え、その候補として、前方神経板に発現する遺伝子のうち (Takahashi et al., 2005)、eye field に発現が認められた *zbtb11* と *znf668* に注目し解析を進めた。さらに Zbtb11 と Znf668 が Otx2 と蛋白質間相互作用することを見出したこと、および Otx2 が翻訳後修飾を受けることから、翻訳後修飾修飾の意義についても解析した。

本研究の第一章では Zbtb11 と Znf668 に主点を置き、両因子が Otx2 と物理的に相互作用すること、また Otx2 の転写活性を調節する因子であることを示す。第二章では、Otx2 の翻訳後修飾について解析し、これが Cdk 依存的なリン酸化修飾であること、修飾の有無により Otx2 の転写因子としての機能に変化すること、さらにリン酸化修飾依存的に Zbtb11 や転写抑制補助因子の TLE と転写抑制性複合体を形成し Otx2 の抑制性標的遺伝子の発現を制御することを示す。

本論文の最後には、Otx2 の転写活性制御モデルを提示し、前方神経板と頭部オーガナイザーでの細胞増殖と分化制御の分子機構の一端を説明する。

Chapter I : 眼の初期発生における Zbtb11 と Znf668 の解析

まず *zbtb11* と *znf668* の発生ステージごとの発現パターンを解析し、その結果、神経外胚葉から eye field に限局していくことが示された。次に機能亢進実験と機能阻害実験を行い、*zbtb11* は、*gbx2* の発現を抑制し神経板でのパターンニングに関与する一方、*znf668* は *otx2* 下流の *rax* の発現を制御し眼の発生に関わることを示した。その際、Zbtb11、Znf668 が共に *Otx2* の標的遺伝子の発現に作用することから、これら Zn フィンガー蛋白質と *Otx2* との転写因子間での機能的関連性を考えた。

そこで物理的相互作用について共免疫沈降法 (Co-IP) で検討したところ、Zbtb11、Znf668 は共に *Otx2* と相互作用することが示された。次に、遺伝子調節における *Otx2* との機能的関連性を検討するため、*Otx2* の活性化あるいは抑制性シス制御領域を用いたルシフェラーゼレポーターアッセイを行った結果、Zbtb11 が *Otx2* の転写抑制作用を増強する一方、Znf668 は *Otx2* の転写活性化を阻害することが示された。

これらのことから、Zbtb11 と Znf668 は *Otx2* と直接相互作用することによって、*Otx2* の転写抑制及び活性化作用を調節すること、およびその相互作用が眼の初期発生過程に重要な役割をもつことが示唆された。

Chapter II : *Otx2* のリン酸化修飾による細胞増殖と細胞分化の制御機構の解析

Otx2 の翻訳後修飾の機能的意義を明らかにするため、まず *Otx2* の修飾部位 (計 4 箇所) を同定した。次に蛋白質脱リン酸化酵素、及び Akt リン酸化部位特異的抗体を用いることで、*Otx2* の修飾が全てリン酸化であることが示された。また、約 800 個体のアフリカツメガエル胚を用いることで、内在性 *Otx2* のリン酸化修飾の検出に成功した。

次に *Otx2* のリン酸化酵素を同定するため、数種類のリン酸化酵素を検討した。その結果、サイクリン依存性リン酸化酵素 (Cdk) の活性化により *Otx2* の修飾は亢進され (図 1 左)、Cdk 阻害因子 p27^{xic1} により阻害された (図 1 右)。以上より、*Otx2* は Cdk 活性依存的にリン酸化修飾を受けることが示唆された。

そこで *Otx2* のリン酸化修飾の発生過程への役割を解析するために、4 箇所のリン酸化部位の疑似リン酸化変異体 (4E) と非リン酸化変異体 (4A)

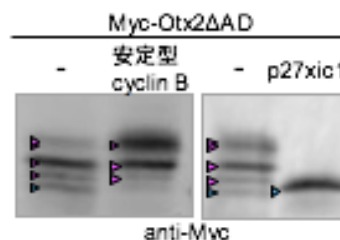


図1. Cdk活性依存的な*Otx2*のリン酸化修飾。安定化型cyclin B注入による*Otx2*のリン酸化修飾の亢進(左)とCdk阻害因子p27^{xic1}注入による*Otx2*のリン酸化修飾の阻害(右)。Mycタグ付き*Otx2*のC末端側欠損コンストラクトを抗Myc抗体を用いたウェスタンブロットで解析。(矢尻)マゼンタは修飾バンド、青色は新生バンドを示す。

を作成し、両者の活性を比較した。まず眼の発生への影響を解析するため、予定眼胞領域に過剰発現したところ、4E 変異体は野生型と同様に眼の縮小を引き起したが、4A は眼胞領域を拡大した。そこで眼のマーカー遺伝子の発現を調べたところ、eye field マーカーの *rax* の発現は、4E では変化が見られなかったが、4A により発現が拡大した。さらに後期神経胚では眼柄マーカー *pax2* はどちらの変異体でも低下したが、眼胞マーカー *six3* と *pax6* の発現は 4A でのみ拡大した。これらの結果から、Otx2 のリン酸化修飾は eye field 形成や眼胞領域でのパターンニングに参与すること、またリン酸化型 Otx2 と非リン酸化型 Otx2 が眼の表現型に対して、反対の活性を持つことが示唆された。

次に Otx2 の細胞増殖促進作用について、有糸分裂マーカーのリン酸化ヒストン H3 (PH3) の発現を免疫染色にて検討したところ、4E によって PH3 染色の核数が増加し、細胞密度も増加するが、4A によっていずれも減少することが示された。Otx2 が抑制する標的遺伝子として細胞増殖阻害因子 *p27* が報告されているので、その点も検討した。その結果、4E で *p27^{xicl}* が抑制され、4A では顕著な変化がみられなかったことから、Cdk 活性依存的な Otx2 のリン酸化が、細胞増殖阻害因子を抑制するという、正のフィードバック機構が示唆され、リン酸化の役割がより明確に示された。

Otx2 の転写制御にリン酸化がどのように関わるかも検討した。転写抑制の標的遺伝子 *gbx2* は、4E で抑制されるが、4A では強く抑制されなかった (図 2 左)。一方、転写活性化の標的遺伝子 *xcg1* は、4E と 4A により異所的に発現が増加した (図 2 右)。この結果から、リン酸化型 Otx2 は転写抑制作用と活性化作用の両方をもつ一方、非リン酸化型は転写活性化作用のみをもつことが示唆された。そこで、どのようにリン酸化 Otx2 が転写抑制型に変換するかを検討するため、転写補助因子 TLE との相互作用を Co-IP で検討した。その結果、TLE は野生型及び 4E と結合するが、4A とは結合しにくいことが示めされた。つまり Otx2 のリン酸化修飾依存的な転写抑制活性の要因の 1 つは TLE との相互作用であることが示唆された。

転写制御に関してレポーターアッセイを用いて検討した。頭部オーガナイザーでの Otx2 の抑制性パートナー Gooseoid との相互作用では、野生型、4E、4A のいずれも Gooseoid と TLE による転写抑制活性を増強した。このことから、Gooseoid、Otx2、TLE の 3 者間の転写抑制作用に

は、Otx2 のリン酸化修飾は関与しないことが示唆された。しかし興味深いことに、Zbtb11 による Otx2 の転写抑制活性の増強作用は 4E に対して作用するが 4A には作用しないことが示された。そこで、

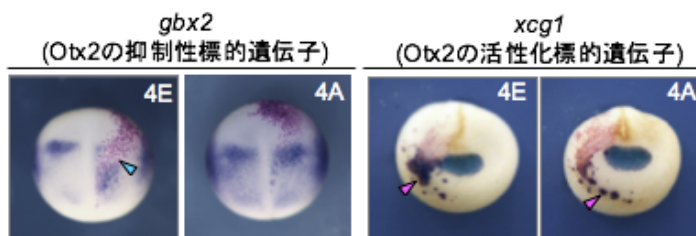


図2. Otx2のリン酸化部位変異体導入による標的遺伝子への影響。擬似リン酸化変異体4Eと非リン酸化変異体4A導入後、WISH法で検討。赤の染色は各Otx2コンストラクト発現細胞。(矢尻)青色は減少、マゼンタは異所的な発現を示す。

Otx2 のリン酸化修飾が、Zbtb11 との相互作用に関わるかを Co-IP で検討した結果、Zbtb11 は野生型及び 4E と共沈するが、4A とは共沈しにくいことが示めされた。したがって、Zbtb11 と Otx2 との抑制作用は Goosecoid の場合と異なり、Otx2 のリン酸化修飾に依存することが示唆された。

結論

以上の結果を基に Otx2 の機能と発生における役割のモデルを示す (図3A)。神経外胚葉の増殖中の細胞では、Otx2 はリン酸化型となり、*p27^{xic1}* を抑制することで細胞増殖を促進し、同時に後方化を抑制することでパターン形成に関与する。一方、増殖が停止して分化に向かう細胞では、Otx2 は非リン酸化型となって網膜分化に関与するという翻訳後修飾により役割が切り替わるモデルである。加えて、Otx2 の転写活性に対する翻訳後修飾と相互作用するパートナー転写因子による制御機構のモデル図を示す (図3B)。細胞増殖の盛んな前方神経板では、Otx2 は TLE や Zbtb11 とリン酸化修飾依存的に抑制性複合体を形成する一方、細胞増殖が低下した頭部オーガナイザーでは、Gsc、TLE とのリン酸化非依存的な複合体形成により、標的遺伝子の発現を抑制することが示唆された。このように、増殖が盛んな組織では、Otx2 のリン酸化修飾を介することで、増殖促進とパターン形成をカップルさせた制御を可能したと想像される。一方、増殖が低下した細胞では、リン酸化を受けない Otx2 はそれ自身転写活性化能のみをもち、主として細胞分化の方向で働く。この作用に対しては、Znf668 が制御性の制御因子として機能すると考えられる。

本研究によって、前方神経板形成と眼の形成における遺伝子カスケードで中心的役割を担う Otx2 を制御する 2 つの新規転写因子と、Cdk 依存的リン酸化修飾を介した Otx2 の新たな活性調節機構を見出した。

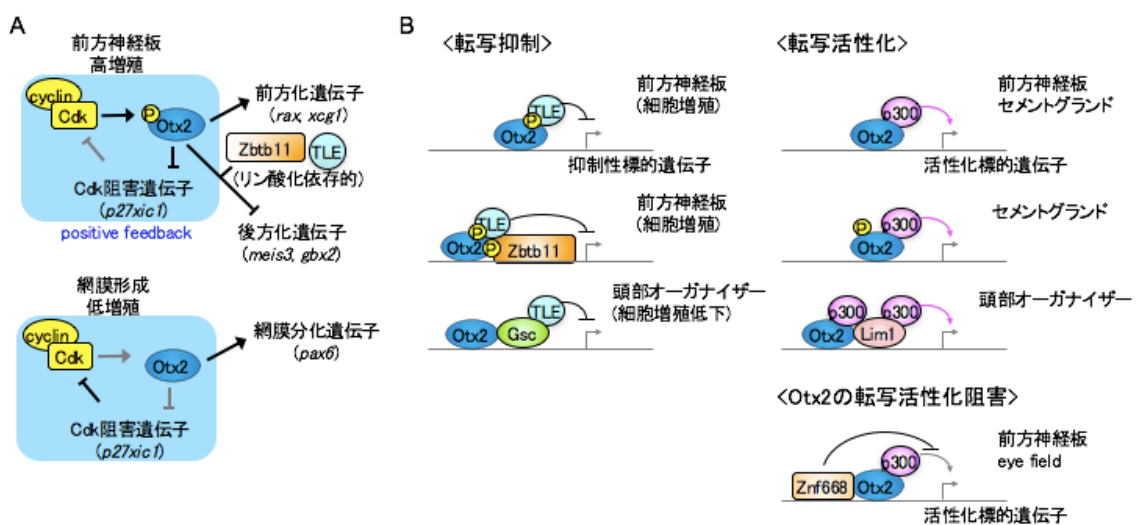


図3. Otx2の役割の切り替え機構 (A) と転写活性制御機構のモデル図 (B)。