

博士論文

プラコード形成に関わる新規遺伝子の同定および機能解析

(Identification and characterization of the new novel gene
involved in development of the placode)

東京大学大学院 総合文化研究科

広域科学専攻 生命環境科学系

渡邊 朋子

目次

略語一覧	1
要旨	2
全体背景	4
第1章 プラコード形成に関わる新規遺伝子の同定	7
1. 要旨	8
2. 背景	9
3. 実験方法	12
4. 結果	
4-1 アニマルキャップを用いた誘導系の確立	15
4-2 予定プラコード様細胞誘導条件の検討	15
4-3 前方・側方・後方プラコードの誘導条件の検討	17
4-4 FGF シグナル調節による予定プラコード様細胞誘導条件の検討	18
4-5 新規予定プラコード関連遺伝子の同定	19
5. 考察	20
第2章 新規プラコード遺伝子 <i>Fam46a</i> の機能解析	23
1. 要旨	24
2. 背景	25
3. 実験方法	27
4. 結果	
4-1 ツメガエル胚における <i>Fam46a</i> の発現パターン解析	30
4-2 <i>Fam46a</i> の過剰発現胚および機能阻害胚の表現型観察	32

4-3	<i>Fam46a</i> 発現による外胚葉パターンニングの変化	33
4-4	ヌクレオチド転移酵素 <i>Fam46a</i> の細胞内局在観察	35
4-5	<i>Fam46a</i> と BMP シグナルの関連性の検証	37
4-6	<i>Fam46a</i> と BMP シグナル構成因子 Smad1 および Smad4 との相互作用	39
4-7	<i>Fam46a</i> による Smad1 の発現量変化の解析	41
4-8	<i>Fam46a</i> による BMP シグナルターゲット遺伝子の転写活性化への影響	43
4-9	<i>Fam46a</i> による <i>Vent1</i> , <i>Vent2</i> mRNA の安定化への影響	44
5.	考察	46
	結論	49
	参考文献	52
	図表	57
	謝辞	89

略語一覽

BMP: Bone Morphogenetic Protein

Chd: Chordin

CG: Cement Gland

Dkk-1: Dickkopf-1

Eya: Eyes Absent family

Fam: Family with sequence similarity

FGF: Fibroblast Growth Factor

Fox: Forkhead box containing gene

GFP: Enhanced Green Fluorescent Protein

MO: Morpholino Oligonucleotide

Neurod: Neuronal differentiation gene

Pax: Paired box containing gene

PBS: Phosphate-Buffered Saline

PRDM: PR/SET Domain containing gene

RT-PCR: Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

Six: Six homeobox containing gene

Snail: Snail family zinc finger containing gene

Sox: SRY-box containing gene

SS: Steinberg's Solution

Vent: Ventral expressed homeobox containing gene

XK: *Xenopus* Keratin

Zic: Zinc finger of the cerebellum containing gene

要旨

プラコードは脊椎動物の発生において、感覚神経関連器官の原基として作られる、外胚葉由来の組織である。プラコードの原基となる予定プラコードは、初期発生において表皮と神経板の境界に形成され、その後脳下垂体前葉、嗅上皮、水晶体、三叉神経、側線、耳胞等の感覚神経関連器官に終分化する。本研究においては、この予定プラコード形成機構解明および新規予定プラコード関連遺伝子の同定とその機能解析を目的として研究を行なった。

第1章においては、胚において外見からの組織の正確な識別が難しく、単離が困難であった予定プラコード細胞を、多能性のあるツメガエルの外胚葉細胞から特異的に誘導する系を確立した。その中で BMP シグナル活性の強度のみを適切に調節することにより、予定プラコード様細胞を特異的に誘導出来ることを示した。さらに BMP シグナル活性強度の調節に加えて、Wnt シグナル活性強度を調節することで、予定プラコードに引き続いて形成される、前方プラコード、側方プラコード、後方プラコードの各プラコード様細胞を誘導出来ることも示した。最後に、誘導した予定プラコード様細胞群を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、新規予定プラコード関連遺伝子として *Fam46a* を同定した。

次に第2章においては、同定した新規予定プラコード関連遺伝子 *Fam46a* について詳細な機能解析を行なった。*Fam46a* は原腸胚期から初期幼生期にかけて発現しており、神経胚期には予定プラコードで、尾芽胚期には鼻、鰓、耳の各プラコードで発現していた。*Fam46a* を機能阻害すると、予定プラコードが欠失あるいは欠損し、一方で神経堤が拡大することが分かった。このことは *Fam46a* が予定プラコード形成に必須とされ、神経堤形成に対しては阻害的に作用することを示唆した。そこでその作用機序として、外胚葉パターンニングに役割を持ち、かつ先行研究で *Fam46a* との関連性が示唆されていた BMP シグナルに着目した結果、*Fam46a* は BMP シグナル構成因子 Smad1 および Smad4 と相互作用しており、さらに *Fam46a* 自身も核移行して BMP シグナルターゲット遺伝子のプロモーター領域に結合することで転写を活性化させていることが示された。また *Fam46a* が Smad1 タンパク質の安定化や BMP シグナルターゲット遺伝子の mRNA の安定性を制御していることも明らかとなり、多数の機構により BMP

シグナルを促進していることが示された。総じて、本研究の成果は予定プラコード形成機構の一端を解明することに貢献したと考える。

全体背景

動物の初期発生においては受精卵の状態から卵割と呼ばれる特殊な体細胞分裂が起こり、単細胞が多細胞へと分かれ、細胞同士が密に相互作用することで各原基や組織が分化していく。その過程で役割を担っているものとして一連のシグナル伝達やそれに伴う遺伝子発現が挙げられる。それらの複雑な相互作用は各細胞の予定運命を決定しており、その際にモルフォゲンと呼ばれる分泌タンパク質が重要な役割を担っていることが知られている。モルフォゲンは胚の内部で濃度勾配を形成している分泌因子であり、その濃度条件が変化することで異なる遺伝子発現や細胞の予定運命が引き起こされる(Wolpert, 1969; Crick, 1970)。したがってモルフォゲンの局所的な濃度は直接位置情報として変換され、それにより各組織への分化が進んでいく。

初期発生におけるこのような複雑なメカニズムの解明に用いる実験材料として、アフリカツメガエルが古くから用いられてきた。アフリカツメガエルは哺乳類と比較すると発生のスピードが速く、一度に多くの胚を得ることが出来るという特徴がある。さらにシグナル伝達経路においても哺乳類との類似性が高いことから、これまで広く研究に用いられてきた。アフリカツメガエルにおいては BMP および Wnt, FGF, レチノイン酸等がモルフォゲンとして機能していると考えられている (Kengaku et al., 1995; Dosch et al., 1997; Kiecker et al., 2001)。具体的には BMP の濃度勾配は背腹軸方向のパターニングを形成し、一方で Wnt, FGF, レチノイン酸シグナルの濃度勾配は外胚葉の神経領域における前後軸方向のパターニングを形成している。

本研究ではツメガエルを実験材料として用い、表皮や神経等が分化する外胚葉の形成機構、特に先行研究の少ないプラコードの形成機構に着目し、その解明を目指した。プラコードは外胚葉由来の組織であり、様々な頭部の感覚神経関連器官の原基として一過的に形成される。プラコードは発生の初期段階ではまず、表皮が作られる領域と中枢神経が作られる領域（神経板）の境界に形成され、その後増殖して遊走性を獲得し、尾芽胚期には各プラコードへと分化し、初期幼生期には脳下垂体前葉、嗅上皮、水晶体、三叉神経、側線そして耳胞などの頭部の様々な感覚神経関連器官に終分化する (図 1)。このプラコードの形成機構を解明するにあたり、外胚葉パターニングの分子機構に着目した。外胚葉では、原腸陥入の過程で中胚葉組織に裏打ち

され、BMP 阻害因子が拡散することにより BMP シグナル活性の濃度勾配が生じる (図 2)。そして BMP のシグナル活性が高い領域は表皮へ、活性が低い領域は神経板に分化する。両者の境界では神経板境界が生じ、その非神経側からは予定プラコードが、神経側からは神経堤が形成される。予定プラコードはさらにその後 Wnt シグナル等の調節を受け、鼻・レンズ・三叉神経・耳・鰓の各プラコードへ分化する。しかし予定プラコード分化に必要とされる詳細な BMP シグナル活性の強度や活性化の時期についてはこれまでに十分解明されていない。

また近年では、iPS/ ES 細胞などのヒト培養細胞を用いた研究分野においても、予定プラコードおよび神経堤組織の分化実験が数多く行われている (Dincer et al., 2013; Mica et al., 2013)。プラコード組織の分化誘導実験においては予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* を特異的に発現する細胞群の誘導、およびその後の各プラコードやプラコード由来の感覚神経器官の分化にも成功しており、実際に神経細胞として機能する三叉神経や、水晶体、脳下垂体前葉が形成されている様子が観察されている。しかし、その分化誘導効率は表皮や神経板等の他の外胚葉組織と比較すると非常に低いことが知られている。具体的には、ヒト iPS 細胞を用いた分化誘導実験において外胚葉の神経板および表皮組織の誘導効率はそれぞれ約 95 % と高効率であるのに対し、神経堤の誘導効率は約 60%、予定プラコードの誘導効率は約 20 % と非常に低い効率を示す (Chambers et al., 2009; Tchieu et al., 2017)。この原因としては、前述の通り、初期発生の段階で神経堤- 予定プラコードの境界を規定すると考えられる BMP シグナルの活性の強度や、それと協調的に働く他のシグナルの存在や活性の強度が解明されていないことが挙げられる。さらに培養細胞を用いた実験に特有の原因としては、細胞培養に用いる培地における内在性の各シグナルの活性強度が明らかにされていないことや、血清等に含まれる動物性成分のロット差による揺らぎ、また細胞の密度による影響やコーティング剤のロット差による実験毎の揺らぎがあることが考えられる。

本研究においてはこれらの課題に対処するため、初期発生における予定プラコードの形成機構解明を目的とした。第 1 章においては、多能性のあるツメガエル外胚葉細胞から予定プラコード様細胞を特異的に誘導する系を確立し、その中で予定プラコード細胞誘導に必要とされるシグナルの活性強度の詳細な条件検討を行った。そして次に予定プラコード様細胞を用いて

DNA マイクロアレイ解析を行い、新規予定プラコード関連遺伝子の同定を行った。第2章においては同定した新規の予定プラコード関連遺伝子について、時空間的発現パターンの解析および過剰発現/ 翻訳阻害胚の表現型観察を行い、さらに詳細な機能解析を行った。特に外胚葉パターンニングに重要な役割を持ち、先行研究において同定した新規遺伝子との関連性が報告されていた BMP シグナルに着目し、そのシグナル構成因子との相互作用やシグナルのターゲット遺伝子発現への影響について解析を行った。

第 1 章

プラコード形成に関わる 新規遺伝子の同定

1. 要旨

プラコードは初期発生において感覚神経関連器官の原基として形成される外胚葉由来の組織である。プラコードは、神経胚期にその前駆細胞群として予定プラコードを形成する。予定プラコードは表皮と神経板の境界領域から形成され、嗅上皮、水晶体、三叉神経、側線や耳胞等の各感覚神経関連器官に終分化する。この様に予定プラコードは一過的に形成される組織であり、外見から識別し単離することが困難であった。そこでまずツメガエル外胚葉片を用い、生体における発生過程を擬似的に再現することで予定プラコード細胞を特異的に誘導することを試みた。ツメガエル外胚葉細胞は BMP2/4/7 を多量に発現し、切り出して培養すると表皮へと分化する。一方で、BMP 阻害因子を作用させると神経板へと分化する。そこで BMP に直接結合してシグナル阻害をする Chordin に着目し、その注入量を検討することで BMP シグナルを調節し、予定プラコードマーカー遺伝子の発現量が変化するかを検証した。その結果、BMP シグナルの軽度阻害により予定プラコードマーカー遺伝子の発現量が特異的に上昇し、予定プラコード様細胞誘導の至適条件であることが分かった。また、予定プラコード形成に引き続いて起こる、前方、側方、後方の各プラコードの部域化の過程に着目したところ、Wnt シグナル阻害により前方プラコード、Wnt シグナル促進により側方と後方のプラコード遺伝子の発現が上昇することが分かり、Wnt シグナルがプラコードの部域化に関与することが示された。

次に誘導した予定プラコード様細胞に加え、表皮様細胞、神経堤様細胞、神経板様細胞の3種類の外胚葉由来の細胞の誘導条件の検討も行い、DNAマイクロアレイによる比較解析を行い、予定プラコード様細胞で特異的に発現する新規マーカー遺伝子の同定を目指した。まず4サンプルのうち、予定プラコード様細胞においても発現量が多かった遺伝子を選出した。次に、予定プラコード様細胞と神経堤様細胞のどちらにおいても高発現する遺伝子が多く見られたため、既知の予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* と発現の挙動の近いものを Cluster 3.0 を用いたクラスタリング解析により選択した。最後に *in situ* hybridization スクリーニングを行い、神経胚期における予定プラコードおよび発生後期の各プラコードにおいて mRNA の発現が確認できた、ヌクレオチド転移酵素 *Fam46a* を新規予定プラコード遺伝子として同定した。

2. 背景

私たちの頭部の知覚に関わる感覚神経の大半は、予定プラコードおよび神経堤と呼ばれる特徴的な外胚葉組織に由来している。予定プラコードは初期発生段階である神経胚期において誘導される肥厚した組織で、神経板の前方周辺にU字型の領域を形成する。予定プラコードの細胞はその後増殖して遊走性を獲得し、脳下垂体前葉、嗅上皮、水晶体、三叉神経、一連の鯉神経、耳胞そして側線等の様々な感覚神経関連器官に終分化する (図 1) (Schlosser, 2000; Schlosser, 2006; Grocott et al., 2012)。一方で神経堤も予定プラコードと同様に初期の神経胚期において誘導される組織であり、予定プラコードよりも胚の後方の神経板の側方に領域を形成する。神経堤細胞はその後遊走性を獲得し、軟骨、硬骨、平滑筋、色素細胞、分泌細胞、神経細胞、グリア細胞等の器官に終分化する (Mancilla et al., 1996; Christiansen et al., 2000; Mayor and Theveneau, 2013)。予定プラコードと神経堤は、どちらも初期発生の神経胚期において神経板の周辺に領域を形成するという点、将来は神経細胞やグリア細胞、そして内分泌細胞を含む非表皮細胞に分化するという点、そして発生の後期段階においてはどちらの領域の細胞も増殖した後に遊走性を獲得して胚の幅広い領域へと移動し、多くの形態形成運動に関与するという点で大きな共通する特徴がある (図 1)。一方で、発生初期にこの隣接する予定プラコードと神経堤の領域の境界がどのように規定されているのか、その詳細な分子機構については未だ十分に解明されていない。特に神経堤の形成機構については既知のマーカー遺伝子の豊富さや分化の多能性、その形態的な特徴から数多くの先行研究が存在しているが、類似した特徴を持つ予定プラコードについてはこれまでに十分に調べられてこなかった。それにより、これらの境界規定に役割を持つ一連の転写因子が十分に探索されていないことが課題となっている。

予定プラコードと神経堤の領域が形成される初期の外胚葉のパターニングにおいては、原腸胚期に原腸陥入により中胚葉に裏打ちされ Chordin (Chd) や Noggin (Nog) 等の BMP 阻害因子が拡散することにより、BMP シグナルの活性の濃度勾配が生じる (図 2) (Smith et al., 1992; Sasai et al., 1994)。そして BMP シグナルが阻害されなかった領域は非神経外胚葉に、阻害された領域は神経外胚葉に分化する。非神経外胚葉はその後表皮に、そして神経外胚葉は神経に

分化する。これらの境界では神経板境界が形成され、神経胚期において非神経側から予定プラコードが、神経側から神経堤が形成される (図 2) (Grocott et al., 2012; Saint-Jeannet and Moody, 2014)。したがって予定プラコードと神経堤の分化においては、非神経外胚葉および神経外胚葉のそれぞれの形成に必要とされる BMP シグナル活性の中間の強度が必要であると予想される。さらにその形成領域から、より BMP シグナルの活性の高い側から予定プラコードが、より活性の低い側から神経堤が誘導されることも示唆されるが、これを証明する研究はこれまでに多くはされてこなかった。また予定プラコード誘導には、BMP シグナルに加えて FGF2 や FGF8 をリガンドとした FGF シグナルの活性化が起こっていること、そして神経胚期における一時的な BMP シグナル活性の上昇が役割を持っていることが報告されている (Brugmann et al., 2004; Ahrens and Schlosser, 2005; Fletcher et al., 2006)。一方で神経堤形成においては中間の強度の BMP シグナル活性に加えて Wnt シグナルの活性化が必要とされることが報告されている (García-Castro et al., 2002; Sato et al., 2005)。したがってこれらの先行研究は、予定プラコードと神経堤の領域の規定には初期神経胚期における BMP シグナル活性の強度に加えて、FGF や Wnt シグナルの活性の強度が役割を持っていることを示している (Groves and LaBonne, 2014)。実際にこの仮説を裏付ける先行研究がゼブラフィッシュにおいて報告されている (Neave et al., 1997)。BMP シグナルの阻害により予定プラコードマーカー遺伝子の発現領域が縮小し、一方で神経堤マーカー遺伝子の発現領域の拡大が起こる。また予定プラコード領域と神経堤領域には補完性があり、神経堤で発現する転写因子をノックダウンした際に神経堤マーカー遺伝子の発現領域が縮小し、一方でその欠失領域で予定プラコードマーカー遺伝子が発現すること (Nordin and LaBonne, 2014)、また予定プラコードで働く転写因子が発現しない条件において神経堤のマーカー遺伝子の発現が見られる例などが報告されている (Leung et al., 2013)。しかし、それぞれの領域の誘導にどの程度の強度のシグナリング活性が必要とされ、それにより一連の転写因子の発現が起こっているのかという詳細な分子機構は未だ解明されていない。

そこで私は本研究において、プラコード形成、特に初期神経胚期における予定プラコードの形成機構解明を目的とし、ツメガエル外胚葉片を用いて、予定プラコード形成に必要とされる

BMP シグナルの活性化のレベルおよび協調的に働く他のシグナル経路の有無を検証した。さらにその誘導条件を用いて DNA マイクロアレイ解析を行い、予定プラコード形成に必須とされる新規遺伝子の同定を目指した。

3. 実験手法

1 アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*) 胚の操作

アフリカツメガエル胚の発生段階は Nieuwkoop and Faber, 1994 を元に決定した。胚は人工授精で得て、その後の胚操作のために受精から 1 時間後に 4.6 % L-システイン酸溶液 (pH 7.8) を用いて、脱ゼリー処理を行った。脱ゼリー処理後は、胚を 1× Steinberg's Solution (SS) において Stage 9 まで培養し、その後は目的のステージまで 0.1× SS において培養した。

2 マイクロインジェクション

本研究では pCS2-*Chordin* (*Chd*), pCS2-*Wnt8*, pCS2-*Dkk-1* のプラスミドコンストラクトを *in vitro* 転写の鋳型として用いた。鋳型 DNA を準備した後に、mMESSAGE mMACHINE SP6 Kit (Ambion) を用いて mRNA を転写し、ピコインジェクター PLI-100 (HARVARD APPARATUS) を用いて胚にマイクロインジェクションを行った。注入された胚は Stage 9 まで 5 % Ficoll/ 1× SS において培養し、その後目的のステージまで 0.1×SS において培養した。

3 *in situ* hybridization (ISH)

解析に用いた胚は、MEMFA (0.1 M MOPS [pH 7.4], 2 mM EDTA, 1 mM MgSO₄, 3.7 % ホルムアミド) で固定した後、エタノール/ 過酸化水素溶液において脱色した。 *Six1* のアンチセンスディゴキシジェニン(DIG)-標識 RNA プローブは、*in vitro* において転写した。DIG-標識された RNA プローブは NBT-BCIP Stock Solution (Roche) を用いてシグナルを検出した。

4 アニマルキャップアッセイ

アニマルキャップアッセイでは、4 細胞期に動物極側の全割球に mRNA あるいは MO を注入した。外胚葉片は Stage 9 において動物極側から切り出し、Stage 15 まで 1× SS において培養した。いくつかの実験では 25 μM SU5402 (FGFR1 阻害剤; Wako) を培地に添加した。

5 RT-PCR and RT-qPCR

Total RNA は 20 個の胚あるいは 20 個のアニマルキャップから、ISOGEN II (NIPPON GENE) を用いて抽出した。逆転写は SuperScriptIII Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて行った。PCR は Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa) を用いて行い、電気泳動によって DNA 量を評価した。q-PCR は KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems) を用い、StepOne-Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems)において、比較定量における検量線法で解析を行った。PCR あるいは qPCR に用いたプライマーは以下の通りである。

Gene	Forward Sequence	Reverse Sequence
<i>Six1</i>	GGGCCCTCACCTCCAGCCTGG	ATCCTTGTGGTATCTCCTATAC
<i>Eya1</i>	CACCAAATGGCACAGAAG	GGGTAGGCAGAATATGGG
<i>Ath-3</i>	CTCAGGCCATGTTCTTGGAT	CTCAGGCCATGTTCTTGGAT
<i>Chordin</i>	AACTGCCAGGACTGGATGGT	GGCAGGATTTAGAGTTGCTTC
<i>EF1a</i>	CAGATTGGTGCTGGATATGC	ACTGCCTTGATGACTCCTAG
<i>Sox2</i>	CTGCGTCCAACAACCAGAATAAG	CCTCGTCGATGAAGGGTCTTTTC
<i>NCAM</i>	CACAGTTCCACCAAATGC	GGAATCAAGCGGTACAGA
<i>XK81</i>	CACCAGAACACAGAGTAC	CAACCTTCCCATCAACCA
<i>Snail</i>	AAGCACAATGGACTCCTT	CCAATAGTGATACACACC
<i>Slug</i>	TCCCGCACTGAAAATGCCACGATC	CCGTCCTAAAGATGAAGGGTATCCTG
<i>FoxD3</i>	CGTAACTGGAATGACCCTGTC	GTACATTTGTTGATAAAGGG
<i>Six3</i>	GGTGGGAACTGGTTCAAGA	TCATGCCACTCTGTCCGATA
<i>Six6</i>	AACTATTTGGGACGGGGAAC	ACTTCCCTGGGACAAGACCT
<i>Pax8</i>	CTCTCGACCCACCAAGGATA	CAGGAAGGTGGGGCTACATA

6 DNA マイクロアレイ解析およびクラスタリング解析

RNA は胞胚期に切り出したアニマルキャップから ISOGEN II (Nippon Gene) を用いて抽出した。抽出した RNA は逆転写酵素である Reverse Transcriptase M-MLV (TaKaRa) を用いて逆転写を行なった。Agilent Gene Expression Hybridization Kit を用いて hybridization を行

なった後に洗浄し、アレイスライドをスキャンしてデータを取得した。得られた各遺伝子の発現量は標準化処理を行い、データ化した。クラスタリング解析は、Cluster 3.0 (Michiel de Hon, Univ of Tokyo, based on Eisen Lab Cluster software) を用いて行なった。mRNA の階層クラスタリングは Pearson の相関係数に基づいて行ない、最後に得られた結果を Java Tree View で表示し、各クラスターにおける遺伝子およびツリー構造の確認を行なった。

4. 結果

4-1 アニマルキャップを用いた誘導系の確立

予定プラコードは発生過程で一過的に形成される組織で、外見上の特徴により他の外胚葉組織から識別してその細胞を単離することが困難であった。そこで未分化で多能性のあるツメガエル外胚葉片、アニマルキャップを用い、生体における発生過程を擬似的に再現し、予定プラコード様細胞のみを特異的に誘導することを試みた。アニマルキャップの細胞は BMP2/4/7 を多量に発現し、無処理の状態で切り出して単離培養すると、表皮細胞に分化する。一方で BMP 阻害因子を作用させると神経細胞へ分化する。当研究室の先行研究において、ドミナントネガティブ型受容体 *tBR* の注入あるいは BMP シグナル受容体阻害剤である LDN193189 を高濃度で添加した際には神経板マーカー遺伝子 *Sox2* や神経堤マーカー遺伝子 *Snail* の発現量が上昇し、より低い濃度で加えた際には 予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1*, *Ath-3* の発現量が顕著に上昇することが示されていた (金井, 修論)。そこで本研究では、実際の胚発生で原腸陥入の際にオーガナイザー領域から分泌される、BMP に直接結合してシグナル阻害をする Chordin (Chd) タンパク質に着目し、その注入量を詳細に検討することで、BMP シグナル活性の強度を調節し、予定プラコードマーカー遺伝子が特異的に発現する条件を探索した。まず 2 細胞期に *Chd* mRNA を動物極側の両割球に注入し、胞胚期にアニマルキャップを切り出し、予定プラコードおよび神経堤形成期である神経胚期まで培養して回収し、RNA 抽出を行なった (図3)。そして RT-qPCR を行い、各マーカー遺伝子の発現量を解析し、さらに *in situ* hybridization により各アニマルキャップにおける発現パターンを解析した。

4-2 予定プラコード様細胞誘導条件の検討

様々な量の *Chd* mRNA を注入したアニマルキャップを作製し、予定プラコードマーカー遺伝子の発現を RT-qPCR 法により定量的に解析した。その結果、*Chd* mRNA を 20 pg 注入した際に予定プラコードマーカー遺伝子 *Eya1*, *Six1*, *Ath-3* の転写量が顕著に上昇していることが分かった (図4A)。*Eya1* と *Six1* については *Chd* mRNA を 20 pg 注入した条件において最も発現量が高く、注入量が 50 pg, 100 pg と増えるにつれて徐々に発現量が減少していた。*Ath-3* に

においては *Chd* mRNA 20 pg の注入条件で発現量が最も多く、*Chd* mRNA 50 pg, *Chd* mRNA 100 pg の注入条件ではほとんど発現が見られなかった。これらの結果から、予定プラコードマーカ―遺伝子の発現においては *Chd* mRNA 20 pg の注入による軽度の BMP シグナルの阻害が効率的な条件であることが示唆された。次にアニマルキャップごとの誘導効率の差を考慮し、各注入条件のアニマルキャップにおいて *in situ* hybridization を行い、予定プラコードマーカ―遺伝子である *Six1* の発現パターンを解析した。その結果、*Chd* mRNA 20 pg, 50 pg, 100 pg の各注入条件において *Six1* の発現が見られた。そして、*Chd* mRNA 20 pg の条件においてはすべてのアニマルキャップで発現量が多く (n=7/7)、*Chd* mRNA 50 pg, *Chd* mRNA 100 pg の注入ではそれぞれ約半数 (n=3/7)、約1/3 (n=2/7) の数のアニマルキャップにおいて発現量の多いものが見られた (図4B)。これらの結果も、*Chd* mRNA 20 pg 注入条件における BMP シグナルの軽度の阻害が、効率良くプラコード様細胞を誘導していることを示した。

さらに同 *Chd* mRNA 注入条件における、他の外胚葉マーカ―遺伝子 (神経板, 神経堤, 表皮マーカ―遺伝子) の発現量についても qPCR 法により定量解析を行なった。その結果、*Chd* mRNA 20 pg の注入条件においては、神経板マーカ―遺伝子 *Sox2*, *NCAM* の発現は見られるものの、発現量が最も多い *Chd* mRNA 100 pg 注入時と比較すると、発現量が大きく減少していることが分かった (図5A)。表皮マーカ―遺伝子 *XK81* については、*Chd* mRNA 注入により発現が顕著に減少しており、*Chd* mRNA 20 pg の注入条件においてもほとんど発現が見られなかった (図5B)。また 神経堤マーカ―遺伝子 *Slug*, *Snail*, *FoxD3* については *Chd* mRNA 注入による発現上昇はほとんど見られなかった (図5C)。*Slug* は *Chd* mRNA 注入により顕著に発現が減少し、*Snail* は *Chd* mRNA 注入により発現量がほとんど変化しなかった。*FoxD3* については、*Chd* mRNA の注入量に関わらず発現量が減少した。先行研究においては、これらの神経堤遺伝子の発現には BMP シグナルの軽度阻害に加え、適切な強度の Wnt シグナルの活性化が重要であることが報告されているため (Sato et al., 2005; Milet and Monsoro-Burq, 2012; Mica et al., 2013)、BMPシグナルのみの調節の条件では発現が誘導されなかったと考えられる。以上の結果より、*Chd* mRNA 20 pg の注入による BMP シグナルの軽度阻害条件が、アニマルキャップにおける予定プラコード様細胞誘導の高効率な条件であることが示された。

4-3 前方・側方・後方プラコードの誘導条件の検討

これまでの結果から、軽度の BMP シグナルの阻害により予定プラコード様細胞を特異的に誘導出来ることが示された。そこで発生次の段階で起こる、予定プラコードから各プラコードへの部域化の過程にも着目し、各プラコードの誘導条件について検討を行なった。予定プラコードは後期神経胚期になると前方プラコード、側方プラコード、後方プラコードの各プラコードへと部域化する (図 2)。これらの各プラコードは感覚神経関連器官の原基であり、前方プラコードからは鼻とレンズが、側方プラコードからは三叉神経が、後方プラコードからは耳胞や側線が終分化する (Schlosser, 2006)。しかし発生過程における予定プラコードから各プラコードへの部域化に関わる分子機構についてはこれまでに十分に解明されていない。同時期における、神経板および中胚葉領域のパターニングでは、Wnt シグナルが前後軸形成に重要な役割を持っていることが知られている (Kiecker et al., 2001)。そこで、予定プラコードから前後軸方向に沿って起こる各プラコードへの部域化においても、Wnt シグナルが役割を持っているのではないかという仮説を立て、検証実験を行なった。

その結果、*Chd* mRNA 20 pg の注入による BMP シグナルの軽度の阻害に加え、Wnt アンタゴニストである *dkk-1* mRNA を共注入したところ、前方プラコードマーカー遺伝子である *Six-3*, *Six6* の発現量が上昇することが分かった (図 6A)。*Six3* については *dkk-1* mRNA 注入により発現量の上昇が見られ、*dkk-1* mRNA 50 pg で発現がピークとなり、100 pg の注入条件においては発現量の減少の傾向が見られた。*Six6* については *dkk-1* mRNA 20 pg の注入条件で発現量が最も多くなり、注入量が 50 pg, 100 pg と増えるにつれて発現量は減少することが分かった。一方で、*Chd* mRNA に加えて Wnt シグナルのリガンドである *Wnt8* mRNA を共注入したところ、10 pg の注入条件で側方プラコードマーカー遺伝子 *Ath-3* の発現量の顕著な上昇が見られた (図 6B)。*Ath-3* については *Wnt8* mRNA の注入量が 20, 50, 100 pg と増えるにつれて徐々に発現量が減少していくことが分かった。また、*Wnt8* mRNA を 50 pg の高濃度で注入した際には後方のプラコードマーカー遺伝子である *Pax8* の発現量が顕著に上昇していた。*Pax8* は *Wnt8* mRNA 10, 20 pg の低濃度での注入条件ではほとんど発現が見られず、50 pg の注入条件で発現がピークとなった。100 pg の条件においてはピーク時と比較すると発現量が減少し

ていた。これらの結果は、予定プラコードから各プラコードへの部域化の過程においては Wnt シグナルが役割を担っており、前方プラコード形成には Wnt シグナルの抑制が、側方および後方プラコード分化には Wnt シグナルの促進が必要とされることを示した。したがって、後期神経胚期における予定プラコードから各プラコード分化においては、Wnt シグナルが予定プラコード内で前後軸方向に濃度勾配を形成しており、それにより各プラコードへの部域化を制御している可能性を示した。

4-4 FGF シグナル調節による予定プラコード様細胞誘導条件の検討

次に本研究で検討した予定プラコード様細胞誘導において、さらなる至適条件の探索を行った。ツメガエルの神経胚期における予定プラコード領域では *FGF8* mRNA が特異的に発現していることが報告されている (Ahrens and Schlosser, 2005; Lea et al., 2009)。そこで、Chd による BMP シグナル活性の強度調節に加えて、FGF シグナル活性の強度調節を行い、より効率の良い予定プラコード様細胞誘導条件を探索した。方法としては、2 細胞期に *Chd* mRNA を注入した胚から、胞胚期にアニマルキャップの切り出しを行い、その後培養液に FGF シグナル受容体阻害剤である SU5402 あるいは FGF リガンドである FGF8 タンパク質を添加した。そして神経胚期まで培養を行ない、RT-qPCR 法により予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* および *Eya1* mRNA の発現量を定量解析することで、予定プラコード細胞への分化効率を評価した。その結果、*Chd* mRNA 注入に加えて、Fgf8 タンパク質を加えて FGF シグナルを活性化させた条件においては、*Six1* および *Eya1* の発現はどちらも減少していることが分かった (図 7A)。一方で 25 μ M の SU5402 を添加して FGF シグナルを軽度に阻害すると、*Six1* および *Eya1* の発現量は顕著に上昇していることが分かった (図 7B)。この結果はアニマルキャップの細胞には内在性の FGF リガンドの発現によるシグナル活性があり、より効率的な予定プラコード様細胞誘導には弱いレベルでの FGF シグナル阻害が必要とされることが示された。したがってこれらの結果から、予定プラコード様細胞誘導の至適条件は、BMP シグナルの軽度阻害に加え、FGF シグナルを軽度に阻害した条件であることが示された。

4-5 新規予定プラコード関連遺伝子の同定

最後に本研究の目的であった、初期の神経胚期の予定プラコード領域で特異的に発現し、その領域形成に必須とされる新規のマーカー遺伝子の同定を目指した。予定プラコード様細胞の誘導条件としては、その後の同定した遺伝子の機能解析を単純化するために、*Chd* mRNA 注入による BMP シグナル阻害のみを行った条件を採用した。*Chd* を用いた BMP シグナル調節による予定プラコード様細胞の誘導条件に加え、先行研究のデータをもとに表皮、神経堤、神経板の3種類の外胚葉細胞についても誘導条件の検討を行った。その結果、表皮様細胞は無処理、神経堤様細胞は *Chd* mRNA 100 pg+ *Wnt8* mRNA 50 pg の注入条件、神経板様細胞は *Chd* mRNA 200 pg の注入条件をそれぞれ至適条件として採用した。そして4つのサンプルにおいて DNA マイクロアレイ解析を行い、予定プラコード様細胞と他のサンプル間で比較解析を行った (図 8)。

まず表皮、予定プラコード、神経堤、神経板の4つのサンプルのうち、予定プラコード様細胞において最も発現量が多かった 128 遺伝子を候補遺伝子として選出した。次に、予定プラコードと神経堤において共通に高発現する遺伝子が数多く見られたため、既知の予定プラコードマーカー遺伝子である *Six1* とサンプル間の発現の挙動の近いものを、Cluster 3.0 を用いた階層クラスタリング解析によって選出した。その結果、47 遺伝子が選出された。そしてデータベース上で配列が登録されているものの、遺伝子の時空間的発現パターンや詳細な機能が報告されていない遺伝子において、*in situ* hybridization スクリーニングを行い、実際にプラコードにおける mRNA の発現が確認出来た 3 遺伝子を候補遺伝子として選出した。選出された遺伝子のうち、*Fam46a* は *in situ* hybridization 解析の結果、初期の神経胚期に予定プラコードで発現し、尾芽胚期には鰓、耳、側線の各プラコードにおいて発現が見られることが分かった (図 9)。一方で選出された *Lrat* は尾芽胚期においては水晶体および鰓プラコードで、*Tom1* は水晶体・耳胞・鰓の各プラコードにおいて特異的な発現が見られたものの、いずれも初期の神経胚期における予定プラコードでの特異的な発現パターンが確認出来なかった。以上の結果より、新規予定プラコード関連遺伝子として *Fam46a* を同定した。

5. 考察

本研究では複雑な予定プラコード形成機構の解明の一端として、BMP シグナル活性のみの強度を調節することにより、特異的に予定プラコード様細胞が誘導出来ることを解明した。そしてその強度は表皮および神経板誘導にそれぞれ必要とされる BMP シグナル活性の中間のレベルであることが分かった。この結果から、予定プラコード組織の分化においては、BMP シグナル促進によって発現上昇する遺伝子と BMP シグナル抑制によって発現上昇する遺伝子の両者の発現、あるいはその相互作用が必要とされ、それにより予定プラコードマーカー遺伝子である *Six1* および *Eya1* の発現が引き起こされていることが考えられた。BMP シグナルを阻害する詳細な時期や、BMP シグナル阻害の強度の条件について、LDN193189 などの化学物質を用いてより厳密に条件検討すれば、より高効率な予定プラコード様細胞誘導条件が見出せるかもしれない。また今回関連性が示された FGF シグナルに加え、実際の予定プラコードの形成過程で主として働く BMP シグナルと協調的に作用すると考えられる、SHH シグナル、Notch シグナル、レチノイン酸シグナル等の他のシグナル活性についても合わせて詳細な条件を検討することで、より精度の高い予定プラコード様細胞を誘導する系を確立することができよう。またこれらのシグナルは、隣接する表皮あるいは神経板組織から発生の特定の時期に予定プラコードに伝達されることが報告されていることから、それぞれのシグナルの活性化の時期やシグナル活性強度についても詳細に検討を行うことが必要である。

さらに、後期の神経胚期に起こる予定プラコードから各プラコードへの分化過程には Wnt シグナルが役割を担っており、前方プラコードへの分化には Wnt シグナルの抑制が、側方および後方プラコードへの分化には Wnt シグナルの促進がそれぞれ必要とされていることが明らかとなった。このことは予定プラコード内において Wnt シグナル活性の濃度勾配が生じ、それにより各プラコードへの部域化が起こっていることが考えられた。これは神経板や中胚葉領域における、Wnt シグナルによる前後軸方向のパターニングに関する先行研究と類似する結果となっており (Kiecker et al., 2001)、このことから予定プラコードに隣接する神経堤内においても、

同様に Wnt シグナルが前後軸方向の部域化に役割を持っていることが考えられ、今後はその機構を検証していく必要がある。

本章の後半では DNA マイクロアレイ解析に際して、予定プラコード様細胞の誘導条件に加えて他の外胚葉組織である表皮, 神経堤, 神経板の各細胞の誘導条件についても検討を行った。4 種類のサンプルにおける DNA マイクロアレイ解析の結果、予定プラコードおよび神経堤様細胞においては、どちらの条件においても高発現する遺伝子が多数見られた。これは、この2つの領域が類似した遺伝子発現プロファイルを持ち、一方でそれぞれの領域で特異的に発現する遺伝子の存在により、各領域が決定されているのかもしれない。階層クラスタリング解析および *in situ* hybridization スクリーニング後には3つの遺伝子が選出された。候補遺伝子の中の *Lrat* および *Tom1* 遺伝子については、神経胚期の予定プラコードにおいては特異的な発現が確認出来なかったものの、*Lrat* は尾芽胚期においては水晶体・側線プラコードで、*Tom1* は水晶体・耳胞・側線の各プラコードにおいて特異的な発現が見られた。したがってこれらの遺伝子もまた有用なプラコード遺伝子であることが考えられる。最終的に、新たな関連遺伝子として *Fam46a* を同定した。初期神経胚期の予定プラコード領域で発現するこの新規遺伝子は、より初期の予定プラコード形成機構の解明に繋がることが期待される。

予定プラコード形成に関わる因子としては、これまでも予定プラコードマーカー遺伝子として用いられている *Six1* および *Eya1* や、より発生初期段階である原腸胚期に神経板境界に発現して予定プラコード-神経堤境界を規定する遺伝子として *AP2*, *Dlx3*, *Gata2*, *Foxi1*, *Zic1*, *Msx1*, *Pax7* 等の転写因子の存在が報告されてきた (Grocott et al., 2012; Groves and LaBonne, 2014)。後者の遺伝子は予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1*, *Eya1* の上流にあり、それにより予定プラコードと神経堤の境界規定を制御していると考えられている。また *Msx1* や *Vent1/2*, *Id3* といった転写因子はより初期の胞胚期から外胚葉の動物極側で発現しているが、BMP シグナルのターゲット遺伝子であり、その発現は予定プラコード形成に必須であることが報告されている。本研究で同定した *Fam46a* は BMP シグナル制御により誘導した予定プラコード様細胞において高発現しており、さらに先行研究における yeast two-hybrid 法による解析で、ヒト *Fam46a* が BMP シグナル構成因子 Smad1 と直接的に結合することが報告されている (Colland

et al., 2004)。以上のことから Fam46a が BMP シグナルを介して予定プラコード形成に関与していることが考えられる。

第2章

新規プラコード遺伝子 *Fam46a* の機能解析

1. 要旨

第一章において、私はBMP シグナルの強度調節によりツメガエルの外胚葉片から予定プラコード様細胞を特異的に誘導する系を確立した。また誘導した予定プラコード様細胞を用いてDNAマイクロアレイ解析を行い、発現量が顕著に上昇している遺伝子群の中から新規予定プラコード関連遺伝子として *Fam46a* を同定した。*Fam46a* の空間的発現パターンを *in situ* hybridization法により解析したところ、神経胚期に予定プラコードで発現し、尾芽胚期に鼻・鰓・耳プラコードで発現していることが確認され、有用なプラコード遺伝子であることが示された。そこで *Fam46a* の機能を探索するために *Fam46a* 翻訳阻害胚を作製し表現型観察を行なったところ、眼の欠損および色素沈着異常の表現型が見られた。色素細胞は予定プラコードに隣接する神経堤に由来することが知られていることから、神経胚期のパターンニング変化を、各マーカー遺伝子を用いて *in situ* hybridization 法で解析した。その結果、予定プラコード領域が縮小し、隣接する神経堤領域が拡大することが分かった。これらの結果は *Fam46a* 発現が予定プラコード形成に必須であり、一方で神経堤分化に対しては阻害的に作用することを示した。

次に *Fam46a* の予定プラコード形成における分子的な作用機序に着目した。外胚葉パターンニングにおいては BMP シグナルが重要な役割を担っており、*Fam46a* は先行研究においてシグナル構成因子と相互作用があることが報告されていた。そこで *Fam46a* と BMP シグナルの関連性の検証実験を行なった。BMPシグナルはシグナルの構成因子である Smad1/5/8 が受容体に直接リン酸化されることで開始され、Smad4と複合体を形成したのちに核移行する。まず *Fam46a* をツメガエル胚で過剰発現させたところ、BMPシグナルターゲット遺伝子 *Vent1/2* の発現量の顕著な上昇が見られた。そして Smad1, Smad4 と *Fam46a* の物理的結合の有無を共免疫沈降法で解析した結果、*Fam46a*-Smad1 および *Fam46a*-Smad4 間どちらにおいても物理的な相互作用が確認された。また BMP シグナルターゲット遺伝子である *Id3* のプロモーター配列を用いたルシフェラーゼアッセイを行なったところ、*Fam46a* 発現により *Id3* の転写活性化が起こることが示された。これらの結果から、*Fam46a* は BMP シグナル構成因子と相互作用し、核移行することによりターゲット遺伝子の発現を促進していることが示唆された。

2. 背景

外胚葉のパターニングの過程においては BMP シグナルが重要な役割を担う。原腸陥入の過程で外胚葉は中内胚葉組織に裏打ちされ、BMP 阻害因子が拡散することにより BMP シグナル活性の濃度勾配が生じる (図 2)。そして BMP シグナル活性が高い領域は表皮へ、活性が低い領域は神経板へと分化する。両者の接するところでは神経板境界が生じ、その非神経側からは予定プラコードが、神経側から神経堤が形成される。このように予定プラコードは神経胚期において外胚葉の表皮と神経板の境界に形成される。したがってその領域形成には表皮および神経板で働く中間の強度の BMP シグナルの活性が働いていることが想定されるが、その BMP シグナルの活性化の維持あるいはそのシグナル強度を感知して予定プラコードマーカー遺伝子発現の制御に直接的に関わる因子についてはこれまで十分に探索されてこなかった。後期原腸胚期に神経板境界に発現し、予定プラコード分化および神経堤分化を制御する転写因子としては *AP2*, *Dlx3*, *Gata2*, *Foxi1*, *Zic1*, *Pax7* 等の転写因子の存在が報告されてきた (Grocott et al., 2012; Groves and LaBonne, 2014)。これらの遺伝子は予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1*, *Eya1* あるいは神経堤マーカー遺伝子 *FoxD3*, *Snail*, *Slug* などの転写因子を上方制御することで、神経板境界から予定プラコードおよび神経堤の分化過程に重要な役割を担っていると考えられている。また *Msx1* や *Vent1/2*, *Id3* といった BMP シグナルのターゲット遺伝子は、発生初期の胞胚期から外胚葉の腹側領域で発現しているが、それらの発現が神経板境界の形成およびその後にその腹側から分化する予定プラコードの形成および予定プラコードと隣接する神経堤との境界規定に必須であることが報告されている (Schlosser et al., 2014)。したがって本研究では神経板境界および予定プラコード形成に関わるこれらの遺伝子と類似する機能を持つ新たな因子を同定し、その機能を解析することで予定プラコード形成機構を解明することを目指した。本研究の第 1 章において同定した Fam46a は yeast-two hybrid 法を用いたヒトの先行研究において、BMP シグナル構成因子 Smad1 と直接的に結合することも示されており (Colland et al., 2004)、このことは Fam46a と BMP シグナリングとの間に関連性があることを示唆している。

また今回新たに同定した予定プラコード関連遺伝子 *Fam46a* はアミノ酸の配列やタンパク質の構造解析の結果から、ヌクレオチド転移酵素の NTP-transferase-7 ドメインを持っていることが報告されている。このドメインの機能についてはこれまでに報告されていないが、*Fam46a* とアミノ酸配列の相当性が非常に高い *Fam46b* および *Fam46c* については non-canonical なポリ A ポリメラーゼであることが近年解明されているため、*Fam46a* も同様の機能を持っている可能性が高いと考えられる (Mroczek et al., 2017)。ヒトにおいては Non-canonical ポリ A ポリメラーゼは、細胞質中においてターゲットとなる mRNA の 3' 末端にポリ A を付加することで mRNA の分解を抑制し、結果として mRNA の安定化を促進することが知られている (Richter, 1999)。しかしその初期発生における機能についてはこれまでにほとんど調べられていない。さらに別の知見としては、ヒト *Fam46a* は眼の疾患である網膜色素変性症の原因遺伝子の一つという報告がある (Lagali et al., 2002; Barragán et al., 2008)。実際に *Fam46a* はヒト 6 番染色体の 6q14 遺伝子座に存在しており、網膜発現遺伝子座である 6q14-q16 内に存在していることが分かっている。しかし初期発生において *Fam46a* の機能欠損の影響が出る時期や異常の生じる組織についてはこれまであまり調べられてこなかった。以上の先行研究を踏まえ、本研究では予定プラコード形成機構解明を目的として新規予定プラコード遺伝子 *Fam46a* の機能解析を行なった。

3. 実験手法

1 アフリカツメガエル(*Xenopus laevis*) 胚の操作

第1章と同様の手法により行なった。

2 マイクロインジェクション

本研究では pCS2-*Fam46a*, pCS2-*LacZ*, pCS2-*Chordin* (*Chd*), pCS2-*BMP4*, pCS2-GFP, pCS2-GFP-*Fam46a*, pCS2-GFP-*Smad4*, pCS2-6-Myc-*Smad1*, pCS2-*Smad2*-GFP, pCS2-6-Myc-*Smad4*, pCS2-6-Myc, pCS2-6-Myc-*Smad1-MH1*, pCS2-6-Myc-*Smad1-MH2* のプラスミドコンストラクトを *in vitro* 転写の鋳型として用いた。鋳型 DNA を準備した後に、mMESSAGE mMACHINE SP6 Kit (Ambion) を用いて mRNA を転写し、ピコインジェクター-PLI-100 (HARVARD APPARATUS) を用いて胚にマイクロインジェクションを行った。片側注入実験においては *Fam46a* あるいは *Fam46a* MO と β -*galactosidase* mRNA 溶液を混合し、2細胞期の片側1割球にのみマイクロインジェクションを行った。注入された胚は Stage 9 まで 5% Ficoll/ 1× SS で培養し、その後目的のステージまで 0.1×SS において培養した。

3 モルフォリノアンチセンスオリゴ (MOs)

モルフォリノアンチセンスオリゴ (MOs) は以下のように設計した。

Fam46a-MO, 5'-GCCTCCTGCAATGTGAAATATAAGA-3';

PRDM12-MO, 5'-GCAGCACCGAGCCCATCATTAATTC-3'

Standard control oligo (Std-MO), 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3'.

Fam46a-MO はツメガエルのホメオログである *Fam46a-S* と *Fam46a-L* に対して設計しており、エキソン-イントロン間のスプライシング阻害として機能する。*PRDM12*-MO Matsukawa et al., 2015 において設計され、Standard control oligo (Std MO) は Gene Tools から購入した。

4 *in situ* hybridization (ISH)

解析に用いた胚は、MEMFA (0.1 M MOPS [pH 7.4], 2 mM EDTA, 1 mM MgSO₄, 3.7 % ホルムアミド) で固定した後、エタノール/ 過酸化水素溶液において脱色した。片側注入実験においては、*β-gal* mRNA 注入胚を Red-Gal (Sigma-Aldrich)あるいは X-Gal (Wako) を用いて染色した。*Fam46a*, *Six1*, *Eya1*, *Slug*, *FoxD3*, *Snail*, *XK81*, *Sox3*, *Sox2* のアンチセンスディゴキシジェニン(DIG)-標識 RNA プローブは、*in vitro* において転写した。DIG-標識 RNA プローブは NBT-BCIP Stock Solution (Roche)を用いてシグナルを検出した。

5 アニマルキャップアッセイ

第1章と同様の手法によって行なった。

6 RT-PCR and -qPCR

Total RNA は 20 個の胚あるいは 20 個のアニマルキャップから、ISOGEN II (NIPPON GENE) を用いて作製した。逆転写は SuperScriptIII Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて行った。PCR は Ex Taq DNA polymerase (TaKaRa) を用いて行い、電気泳動によって DNA 量を評価した。q-PCR は KAPA SYBR FAST qPCR Kit (KAPA Biosystems) を用い、StepOne Plus Real-Time PCR System (Applied Biosystems) において、比較定量における検量線法で解析を行った。PCR あるいは qPCR に用いたプライマーは以下の通りである。

Gene	Forward Sequence	Reverse Sequence
<i>Fam46a</i>	CATTGGTGAGCAGCAAAGAA	CTGCTACATATGGGGCTGGT
<i>Six1</i>	GGGCCCTCACCTCCAGCCTGG	ATCCTTGTGGTATCTCCTATAC
<i>Eya1</i>	CACCAAATGGCACAGAAG	GGGTAGGCAGAATATGGG
<i>Zic1</i>	ATGAACATGGCTGCCACCAT	CACTCTGATGTGGTTGATCAG
<i>Vent1</i>	AAGTATGCCAAGGAGATGCC	AGCTTCTCCGTTTCAGATGC
<i>Vent2</i>	TGAGACTTGGGCACTGTCTG	CCTCTGTTGAATGGCTTGCT
<i>Chordin</i>	AACTGCCAGGACTGGATGGT	GGCAGGATTTAGAGTTGCTTC
<i>ODC</i>	GCCATTGTGAAGACTCTCCATTC	TTCGGGTGATTCCCTGCCAC
<i>EF1α</i>	CAGATTGGTGCTGGATATGC	ACTGCCTTGATGACTCCTAG
<i>Six6</i>	AACTATTTGGGACGGGGAAC	ACTTCCCTGGGACAAGACCT
<i>Pax2</i>	GCAATGCAGACCTAGGAAGC	TGGAAAGACATGAGCAGCAC

<i>Pax3</i>	TTGAGCCTTCCACAGCTGTATC	CTTTATGCAATATCTGGCTTCAG
<i>Snail</i>	AAGCACAATGGACTCCTT	CCAATAGTGATACACACC
<i>Slug</i>	TCCCGCACTGAAAATGCCACGATC	CCGTCCTAAAGATGAAGGGTATCCTG

7 細胞培養

HeLa 細胞は D-MEM (High Glucose) (Wako) に 10 % FBS (Cell Culture Bioscience) と 1 % Penicilin-Spreptomycin (Sigma-Aldrich) を添加した培地において、5 % の CO₂ 存在下で 37°C において培養した。トランスフェクションは Lipofectamine3000 transfection kit (Invitrogen) を用いて行った。いくつかの実験においてはトランスフェクションから 24 時間後に BMP4 (100 ng/ ml) を培地に添加した。

8 ウェスタンブロッディング

ウェスタンブロッディングにおいて、Stage 10.5 まで培養した 10 個の胚を RIPA lysis buffer (0.1 % NP40, 20 mM Tris-HCl [pH 8], 10 % Glycerol) に protease inhibitor cocktail (Roche) を加えた溶液に溶解した。タンパク質は以下の抗体を用いて検出した。Myc (1:1000 [562; MBL]); GFP (1:1000 [GTX113617; GeneTex]); β -tubulin (1:1000 [ab6046; Abcam]); PSmad1 (1:6000) [#06-702; EMD Millipore]; Smad1 (1:1000 [#9512; Cell signaling])。タンパク質は HRP 標識された二次抗体を用いて検出し、Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque) を用いて化学発光させた。

9 共免疫沈降法

免疫沈降実験は GE Healthcare Life Science のプロトコルを用いておこなった。胚は Lysis buffer (1 % NP-40, 20 mM Tris-HCl [pH 8.0], 137 mM NaCl, 10 % Glycerol, 2 mM EDTA) に protease inhibitor cocktail (Roche) を加えたものに溶解し、Stage 10.5 まで培養した。上清を GFP 抗体 (1:100 [sc-9996; Santa Cruz Biotechnology]) あるいは Myc 抗体 (1:100 [562; MBL]) を加えて 4°C で 1 時間インキュベートし、protein G sepharose (GE Healthcare) を加えて 4°C で 1 時間反応させ、免疫染色によって解析した。

4. 結果

4-1 ツメガエル胚における *Fam46a* の発現パターン解析

まずツメガエル胚における *Fam46a* 遺伝子の空間的発現パターンを解析するために、胞胚期から初期幼生期にかけての各発生ステージにおいて、*in situ* hybridization を行い、*Fam46a* mRNA の発現領域を詳細に調べた (図 10)。*in situ* hybridization 解析の結果、*Fam46a* は胞胚期である Stage 8.5 において動物極側で発現していることが分かり、maternal にも発現が見られることが分かった (図 10A)。初期の神経胚期である Stage 15 においては胚前方の予定プラコード領域 (PPE, Pre-placodal ectoderm) および予定網膜 (E, Eye-field) 領域において特異的な発現が見られた (図 10B)。尾芽胚期には鼻プラコード (Ol, Olfactory placode)、鰓プラコード (Epi, Epibranchial placode)、そして耳プラコード (Oti, Otic placode) の各プラコードにおいて発現が確認された (図 10C)、さらに発生の進んだ初期幼生期においては上鰓骨側線 (Av, Anteroventral lateral line)、嗅上皮 (Olf, Olfactory nerve)、そして耳胞 (Otic, Otic vesicle) の各感覚神経組織において発現が見られた (図 10D, 10D', 10D'')。また眼の網膜周辺にも発現が見られたため、切片を作製して発現領域の観察を行なった。その結果、網膜色素上皮 (RPE, Retinal pigment epithelium) において顕著な発現が見られることが分かった (図 10D''')。この *Fam46a* の発現パターンは既知の予定プラコードマーカー遺伝子である *Six1*, *Eya1* と非常に類似していた。これらのマーカー遺伝子は、初期神経胚期には予定プラコードにおいて特異的に発現するが、発生が進むにつれて発現領域が変化していき、尾芽胚期には各プラコードに発現し、初期幼生においては各感覚神経組織で発現することが報告されている。以上の結果から、*Fam46a* は初期神経胚期に予定プラコードで、そして尾芽胚期には鼻プラコード、鰓プラコードおよび耳プラコードで特異的に発現する遺伝子であることが分かり、有用なプラコードマーカー遺伝子であることが示された。

次に *Fam46a* mRNA の空間的発現パターンに加えて時間的発現パターンを解析するため、各発生ステージの胚から RNA を抽出し、cDNA を合成して Stage PCR を行なった。*Fam46a* mRNA の発現量、および比較のために他のマーカー遺伝子の mRNA の発現量の変化を解析し

た。Stage PCRの結果、*Fam46a*は初期原腸胚 (Stage 10) から発現が始まり、初期幼生である Stage 40 まで発現していた (図 11)。またその発現量は Stage 10 から Stage 20 にかけてほぼ一定であり、Stage 25 以降は発生が進むにつれ発現量が上昇する傾向が見られた。予定プラコードマーカ遺伝子である *Six1* と *Eya1* は初期原腸胚 (Stage 10) から初期幼生 (Stage 40) まで発現が見られ、その発現量は中期原腸胚 (Stage 12) 以降に上昇し、その後は発生が進むにつれて僅かに上昇する傾向が見られた。この *Six1* の発現時期は *Fam46a* の発現時期と類似していた。また神経板境界遺伝子 *Zic1* は、初期原腸胚 (Stage 10) から中期原腸胚 (Stage 12) で発現し、その後発現量が顕著に減少したのちに尾芽胚 (Stage 25, 30) において再び発現量の上昇が見られた。BMP シグナルのターゲット遺伝子である *Vent1/2* も初期原腸胚 (Stage 10) から発現が始まり、尾芽胚 (Stage 25-30) において発現が見られた。しかしその発現量は発生が進むにつれ減少する傾向が見られた。また BMP のアンタゴニストである *Chordin* は初期原腸胚 (Stage 10) から初期幼生 (Stage 40) において発現しており、発現量は発生が進むにつれて減少傾向が見られた。したがって *Zic1*, *Vent1*, *Vent2* および *Chordin* の各遺伝子の発現開始時期は *Fam46a* と一致していたが、その後の発現量の変化については異なるパターンを示した。これらのデータは *Fam46a* が神経板境界マーカ遺伝子と同時期から発現を開始し、その発現は予定プラコードマーカ遺伝子の発現が継続する時期まで続くことを示している。

最後に、第 1 章で条件検討を行ったツメガエルの外胚葉片から誘導した予定プラコード様細胞を用いて、既知の予定プラコードマーカ遺伝子 *Six1* および *Eya1* と *Fam46a* 間での発現挙動の比較を行なった。*Chordin (Chd)* mRNA 注入および SU5402 を添加して処理したアニマルキャップでは *Six1* および *Eya1* の発現量は上昇する。そこに *PRDM12* (側方予定プラコードに発現し、予定プラコード形成に必須とされるエピジェネティック因子) を共注入するとこれらの発現量は顕著に減少する (Matsukawa et al., 2015)。同様のパターンは神経板境界マーカ遺伝子である *Zic1* においても見られる。そこで同サンプルにおいて *Fam46a* の発現量の変化を解析したところ、*Chd* mRNA 注入および SU5402 添加の条件で発現量が上昇し、*PRDM12* MO を共注入した際には発現量が顕著に減少していた (図 12)。これらの結果から *Fam46a* が神経

板境界および予定プラコード関連遺伝子と類似の発現の挙動を取ることが分かり、*Fam46a*が有用な予定プラコード関連遺伝子であることが示された。

4-2 *Fam46a*の過剰発現胚および機能阻害胚の表現型観察

次に *Fam46a* 遺伝子の機能を解析するために、*Fam46a* の過剰発現胚および機能阻害胚を作製し、三日後胚において表現型観察を行った。その結果、*Fam46a* mRNA を 4 細胞期に注入して過剰発現させた胚では、眼を含む頭部欠損と体軸の縮小、および体色が白くなる色素沈着異常の表現型が見られた (図 13A, 13B)。これらの表現型において、頭部欠損と体軸の縮小および色素沈着以上の全ての表現型が見られた個体を severe, 体色異常の表現型のみが見られた個体を slight として分類して二段階で評価した結果、slight および両者を合わせた表現型を示す個体の割合は、注入した *Fam46a* mRNA の濃度依存的に上昇した (図 13C)。次に *Fam46a* の機能阻害胚を作製するために、*Fam46a* に対するモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO, Morpholino Oligo nucleotide) を設計した。アフリカツメガエルは異質四倍体であり、*Fam46a* においては *Fam46a-S* および *Fam46a-L* の 2 つのホメオログが存在する。そこで両者の塩基配列に対して働くスプライシング阻害型のモルフォリノオリゴヌクレオチド (MO) を設計した。この MO はイントロンと 2 番目のエキソン間の配列に特異的に結合し、前駆 mRNA が成熟 mRNA となるのを妨げる。MO の評価のためにツメガエルの初期幼生胚から作製した cDNA ライブラリーを用い、*Fam46a* の全長に対するプライマーを設計して PCR を行い増幅断片の長さを調べた。その結果、正常胚では 1.2 Kb 付近に成熟 *Fam46a* mRNA のバンドが確認されたのに対し、*Fam46a* MO 注入胚では 2.3 Kb 付近に前駆 mRNA のバンドが見られ、この MO がスプライシング阻害として機能していることが確認された (図 13D)。そこで *Fam46a* MO を 4 細胞期に注入し、機能阻害させた胚を作製して表現型観察を行った。その結果、眼の欠損および体色が暗くなる色素沈着異常の表現型が見られた (図 13E, 13F)。この表現型異常を示す個体の割合は、注入した *Fam46a* MO の濃度依存的に上昇した (図 13G)。また、*Fam46a* MO に加えて *Fam46a* mRNA を共注入し、レスキュー実験を行なったところ、表現型異常を示す個体の割合は著しく減少した。このことから *Fam46a* MO は *Fam46a* に特異的に働くことが示された。体色に

関わる色素細胞は予定プラコード領域に隣接する神経堤領域の細胞群に由来すること知られている。したがってこれらの結果は、*Fam46a* が予定プラコード形成およびその維持に必要とされる一方で、神経堤分化に対しては阻害的に作用することを示唆した。

4-3 *Fam46a* 発現による外胚葉パターンニングの変化

発生のより初期における *Fam46a* の機能を探索するために、次に *Fam46a* mRNA あるいは *Fam46a* MO を片側割球のみに注入した過剰発現胚および機能阻害胚を作製し、初期神経胚における各外胚葉マーカー遺伝子の発現領域を正常胚と比較解析した (図 14)。方法としては予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1*、神経堤マーカー遺伝子 *Slug*, *FoxD3*、表皮マーカー遺伝子 *XK81*、神経板マーカー遺伝子 *Sox2* の各発現領域を *in situ* hybridization 法により解析した。その結果、*Fam46a* の過剰発現により、予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* の発現領域が表皮側に大きく拡大した (図 14A)。一方で機能阻害胚では *Six1* の発現領域が顕著に縮小していた。また神経堤マーカー遺伝子 *Slug*, *FoxD3* の発現領域については、*Fam46a* の過剰発現により発現領域が欠失あるいは顕著に縮小し、反対に *Fam46a* を機能阻害させると予定プラコード側に発現領域が顕著な拡大することが分かった (図 14B)。これらの結果は、*Fam46a* が予定プラコード形成に必要とされ、さらに隣接する神経堤分化に対して阻害的に作用するという仮説を強く支持した。さらに表皮マーカー遺伝子 *XK81* についても解析を行なったところ、*Fam46a* の過剰発現により発現領域の僅かな縮小が見られ、機能阻害により発現領域の僅かな拡大が見られた (図 14C)。しかしどちらも予定プラコード領域および神経堤領域の変化と比較すると大きな変化は見られなかった。神経板マーカー遺伝子 *Sox3* の発現領域は *Fam46a* の過剰発現により僅かに縮小し、機能阻害により僅かに領域が拡大していたものの、どちらにおいても *XK81* の発現パターンと同様に大きな変化は見られなかった。これらの結果から、*Fam46a* は主に予定プラコードと神経堤の領域形成において重要であり、過剰発現させると予定プラコード領域が拡大し、一方で隣接する神経堤領域は縮小することが示された (図 14D)。反対に *Fam46a* 機能阻害胚においては、予定プラコード領域が大きく縮小し、神経堤領域は大きく拡大していた。また表皮や神経板領域形成においても *Fam46a* は僅かながらに影響を与えており、*Fam-*

46aの過剰発現によりこれらの発現領域は僅かに縮小し、*Fam46a*の機能阻害により僅かに領域が広がることが示された。したがって、正常胚においては*Fam46a*の発現は主に予定プラコード領域形成に必要とされ、一方で神経堤領域には阻害的に作用していることが示された。

また*Fam46a*を機能阻害した際の、他の外胚葉マーカー遺伝子の発現変化についても解析を行なった。まず*Fam46a*を翻訳阻害した際の、前方プラコードマーカー遺伝子*Six3*、側方プラコードマーカー遺伝子*Ath-3*、後方プラコードマーカー遺伝子*Pax8*の発現領域を*in situ* hybridization法により解析した。その結果、機能阻害側ではこれらの遺伝子の発現領域はいずれも縮小あるいは欠失していた(図15A)。これは*Fam46a*欠損による予定プラコード形成異常が、その後のプラコード形成にも影響を与えることを示した。次に神経板境界遺伝子*Pax3*、神経幹細胞遺伝子*Pax6*、セメント腺遺伝子*CG*についても同様の解析を行なった。その結果、いずれの遺伝子についても*Fam46a*機能阻害により発現領域の拡大が見られ、特に*CG*については顕著な拡大が見られた(図15B)。したがって*Fam46a*はこれらの外胚葉遺伝子発現にも影響を与えていることが示された。

さらに、第1章において作製した予定プラコード様細胞および神経堤様細胞を用いて、*Fam46a*発現による各マーカー遺伝子の発現変化を再度検証した。*Chd* mRNA注入およびSU54-02添加により誘導した予定プラコード様細胞において、予定プラコードマーカー遺伝子*Six1*、*Eya1*の発現変化を*in situ* hybridization解析で調べた。その結果、*Fam46a*を阻害した際に*Six1*および*Eya1*遺伝子の発現の顕著な減少が見られた(図16A)。一方で*Chd* mRNAおよび*Wnt8* mRNA注入により誘導した神経堤様細胞において神経堤マーカー遺伝子*Snail*、*Slug*の発現量変化を調べた結果、*Fam46a*を過剰発現させた際にこれらの遺伝子の発現は顕著に減少していた(図16B)。この結果は、*Fam46a*が予定プラコード遺伝子発現に必要とされ、神経堤遺伝子発現に対して阻害的に作用するというこれまでの仮説を支持した。最後に同サンプルを用いて、神経板境界遺伝子および各プラコード遺伝子の発現量変化をqPCR法により定量的に解析した。予定プラコード様細胞では、神経板境界遺伝子*Zic1*、予定プラコード遺伝子*Six1*および*Eya1*、前方プラコード遺伝子*Six6*および*Pax2*も発現していた。*Fam46a* MOを注入した際、これらの遺伝子発現は大きく減少し、特に*Zic1*と*Six1*においては顕著にその傾向が見

られた (図 17A)。神経堤様細胞では、神経板境界遺伝子 *Pax3* と *Zic1* そして神経堤遺伝子 *Snail* と *Slug* が発現していた。*Fam46a* mRNA を注入した際、*Pax3* の発現は軽度に減少したが、*Zic1* は変化が見られなかった (図 17B)。*Snail* と *Slug* の発現は *Fam46a* の過剰発現により顕著に減少した。この結果は *Fam46a* 発現が神経板境界遺伝子 *Zic1* と予定プラコード遺伝子 *Six1*, *Eya1* の発現に必要とされ、神経板遺伝子 *Pax3*、神経堤遺伝子 *Snail*, *Slug* の発現に対して阻害的に働いていることを示した。

4-4 ヌクレオチド転移酵素 *Fam46a* の細胞内局在観察

Fam46a タンパク質は、そのアミノ酸配列およびタンパク質の立体構造解析の結果から、ヌクレオチド転移酵素である NTP transferase-7 ドメインを持つことが知られている (Lagali et al., 2002)。また *Fam46a* タンパク質は他の動物においても広く存在しており、さらにそのアミノ酸配列の保存性が非常に高いことから、このタンパク質は生体内で重要な役割を担っていることが示唆される。NTP transferase-7 ドメイン内におけるアミノ酸配列比較を行なった結果、ツメガエル *Fam46a* と比較して、ヒト *Fam46a* では 92 %、マウス *Fam46a* では 93 %、そしてショウジョウバエ *Fam46a* では 61 % と高い相同性が見られることが確認された (図 18-A, 18B)。またドメイン外の N 末端側のアミノ酸配列を動物間で比較したところ、配列の保存性はほとんど見られなかった。一方でドメイン外の C 末端側のアミノ酸配列については、ツメガエル *Fam46a* と他の動物の *Fam46a* 間での比較解析を行なった結果、ヒトでは 95 %、マウスでは 95 % の相同性があることが分かった。ショウジョウバエとの比較ではほとんど相同性が見られなかった。したがって *Fam46a* タンパク質においては、NTP transferase-7 ドメインが重要な役割を持つことが示唆された。しかし、このドメインを持つタンパク質の詳細な機能についてはこれまでに多く報告がなされておらず、酵素活性を担うリン酸化等の活性化部位や、その反応に用いられると考えられる基質の種類についても特定されていない。

また、異質四倍体であるツメガエルにおいては、*xFam46a* のホメオログとして *xFam46a-S* および *xFam46a-L* の 2 種類のタンパク質が存在する。そこでこの 2 つのタンパク質間のアミノ

酸の相同性比較も行なった。その結果、NTP transferase-7 ドメイン内において約 99 % の非常に高い相同性が見られた (図 19A, 19B)。また、ドメイン外の N 末端側の配列では 87.5 %、C 末端側の配列では 100 % の相同性が見られた。さらに同じ Fam46 ファミリーに属する xFam46a, xFam46b, xFam46c そして xFam46d についてもアライメント比較を行なった。その結果、NTP transferase-7 ドメイン内で Fam46a と比較すると、それぞれ Fam46b は 75 %、Fam46c は 74 %、Fam46d とは 70 % の相同性が見られることが分かった (図 19C, 19D)。また N 末端側の配列では相同性がほとんど見られず、C 末端側の配列では Fam46b は 53 %、Fam46c は 69 %、Fam46d は 79 % の Fam46a との相同性が見られることが分かった。これらの結果から、Fam46a は Fam46 ファミリー内においても配列の保存性が非常に高く、特に NTP transferase-7 ドメインにおいてその傾向が強く見られ、さらに C 末端側の配列の相同性も高いことから、これらの領域において重要な機能があることが推測された。

次に Fam46a のタンパク質としての機能を探索するために、ヒト培養細胞である HeLa 細胞を用いて、ツメガエル Fam46a の細胞内の局在観察を行なった。GFP-Fam46a を pCS2 ベクターに導入したプラスミドコンストラクトを作製して、HeLa 細胞にトランスフェクションを行い、その 24 時間後に顕微鏡で蛍光観察を行なった。その結果、GFP-Fam46a は細胞全体に発現しており、Fam46a は核および細胞質に局在していることが分かった (図 20)。また別の観点として、ヒト Fam46a は Yeast Two-Hybrid System を用いた先行研究において、BMP シグナルの構成因子である Smad1 と直接的に結合することが報告されている (Colland et al., 2004)。そこで次に、Fam46a と BMP シグナルとの関連性について検証実験を行なった。Smad1 は BMP シグナルの構成因子であり、BMP シグナルが活性化されると受容体に直接リン酸化され、他の Smad1 と二量体を形成し、さらに Smad4 と複合体を形成した後に核移行して BMP シグナルのターゲット遺伝子のプロモーター領域に直接結合することで、一連の遺伝子の転写を活性化する。そこで BMP シグナル活性化時に Fam46a も細胞内で局在変化するという仮説を立て、検証実験を行なった。先ほどと同様の手法により pCS2-GFP-Fam46a プラスミドコンストラクトをヒト HeLa 細胞にトランスフェクションし、その 24 時間後に Fam46a の細胞内局在を顕微鏡で蛍光観察した。BMP シグナルのリガンドである BMP4 タンパク質を培地に添加

し、添加後 15 分毎に写真撮影を行なった(図 21)。その結果、添加前は核および細胞質で見られた Fam46a の局在は、BMP4 添加後 60 分後から徐々に核で多く観察され、105 分後には Fam46a の核局在化が顕著に見られた。この結果は、Fam46a が BMP シグナルと強い関連性を持っており、BMP シグナルが活性化された状態では、BMP シグナル構成因子である R-Smad (Smad 1/5/8) が示す挙動と類似して、細胞内の核局在化が促進されることが示唆された。

4-5 Fam46a と BMP シグナルの関連性の検証

ヒト HeLa 細胞を用いた細胞内局在変化の観察により、Fam46a は核および細胞質に局在し、BMP シグナルと強い関連性があり、BMP シグナル活性時には Fam46a 自身も核に移行していることが示された。そこで次に Fam46a の発現が、BMP シグナルに対して促進的あるいは抑制的に働くかを調べるための検証実験を行なった。BMP シグナル活性時の Fam46a の機能を調べるため、ツメガエルの外胚葉片 (アニマルキャップ) に一定量の *BMP4* の mRNA および *Fam46a* mRNA を 200 pg, 1000 pg の二段階の濃度で共注入して培養した際の、BMP シグナルターゲット遺伝子 *Vent1*, *Vent2* mRNA の発現量変化を qPCR 法により定量解析した。その結果、Fam46a を発現させた際には、BMP4 を単独で発現させた際よりも、*Vent1*, *Vent2* どちらの発現量も上昇することが分かった (図 22)。しかしいずれの遺伝子の発現量の上昇のレベルも、*Fam46a* mRNA 200 pg あるいは 1000 pg 注入時では大きな差が見られなかった。

さらに同様の検証を、ツメガエルの胞胚期の胚を用いて行なった。胞胚期の胚の動物極側においては、BMP4 を始めとする BMP タンパク質が豊富に存在しており、それにより BMP シグナルのターゲット遺伝子である *Vent1*, *Vent2*, *Id3*, *AP2* 等の因子も多量に発現していることが知られている (Nordin and LaBonne, 2014)。そこで BMP 受容体である *BMPRII* mRNA、ドミナントネガティブ受容体である *tBR* の mRNA、あるいは *Fam46a* mRNA を胚の片側割球に注入して過剰発現させた際の、*Vent1*, *Vent2* の発現パターンの変化を *in situ* hybridization 法により解析した。*BMPRII* を発現させると *Vent1*, *Vent2* の発現量はいずれも顕著に上昇し、反対に *tBR* を発現させるとこれらの遺伝子の発現量は減少した (図 23)。一方で *Fam46a* を発現させた際には、*BMPRII* の発現時と同様に、*Vent1*, *Vent2* の発現量が上昇していること

が分かり、特に *Vent2* に関しては顕著な上昇が見られた。*Fam46a* MO 注入による機能阻害実験も行なったが、発現パターンの変化は見られなかった。この理由としては胞胚期に *Fam46a* が微量にしか存在していないためほとんど機能しておらず、そのため *Fam46a* MO による機能阻害の影響が表れなかったと考えられる。これらの結果から、*Fam46a* は BMP シグナルに対して促進的に作用しており、BMP シグナルターゲット遺伝子である *Vent1*, *Vent2* の発現を促進していることが示された。

Fam46a 発現による BMP シグナルの活性化が示されたことから、次に *Fam46a* 発現による BMP シグナル構成因子 *Smad1* の細胞内局在変化を解析した。方法としては、BMP シグナルが恒常的に働いている細胞群において観察を行うため、Wnt シグナル構成因子 β -*catenin* に対する MO を胚に注入し、胚発生における原腸陥入を阻害することで胞胚期の状態を維持したツメガエル胚を作製した。カノニカル Wnt シグナルは原腸陥入の引き金となるオーガナイザー組織を誘導するシグナルであることが知られており、そのシグナルを抑制することで原腸陥入運動が阻害される。胚の作製にあたっては、 β -*catenin* MO 注入に加えて、mCherry タグ付き *Smad1* mRNA を共注入し、さらに BMP シグナル抑制のために *Chd* mRNA と *Fam46a* mRNA も共注入した。そして同時に発生を開始した正常胚が初期の神経胚期となるまで培養し、顕微鏡で蛍光観察を行い、*Smad1* の細胞内局在変化を解析した。胚の動物極側の細胞群において蛍光観察を行なったところ、mCherry-*Smad1* に加えて β -*catenin* MO のみを注入した胚では、約 82 % の細胞において *Smad1* が核に局在している様子が観察された (図 24)。一方で *Chd* mRNA を共注入した胚では *Smad1* が核にのみ局在している細胞の割合は 45 % に減少し、局在は核だけでなく細胞質全体に広がっている様子が確認された。さらに *Chd* に加えて *Fam46a* を発現させた際には、*Smad1* が核に局在している細胞の割合は 79 % と、 β -*catenin* MO のみを注入した際と同程度の細胞の割合に回復している様子が観察された。これらの結果は、*Chd* 発現によって抑制された BMP シグナルの活性が、*Fam46a* の発現によって再度活性化され、それにより *Smad1* の細胞内局在が細胞質から核へと移行したことを示唆した。以上の結果から、*Fam46a* は BMP シグナルに対して促進的に働いており、BMP シグナルの構成因子である *Smad1* の核移行にも直接的に影響を与えていることが示唆された。

4-6 Fam46a と BMP シグナル構成因子 Smad1 および Smad4 との相互作用

これまでの Fam46a と BMP シグナルの関連性についての研究結果に加えて、Yeast-two hybrid 法を用いた先行研究において、ヒト Fam46a は BMP シグナル構成因子である Smad1 に直接的に結合するタンパクの一つであることが報告されている (Colland et al., 2004)。それゆえに次に Fam46a の詳細な作用機序を探索するために、BMP シグナル構成因子である Smad と Fam46a との物理的な相互作用に着目し、共免疫沈降法による検証実験を行なった。BMP シグナルは、リガンドである BMP が受容体に結合した後に、受容体が R-Smads (Smad1/5/8) を直接リン酸化し、その後 R-Smad 同士がそれぞれ二量体を形成する。そしてその二量体は Co-Smad である Smad4 と細胞質中で結合して複合体を形成した後に核へと移行し、BMP シグナルのターゲット遺伝子のプロモーター領域に直接結合することで、転写を活性化させる。

そこでまず Fam46a と R-Smad の 1 つである Smad1 が相互作用しているかどうかを、共免疫沈降法により解析した。GFP タグ付きの Fam46a コンストラクトおよび Myc タグ付きの Smad1 コンストラクトを作製し、GFP をネガティブコントロール、GFP タグ付き Smad4 をポジティブコントロールコンストラクトとして用いた。各 GFP タグ付き mRNA あるいは各 GFP タグ付き mRNA と Myc-Smad1 を共注入した胚を用いて、GFP 抗体によるプルダウンアッセイを行なった (図 25A, 25B)。その結果、GFP-Fam46a と Myc-Smad1 の共発現サンプルにおいて、Myc-Smad1 のバンドが確認され、Fam46a と Smad1 の間に物理的な結合があることが示された (図 25A, 赤枠)。GFP-Smad4 および Myc-Smad1 の共発現サンプルにおいても Myc-Smad1 のバンドが確認され、先行研究による報告と同様に、Smad1 と Smad4 も直接的に結合していることが確認された。次に同様の実験を BMP 受容体阻害剤である LDN193189 添加条件で培養したサンプルにおいても行なった。その結果、GFP-Fam46a および Myc-Smad1 の共発現サンプルにおいて、Myc-Smad1 のバンドが確認され、BMP シグナルがオフの時点においても Fam46a と Smad1 は結合していることが分かった (図 25B, 赤枠)。LDN 処理を行なった際は、R-Smad1 である Smad1 は受容体にリン酸化されず、Co-Smad である Smad4 と複合体を形成することが出来ない。そのため、先行研究の報告と同様に、GFP-Smad4 と Myc-Smad1 間

では物理的な結合は見られなかった。以上の結果から、Fam46a は BMP シグナルのオンの時およびオフの時のどちらの状態においても Smad1 と物理的に結合していることが示された。

次に Fam46a が結合する Smad1 の詳細なドメインを特定するために、Smad1 においてドメイン欠損コンストラクトを作製した。Smad1 タンパク質は、DNA 結合領域を持つ MH1 ドメインと、BMP シグナル受容体によるリン酸化を受ける SSXS モチーフを含む MH2 ドメイン、そしてそれらをつなぐリンカー部位によって構成されている。そこでそれぞれ MH2 ドメインを欠損させた Myc-Smad1-MH1 コンストラクト、MH1 ドメインおよびリンカー部位を欠損させた Myc-Smad1-MH2 コンストラクトを作製した (図 26A)。そして各コンストラクト、または各コンストラクトと GFP-Fam46a を共発現させたサンプルにおいて、Myc 抗体を用いてプルダウンアッセイを行なった。その結果、Myc-Smad1 と GFP-Fam46a あるいは Myc-Smad1-MH1 と GFP-Fam46a の共発現サンプルにおいて、GFP-Fam46a のバンドが確認され、Fam46a は Smad1 の MH1 ドメインにおいて特に強く結合していることが示された (図 26B)。一方で Smad1 の MH2 ドメインと Fam46a の間には物理的な結合は確認されなかった。

次に同様の手法により、Fam46a と Smad4 の相互作用を検証した。GFP-Fam46a に加えて Myc タグ付き Smad4 コンストラクトを作製し、GFP をネガティブコントロール、Smad2-GFP をポジティブコントロールとして用いた。各コンストラクトあるいは各コンストラクトと Myc-Smad4 を共注入したサンプルを作製し、GFP 抗体を用いてプルダウンアッセイを行なった。その結果、GFP-Fam46a と Myc-Smad4 の共発現サンプルにおいて GFP-Fam46a のバンドが確認され、Fam46a と Smad4 間に結合があることが示された (図 27A, 赤枠)。

最後に、Fam46a-Smad1 および Fam46a-Smad4 間の結合の強さを検証するために、図 24A および図 26A におけるウエスタンブロットの結果を、ImageJ を用いた Density ratio 計測により定量的に解析した (図 26B)。その結果、Fam46a-Smad1 結合は Smad1-Smad4 結合と比較すると値が顕著に低くなっており、非常に弱い結合であることが示された (図 27B, 上図)。一方で、Fam46a-Smad4 結合は Smad2-Smad4 結合と比較して値にほとんど差が見られず、強い結合であることが示された (図 27B, 下図)。以上の結果から、Fam46a は Smad1 および Smad4 の両者と結合しており、さらにその結合は Smad4 との間で強いことが示唆された。

4-7 Fam46a による Smad1 の発現量変化の解析

これまでの研究で、Fam46a は BMP シグナルを促進的に制御し、さらに BMP シグナル構成因子である Smad1 および Smad4 と物理的に相互作用することが示された。そこで次に、BMP シグナル活性化時に起こる R-Smad (Smad1/5/8) のリン酸化に着目し、Fam46a 発現により Smad1 のリン酸化が促進されるかどうかをウエスタンブロットにより検証した。方法としては、2 細胞期のツメガエル胚に一定量の *BMP4* mRNA と *Fam46a* mRNA を 200 pg, 500 pg, 1000 pg の三段階の濃度で共注入して培養したサンプルを作製し、Fam46a 発現時の pSmad1 (C 末端側のリン酸化)、total の Smad1 (リン酸化 Smad1+ 非リン酸化 Smad1) のタンパク質発現量変化を解析した。内在性コントロールとしては β -tubulin を用いた。その結果、BMP4 発現により pSmad1 の発現量の顕著な上昇が見られた (図 28A)。しかし意外なことに、Fam46a を発現させてもリン酸化 Smad1 の発現量の上昇は見られず、1000 pg の注入の際にも変化が見られなかった。この結果は、Fam46a が BMP シグナルを促進する役割を担っているものの、その作用機序としては R-Smad のリン酸化以外の経路に働きかけることによって起こっていることを示唆した。

そこで次に Smad1 タンパク質の安定性に着目した。Smad1 の安定性に関わる先行研究においては、他のシグナルの影響を受けてタンパク質の分解が促進される例が報告されている。Smad1 はリンカー領域に存在するリン酸化サイトを、Wnt シグナル下流の GSK-3 β や FGF シグナル下流の MAPK によってリン酸化されることにより、その後ユビキチン化され、最終的にプロテアソームにおいて分解されることが知られている (Fuentealba et al., 2007)。前述の共免疫沈降実験の結果は、Fam46a が、Smad1 の DNA 結合領域を含む MH1 ドメインおよびリンカー部位と結合することを示した。そこで Smad1 と物理的に結合する Fam46a は、Smad1 のリンカー領域に結合することによって、FGF および Wnt シグナル活性化時にシグナル構成因子の影響により通常起こる Smad1 のリンカー部位のリン酸化を抑制し、それにより Smad1 分解を阻害しているのではないかという仮説を立て、検証を行なった。方法としては Myc タグ付き *Smad1* mRNA を胚に一定量注入し、さらに *Fam46a* mRNA を 200, 500, 1000 pg の三段階の

濃度で共注入して培養したものをサンプルとして作製した。そして Myc, GFP の抗体を用いてそれぞれ Smad1, Fam46a のタンパク質の発現量をウエスタンブロットで解析した。内在性コントロールとして β -tubulin の発現量を解析した。その結果、Smad1 についてはリン酸化されたフォームおよび非リン酸化フォームの2本の Smad1 のバンドが検出された (図 28B, Pera et al., 2003)。また Fam46a についても同様に、リン酸化フォームと非リン酸化フォームの2本のバンドが検出された。そしてリン酸化 Smad1 の発現においては、Fam46a 発現により発現量はほとんど変化していなかった。一方で非リン酸化 Smad1 については、Fam46a 注入により発現量が顕著に増加することが示された。またその発現量の増加は、注入した Fam46a の濃度依存的であった。したがってこれらの結果は Fam46a が発現することにより、非リン酸化 Smad1 の発現量が増加することを示した。このことは可能性として、Fam46a が Smad1 に物理的に結合することで、他のシグナル因子の影響で起こるタンパク質分解の促進を阻害することで安定化させ、発現量上昇を引き起こしていることを示した。最後に、同様の解析を Smad4 の分解にも着目して行なった。一定量の Myc-*Smad4* mRNA と *Fam46a* mRNA を三段階の濃度で注入して培養した胚を用いてサンプル作製を行なった。そして Myc, GFP の抗体を用いて、それぞれ Smad4, Fam46a の発現量の変化をウエスタンブロットにより解析した。内在性コントロールとして β -tubulin の発現量を解析した。その結果、Smad4 の発現量は Fam46a の注入により大きな変化は見られなかった (図 28C)。一方で、Smad4 にはリン酸化フォームは確認されなかったものの、Smad1 の解析時と同様に、Fam46a はリン酸化フォームおよび非リン酸化フォームの2種類が存在することが分かった。したがって Fam46a の発現は Smad4 の発現量には影響を与えないことが示された。

そこで最後に、Fam46a 発現により、顕著な発現量の変化が見られた非リン酸化 Smad1 の発現量変化について、ImageJ による Density ratio 計測によって定量的解析を行なった (図 27B, D)。リン酸化 Smad1、非リン酸化 Smad1 および total (リン酸化+ 非リン酸化) Smad1 の発現量について解析を行なった結果、リン酸化および total の Smad1 の発現量は Fam46a 発現によりあまり変化が見られなかったが、非リン酸化 Smad1 の発現量は Fam46a 注入により顕著

に増加し、その増加量は Fam46a の注入量依存的であることがわかった。したがってこの結果からも、Fam46a の発現は、非リン酸化 Smad1 の発現量を顕著に増加させることが示された。

4-8 Fam46a による BMP シグナルターゲット遺伝子の転写活性化への影響

これまでの研究結果から、Fam46a は Smad1 および Smad4 と物理的に結合し、さらに Smad1 についてはそのタンパク質の安定化に寄与する可能性が示された。そこでさらなる Fam46a の作用機序の解明の一端として、Fam46a が Smad1 および Smad4 と複合体を形成したのちに核移行し、BMP シグナルのターゲット遺伝子のプロモーター配列に結合することで遺伝子発現を促進しているのではないかという仮説を立て、検証実験を行なった。方法としては BMP シグナルターゲット遺伝子の *Id3* のプロモーター配列を用いたルシフェラーゼアッセイを行い、Fam46a 発現時あるいは機能阻害時に、*Id3* の転写活性が変化するかどうかを検証した。

まず Fam46a 発現時の変化を解析するために、Smad1、Fam46a、あるいは Smad1 と Fam46a を共発現させた胚を作製し、*Id3* のプロモーター配列を用いたルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果、Smad1 発現により、無処理胚と比較して 1.6 倍程度の *Id3* の転写活性化が見られた (図 29A)。Fam46a 発現時にも、Smad1 発現の際と比較すると僅かに活性化のレベルが低いものの、約 1.4 倍程度の転写の活性化が見られることが分かった。意外なことに、Smad1 および Fam46a の共発現時における *Id3* の転写活性化のレベルは、無処理胚と比較して約 1.5 倍程度であり、それぞれ単独で発現させた場合と比較しても顕著な増加は見られなかった。以上の結果から、Fam46a は *Id3* を始めとする BMP シグナルのターゲット遺伝子の転写活性化を促進していることが示唆された。

次に、Fam46a の機能阻害時の変化を解析するために、*Smad1* mRNA と *BMP4* mRNA、または *Smad1* mRNA、*BMP4* mRNA と *Fam46a* MO を共注入した胚を作製し、同様に *Id3* のプロモーター配列を用いたルシフェラーゼアッセイを行なった。その結果、Smad1 および BMP4 発現の際には、無処理の胚と比較して約 1.2 倍の *Id3* の転写活性化が見られた (図 29B)。一方で *Smad1* mRNA と *BMP4* mRNA に加えて *Fam46a* MO を共注入した際には、*Id3* の転写活性化は、無処理の胚と比較して約 0.97 倍となっており、転写が抑制されていることが分かつ

た。以上の結果から、先ほどの結果と同様に、Fam46a の発現は *Id3* を始めとする BMP シグナルのターゲット遺伝子の転写の活性化に必要とされていることが示唆された。

4-9 Fam46a による *Vent1*, *Vent2* mRNA の安定化への影響

最後に、近年 Fam46a および Fam46a とアミノ酸配列の相同性の高い Fam46c と Fam46d が、アミノ酸配列とタンパク質の立体構造の解析から、非カノニカルポリ A ポリメラーゼであると示された報告に着目した (Kuchta et al., 2009; Mroczek et al., 2017)。非カノニカルポリ A ポリメラーゼは、細胞内において核および細胞質に局在し、遺伝子の転写後調節に働き、前駆 mRNA の 3' UTR 領域のポリ A 付加配列に結合して、mRNA の尾部にポリ A 配列を付加して mRNA 安定性を増強し、遺伝子発現の安定化に関わると考えられる酵素である。しかし初期発生においては働く時期や領域等のタンパク質の詳細な機能はほとんど報告がされていない。

そこで、Fam46a のさらなる機能として、BMP シグナルターゲット遺伝子が mRNA に転写されたのちに、その 3' UTR 領域のポリ A 付加配列に Fam46a が特異的に結合し、ポリ A 配列を付加することにより mRNA の安定化に関与しているのではないかという仮説を立て、検証実験を行なった。方法としては、pCS2 ベクターに BMP シグナルターゲット遺伝子 *Vent1* を挿入したコンストラクトと pBluescript II SK (SK) ベクターに *Vent1* の配列を挿入したコンストラクトを作製し、それぞれを鋳型として *in vitro* 転写を行なった。pCS2 ベクターはマルチクロニングサイトの外側にポリ A 付加配列を持つため、転写後の mRNA にはポリ A 配列が付加されている。一方で SK にはそのような配列は含まれていないため、転写後の mRNA にはポリ A 付加配列は存在しない。これらの mRNA をそれぞれ胚に注入し、原腸胚期まで培養した胚からサンプルを作製し、RT-qPCR 法により mRNA 量を定量的に解析した。さらに *Fam46a* MO あるいは *Fam46a* mRNA を共注入し、Fam46a 発現による mRNA 量の変化を解析した。その結果、*Vent1*-poly(A) 注入胚では mRNA 量が多く、ポリ A 配列無しの *Vent1* 注入胚では mRNA 量は少なく、非注入胚と同程度の量であることが分かった (図 30A,B)。これはポリ A 配列の無い mRNA は安定性がなく、大半が分解されたと考えられる。mRNA 量の多く見られた *Ve-*

ntl-poly(A) 注入胚においては、*Fam46a* MO を共注入した際には、mRNA 量の顕著な減少が見られた (図 30A)。反対に *Vent1*-poly(A) mRNA と *Fam46a* mRNA を共注入した胚においては、mRNA 量の顕著な上昇が見られた (図 30B)。以上の結果から、*Fam46a* はポリ A 付加を介した BMP シグナルターゲット遺伝子の転写後調節にも関わっている可能性が示された。

5. 考察

これまでの研究結果から、予定プラコード様細胞を用いた DNA マイクロアレイ解析で同定された *Fam46a* は、初期神経胚における予定プラコードおよび尾芽胚期における鼻、鰓、耳の各プラコードに特異的に発現する遺伝子であることが示された。また *Fam46a* の発現パターンは予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* および *Eya1* と類似していることが分かった。また予定プラコード様細胞において、予定プラコード関連エピジェネティック因子 *PRDM12* を機能阻害させた際には、*Six1* と *Eya1* の発現量はどちらも顕著に減少することが示されたが、その際に *Fam46a* の発現量も同様に顕著に減少することが分かった。この結果から、*Fam46a* は空間的発現パターンだけでなく、発現挙動も予定プラコードマーカー遺伝子と類似していることが示された。さらに、*Fam46a* は発現開始時期が BMP シグナルターゲット遺伝子 *Vent1* と *Vent2* と同時期の後期原腸胚期であり、これは *Six1* と *Eya1* の発現開始時期の初期神経胚期よりも早くなっていた。この結果から、*Fam46a* は *Six1* および *Eya1* を含む予定プラコード遺伝子の上流因子として働き、それにより予定プラコード形成を制御している可能性が考えられた。

また *Fam46a* 発現が、神経胚期における外胚葉パターンニングに与える影響について調べたところ、*Fam46a* の機能阻害により予定プラコード領域が縮小し、一方で隣接する神経堤領域が拡大することが示された (図 14)。反対に、*Fam46a* の過剰発現では予定プラコード領域が拡大し、一方で神経堤領域は縮小することが分かった。これらの結果は、*Fam46a* の発現が予定プラコードの形成に必要とされ、かつ神経堤の形成に対しては阻害的に作用していることを示した。先行研究においても、*Six1*, *Eya1* を始めとする予定プラコード遺伝子が隣接する *FoxD3* 等の神経堤遺伝子の発現を抑制する例が報告されていた (Brugmann et al., 2004; Leung et al., 2013)。したがって本研究の結果は、*Fam46a* もこれらの既存の予定プラコード遺伝子と同様の挙動を示すことを示し、これまでの予定プラコード遺伝子における先行研究の報告を支持した。また *Fam46a* の過剰発現胚や機能阻害胚における表現型観察において、プラコードを含む頭部の組織形成の異常、および神経堤由来の細胞による色素沈着異常の表現型が多く見られた

ことから、この遺伝子が初期発生の特に関与する神経胚期において、重要な役割を担っていることが推測された。

さらに、神経胚期の予定プラコード領域形成において *Fam46a* の影響を受ける遺伝子として神経板境界遺伝子 *Zic1* が挙げられることが分かった (図 17)。*Zic1* は、予定プラコード様細胞および神経堤様細胞において発現が見られたが、予定プラコード様細胞においては *Fam46a* の機能阻害により発現量が減少したが、一方で神経堤様細胞においては *Fam46a* を過剰発現させた場合には発現量の変化が見られず、*Fam46a* の発現の影響を受けなかったことが示された。このことから、*Zic1* は予定プラコード形成では *Fam46a* と協調的に働いており、一方で神経堤形成においては *Fam46a* との相互作用を持たない可能性が示された。

次に行なった予定プラコード領域形成における *Fam46a* の作用機序の探索では、*Fam46a* と BMP シグナルとの関連性が明らかになった。具体的には *Fam46a* が BMP シグナルの構成因子 Smad1 および Smad4 に物理的に結合して複合体を形成しており、さらに BMP シグナルターゲット遺伝子の mRNA の転写を促進していることが示された (図 31)。この機構により *Fam46a* は一連の BMP シグナルのターゲット遺伝子の転写を活性化し、結果として BMP のシグナルを活性化させると考えられる。この作用機序は *Pax7* や *Msx1* などの神経板遺伝子と類似しており (Grocott et al., 2012; Groves and LaBonne 2014)、*Fam46a* もこれらの因子と協調的に働いていることが推測された。また BMP シグナル活性化時だけでなく、LDN193189 処理により BMP シグナルをオフにした条件においても、*Fam46a* と Smad1 との間には相互作用が見られた。さらにウエスタンブロットの解析結果から、*Fam46a* を発現させることで、非リン酸化 Smad1 の発現量の増加が見られることが分かったことから (図 28B)、このことは可能性として、*Fam46a* が Smad1 と物理的に結合することで、通常起こる Smad1 タンパク質の分解を阻害することで安定化させ、それにより Smad タンパク質の総量が増えることが考えられた。それにより *Fam46a* が BMP シグナルターゲット遺伝子の転写を活性化させ、結果として BMP シグナルを活性化させる経路がある可能性を示した。実際に原腸胚期に形成される神経板境界領域においては、他にも *Zic1*, *Msx1*, *Pax7*, *Dlx3* を始めとする転写因子が発現し、この一連の転写因子が発現が予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1*, *Eyal* の発現を制御し、それにより予定プ

ラコードおよび神経堤の領域形成に関わっていると考えられている (Grocott et al., 2012)。したがって今後は、これらの転写因子と Fam46a との関連性、および協調的に働く機構を検証することで、Fam46a による予定プラコード領域形成の制御機構を明らかにしていく必要がある。

結論

様々な感覚神経関連器官の原基である予定プラコードは、初期発生において一過的に形成される組織であり、その詳細な形成機構解明および予定プラコードの領域特異的に発現するマーカー遺伝子の探索はこれまで十分に進められて来なかった。そこで本研究ではこの予定プラコード形成機構の解明を目的として、実際の胚発生を模倣したシグナル調節によるツメガエルの多能性細胞からの予定プラコード様細胞の誘導系の確立と、DNA マイクロアレイによる比較解析における新規の予定プラコード関連遺伝子の同定、および同定した 遺伝子についての予定プラコード領域形成における機能解析を行った。

第 1 章においては、ツメガエル外胚葉の細胞群から予定プラコード様細胞を特異的に誘導する系の確立を行った。初期神経胚期の外胚葉の表皮、予定プラコード、神経堤、神経板の各組織への分化規定においては、BMP シグナル活性が重要な役割を担っているという知見に着目し、他のシグナル活性は調節することなく、BMP シグナル活性のみを適切に調節することによって、予定プラコード様細胞を特異的に誘導することを目指した。実際の外胚葉においては、原腸胚期から神経胚期にかけて *Chd* を始めとする BMP 阻害因子が発現していることから、*Chd* 発現量を調節することによって BMP シグナル活性を調節した。その結果、表皮分化に必要な *Chd* 発現量と神経板分化に必要な *Chd* 発現量の中間の発現量の条件で、予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* および *Eya1* が最も多く発現していることが分かり、中程度の BMP シグナル活性強度の条件が予定プラコード様細胞誘導の至適条件であることが明らかとなった。さらに予定プラコード形成に続いて起こる各プラコードの部域化の過程にも着目したところ、Wnt シグナル活性が弱い領域で前方のプラコードが、活性が強い領域では側方および後方のプラコードが誘導されることが示された。これらの結果は、胚発生の初期神経胚期での予定プラコードの形成機構解明に加えて、後期神経胚期での予定プラコードから部域化する各プラコードの形成機構を解明することができたと言える。またこれらの知見は予定プラコードに隣接する神経堤等の領域内の部域化においても Wnt シグナルが役割を持っている可能性を示している。得られた知見は今後、再生医療分野のヒト培養細胞を用いた分化誘導系への応用が期待される。例え

ば、実際に水晶体や三叉神経だけを高効率かつ特異的に誘導することで、疾患患者への移植治療が可能になると考えられる。

次に行った予定プラコード様細胞を用いた DNA マイクロアレイ解析では、新規予定プラコード関連遺伝子の同定を目指した。実際の胚発生においては、予定プラコード特異的ではなく他の外胚葉領域においても発現している遺伝子が多数存在していることを考慮して、予定プラコード以外の外胚葉組織である表皮様細胞、神経堤様細胞、神経板様細胞の誘導条件についても同様に条件検討を行った。4つのサンプルにおいて DNA マイクロアレイを行い、サンプル間での比較解析を行った結果、128 の遺伝子が予定プラコード様細胞において特異的に発現が上昇していることがわかった。最終的に初期神経胚における空間的な発現パターンの解析と合わせた結果、神経胚期の予定プラコード、および尾芽胚期の各プラコードで発現が見られた *Fam46a* を新規予定プラコード関連遺伝子として同定することに成功した。今後は Wnt シグナル調節によって誘導した各プラコード細胞においても同様に解析を行うことにより、予定プラコードからの部域化の過程で重要な役割を持つ因子を同定することが必要とされる。

第 2 章においては、新たに同定した予定プラコード関連遺伝子 *Fam46a* についての詳細な機能解析を行った。*Fam46a* は初期原腸胚期から発現が始まり、初期幼生期まで発現が続き、発現量は発生が進むにつれて上昇していた。さらに発現パターンおよび発現の挙動が既知の予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* および *Eya1* と類似していたことから、*Fam46a* は有用な予定プラコード遺伝子であることが示された。さらに *Fam46a* の機能欠損により予定プラコードが縮小し、隣接する神経堤が拡大することが示されたことから、*Fam46a* の発現は予定プラコード形成に必須であり、神経堤形成に対して阻害的に作用することが示された。この結果は予定プラコードに発現する遺伝子が神経堤遺伝子発現に対して阻害的に作用し、予定プラコード-神経堤間の境界規定を強固なものにしているという先行研究の結果を支持した。またその作用機序としては *Fam46a* が BMP シグナルを促進していることが分かった。実際に *Fam46a* は BMP シグナル構成因子 Smad1 および Smad4 と結合し、さらに *Fam46a* 自身も核移行して BMP シグナルターゲット遺伝子 *Id3* の転写を活性化することが示された。このことは、予定プラコー

ド形成には一過的な BMP シグナルの促進が必要とされており、原腸胚期から発現する *Fam46a* を始めとする因子によって BMP シグナル活性が調節されている可能性を示した。

さらに *Fam46a* は BMP シグナルがオフの時にも、シグナル構成因子である Smad1 と結合し、*Fam46a* の発現により非リン酸化 Smad1 の発現量が増加することが示された。この結果は、*Fam46a* が Smad のタンパク質の分解を阻害し安定化させていることを示唆していた。さらに *Fam46a* はそのアミノ酸配列およびタンパク質の立体構造から、ポリ A ポリメラーゼとして機能することが推測されており、実際に *Fam46a* 発現条件下では BMP シグナルターゲット遺伝子の mRNA 量が多くなっていることが示された。したがって *Fam46a* は、シグナルターゲット遺伝子の mRNA の安定化に関与し、それによりシグナルを促進していることが考えられた。この様に *Fam46a* はターゲット遺伝子の転写活性化とは別の経路によっても BMP シグナルを促進している可能性が示された。今後は *Fam46a* による制御を受ける因子を DNA マイクロアレイ解析等で探索することでより詳細な制御機構を解明することが期待される。

以上のように、本研究では複雑なプラコード形成機構解明の一端として、外胚葉組織から予定プラコードが形成される過程およびその後起こる予定プラコードから各プラコードへの領域化の過程で働くシグナル経路を解明した。さらにツメガエル外胚葉片から予定プラコード様細胞を誘導し、特異的に発現が上昇していた遺伝子群の中から、新規予定プラコード関連遺伝子として *Fam46a* を同定した。そしてこの遺伝子が新規予定プラコードおよび各プラコード形成に必要とされ、その制御機構としては BMP シグナルターゲット遺伝子の転写調節による、直接的なシグナルの促進があることが示された。これらの知見は今後の動物発生学分野での詳細なプラコード形成機構の解明や新規プラコード遺伝子探索、また再生医療分野でのヒト培養細胞からのプラコードの分化誘導実験における、マーカー遺伝子としての応用やより高効率な分化誘導系の探索、さらにプラコード疾患患者におけるゲノム編集技術による遺伝子修復での病気の根本的な治療など、多方面での応用が期待される。

参考文献

- Ahrens K., Schlosser G., 2005. Tissues and signals involved in the induction of placodal Six1 expression in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 288, 40-59.
- Baker CV, Bronner-Fraser M., 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction. *Dev Biol* 232, 1–61.
- Barragán I., Borrego S., Abd El-Aziz MM., El-Ashry MF., Abu-Safieh L., Bhattacharya SS., Antiñolo G., 2008. Genetic analysis of FAM46A in Spanish families with autosomal recessive retinitis pigmentosa: characterisation of novel VNTRs. *Ann Hum Genet.* 72, 26-34.
- Brugmann, S.A., Pandur, P.D., Kenyon, K.L., Pignoni F., Moody, S.A., 2004. Six1 promotes a placodal fate within the lateral neurogenic ectoderm by functioning as both a transcriptional activator and repressor. *Development* 131, 5871-5881.
- Chambers SM, Fasano CA, Papapetrou EP, Tomishima M, Sadelain M, Studer L., 2009. Highly efficient neural conversion of human ES and iPS cells by dual inhibition of SMAD signaling. *Nat Biotechnol.* 27, 275-80.
- Cheng X, Alborzinia H, Merz KH, Steinbeisser H, Mrowka R, Scholl C, Kitanovic I, Eisenbrand G, Wölfl S., 2012. Indirubin derivatives modulate TGF β /BMP signaling at different levels and trigger ubiquitin-mediated depletion of nonactivated R-Smads. *Chem Biol.* 19, 1423-36.
- Christiansen JH, Coles EG, Wilkinson DG., 2000. Molecular control of neural crest formation, migration and differentiation. *Curr Opin Cell Biol.* 12, 719-24.
- Colland F, Jacq X, Trouplin V, Mouglin C, Groizeleau C, Hamburger A, Meil A, Wojcik J, Legrain P, Gauthier JM., 2004. Functional proteomics mapping of a human signaling pathway. *Genome Res.* 14, 1324-32.
- Crick F., 1970. Diffusion in embryogenesis. *Nature* 225, 420-2.
- Diener S., Bayer S., Sabrautzki S., Wieland T., Mentrup B., Przemeck GK., Rathkolb B., Graf E., Hans W., Fuchs H., Horsch M., Schwarzmayr T., Wolf E., Klopocki E., Jakob F., Strom TM., Hrabě de Angelis M., Lorenz-Depiereux B., 2016. Exome sequencing identifies a nonsense mutation in *Fam46a* associated with bone abnormalities in a new mouse model for skeletal dysplasia. *Mamm Genome.* 27, 111-121.

- Dincer Z., Piao J., Niu L., Ganat Y., Kriks S., Zimmer B., Shi SH., Tabar V., Studer L., 2013. Specification of functional cranial placode derivatives from human pluripotent stem cells. *Cell Rep.* 5, 1387-402.
- Dosch R, Gawantka V, Delius H, Blumenstock C, Niehrs C., 1997. Bmp-4 acts as a morphogen in dorsoventral mesoderm patterning in *Xenopus*. *Development* 124, 2325-34.
- Fletcher RB., Baker JC., Harland RM., 2006. FGF8 spliceforms mediate early mesoderm and posterior neural tissue formation in *Xenopus*. *Development.* 133, 1703-14.
- Fuentealba LC., Eivers E., Ikeda A., Hurtado C., Kuroda H., Pera EM., De Robertis EM., 2007. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal. *Cell* 131, 980-993.
- García-Castro MI, Marcelle C, Bronner-Fraser M., 2002. Ectodermal Wnt function as a neural crest inducer. *Science* 297, 848–851.
- Ghanbari H, Seo HC, Fjose A, Brändli AW., 2001. Molecular cloning and embryonic expression of *Xenopus* Six homeobox genes. *Mech Dev* 101, 271–277.
- Glavic A, Maris Honoré S, Gloria Feijóo C, Bastidas F, Allende ML, Mayor R., 2004. Role of BMP signaling and the homeoprotein Iroquois in the specification of the cranial placodal field. *Dev Biol* 272, 89–103.
- Grocott, T., Tambalo M., and Streit A., 2012. The peripheral sensory nervous system in the vertebrate head: A gene regulatory perspective. *Dev Biol.* 370, 3-23.
- Groves AK., LaBonne C., 2014. Setting appropriate boundaries: fate, patterning and competence at the neural plate border. *Dev Biol.* 389, 2-12.
- Hong, C-S., Saint-Jeannet, J-P., 2007. The activity of Pax3 and Zic1 regulates three distinct cell fates at the neural plate border. *Mol. Biol. Cell* 18, 2192-2202.
- Inomata H., Shibata T., Haraguchi T., Sasai Y., 2013. Scaling of dorsal-ventral patterning by embryo size-dependent degradation of Spemann's organizer signals. *Cell* 153, 1296-311.
- Kengaku M, Okamoto H., 1995. bFGF as a possible morphogen for the anteroposterior axis of the central nervous system in *Xenopus*. *Development* 121, 3121-30.

Kiecker C, Niehrs C., 2001. A morphogen gradient of Wnt/beta-catenin signalling regulates anteroposterior neural patterning in *Xenopus*. *Development* 128, 4189-201.

Kuchta K, Knizewski L, Wyrwicz LS, Rychlewski L, Ginalski K., 2009. Comprehensive classification of nucleotidyltransferase fold proteins: identification of novel families and their representatives in human. *Nucleic Acids Res.* 37, 7701-14.

Lagali PS., Kakuk LE., Griesinger IB., Wong PW., Ayyagari R., 2002. Identification and characterization of C6orf37, a novel candidate human retinal disease gene on chromosome 6q14. *Biochem Biophys Res Commun.* 293, 356-65.

Lea R., Papalopulu N., Amaya E., Dorey K., 2009. Temporal and spatial expression of FGF ligands and receptors during *Xenopus* development. *Dev Dyn.* 238, 1467-79.

Leung AW., Kent Mores D., Li JY., 2013. Differential BMP signaling controls formation and differentiation of multipotent preplacodal ectoderm progenitors from human embryonic stem cells. *Dev Biol.* 379, 208-20.

Litsiou A, Hanson S, Streit A., 2005. A balance of FGF, BMP and WNT signalling positions the future placode territory in the head. *Development* 132, 4051-4062.
Marchak A, Grant PA, Neilson KM, Datta Majumdar H, Yaklichkin S, Johnson D, Moody SA., 2017. *Wbp2nl* has a developmental role in establishing neural and non-neural ectodermal fates. *Dev Biol.* 429, 213-224.

Mancilla A, Mayor R., 1996. Neural crest formation in *Xenopus laevis*: mechanisms of *Xslug* induction. *Dev Biol.* 177, 580-9.

Matsukawa S, Miwata K, Asashima M, Michiue T., 2015. The requirement of histone modification by PRDM12 and Kdm4a for the development of pre-placodal ectoderm and neural crest in *Xenopus*. *Dev. Biol.* 399, 164-76.

Matsuo-Takasaki M, Matsumura M, Sasai Y., 2005. An essential role of *Xenopus Foxi1a* for ventral specification of the cephalic ectoderm during gastrulation. *Development.* 132, 3885-94

Mayor, R., Theveneau, E., 2013. The neural crest. *Development* 140, 2247-2251.

Milet C, Monsoro-Burq AH., 2012. Neural crest induction at the neural plate border in vertebrates. *Dev Biol* 366, 22–33.

Mica Y, Lee G, Chambers SM, Tomishima MJ, Studer L., 2013. Modeling neural crest induction, melanocyte specification, and disease-related pigmentation defects in hESCs and patient-specific iPSCs. *Cell Rep.* 25, 1140-52.

Mroczek S., Chlebowska J., Kuliński TM., Gewartowska O., Gruchota J., Cysewski D., Liudkovska V., Borsuk E., Nowis D., Dziembowski A., 2017. The non-canonical poly(A) polymerase FAM46C acts as an onco-suppressor in multiple myeloma. *Nat Commun.* 8, 619.

Neave, B., Holder, N., Patient R., 1997. A graded response to BMP-4 spatially coordinates patterning of the mesoderm and ectoderm in the zebrafish. *Mech. Dev.* 62, 183-195.

Nieuwkoop PD. and Faber J., 1994. Normal table of *Xenopus laevis* (daudin), New York: Garland Sciences.

Nordin K. and LaBonne C., 2014. Sox5 Is a DNA-binding cofactor for BMP R-Smads that directs target specificity during patterning of the early ectoderm. *Dev Cell.* 31, 374-82.

Pandur PD. and Moody SA., 2000. *Xenopus* Six1 gene is expressed in neurogenic cranial placodes and maintained in the differentiating lateral lines. *Mech Dev.* 96, 253–257.

Pera EM, Ikeda A., Eivers E., De Robertis EM., 2003. Integration of IGF, FGF, and anti-BMP signals via Smad1 phosphorylation in neural induction. *Genes Dev.* 17, 3023-3028.

Richter JD., 1999. Cytoplasmic polyadenylation in development and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63, 446-56.

Saint-Jeannet, J.-P., Moody, S.A., 2014. Establishing the pre-placodal region and breaking it into placodes with distinct identities. *Dev. Biol.* 389, 13-27.

Sasai Y, Lu B, Steinbeisser H, Geissert D, Gont LK, De Robertis EM., 1994. *Xenopus* chordin: A novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79, 779–790.

Sato T, Sasai N, Sasai Y., 2005. Neural crest determination by co-activation of Pax3 and Zic1 genes in *Xenopus* ectoderm. *Development* 132, 2355-63

Schlosser G, Northcutt RG., 2000. Development of neurogenic placodes in *Xenopus laevis*. *J Comp Neurol.* 418, 121-46.

Schlosser G, Ahrens K., 2004. Molecular anatomy of placode development in *Xenopus laevis*. *Dev Biol.* 271, 439-466.

Schlosser G., 2005. Evolutionary origins of vertebrate placodes: Insights from developmental studies and from comparisons with other deuterostomes. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 304, 347–399.

Schlosser, G., 2006. Induction and specification of cranial placodes. *Dev Biol.* 294, 303-351.

Schlosser G., 2014. Early embryonic specification of vertebrate cranial placodes. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 3, 349-63.

Smith WC, Harland RM., 1992. Expression cloning of *noggin*, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70, 829-40.

Takebayashi K, Takahashi S, Yokota C, Tsuda H, Nakanishi S, Asashima M, Kageyama R., 1997. Conversion of ectoderm into a neural fate by *ATH-3*, a vertebrate basic helix-loop-helix gene homologous to *Drosophila* proneural gene *atonal*. *EMBO J.* 16, 384-395.

Tchieu J., Zimmer B., Fattahi F., Amin S., Zeltner N., Chen S., Studer L., 2017. A Modular Platform for Differentiation of Human PSCs into All Major Ectodermal Lineages. *Cell Stem Cell* 21, 399-410.

Watanabe T, Kanai Y, Matsukawa S, Michiue T., 2015. Specific induction of cranial placode cells from *Xenopus* ectoderm by modulating the levels of BMP, Wnt, and FGF signaling. *Genesis* 53, 652-9.

Wilson PA, Hemmati-Brivanlou A., 1995. Induction of epidermis and inhibition of neural fate by *Bmp-4*. *Nature* 376, 331-333.

Wolpert L., 1969. Positional information and the spatial pattern of cellular differentiation. *J Theor Biol.* 25, 1-47.

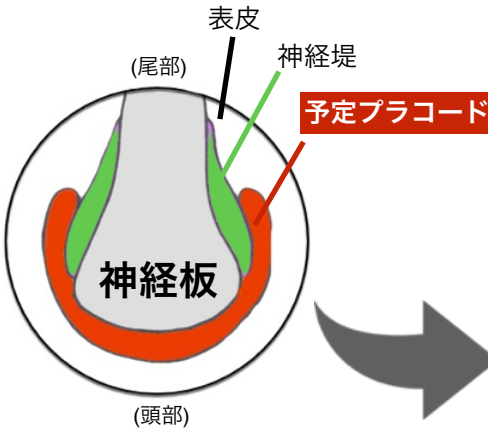
Zhou X, Hollemann T, Pieler T, Gruss P., 2000. Cloning and expression of *xSix3*, the *Xenopus* homologue of murine *Six3*. *Mech Dev* 91, 327-333.

Zuber ME, Perron M, Philpott A, Bang A, Harris WA. 1999. Giant eyes in *Xenopus laevis* by overexpression of *XOptx2*. *Cell* 98, 341-352.

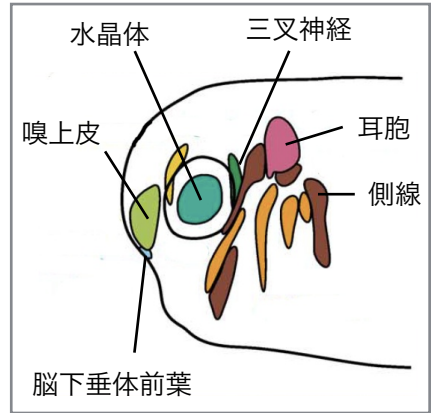
6. 图表

予定プラコード

神経胚



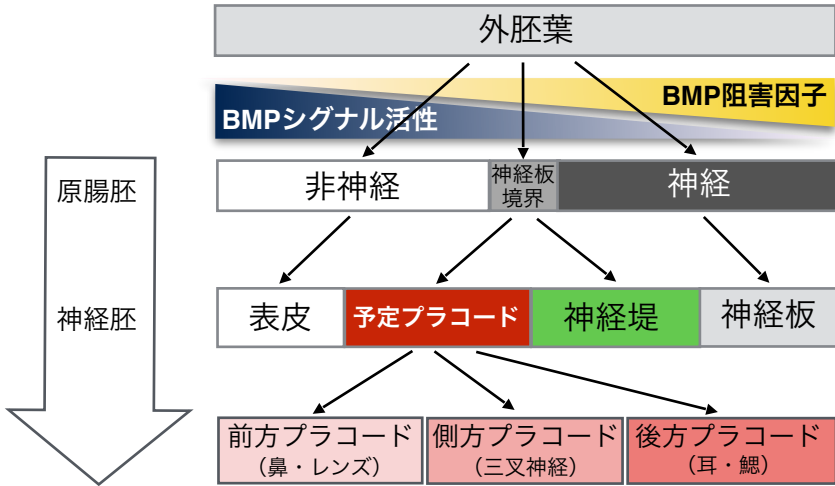
尾芽胚



(G. Schlosser, 2006より改変)

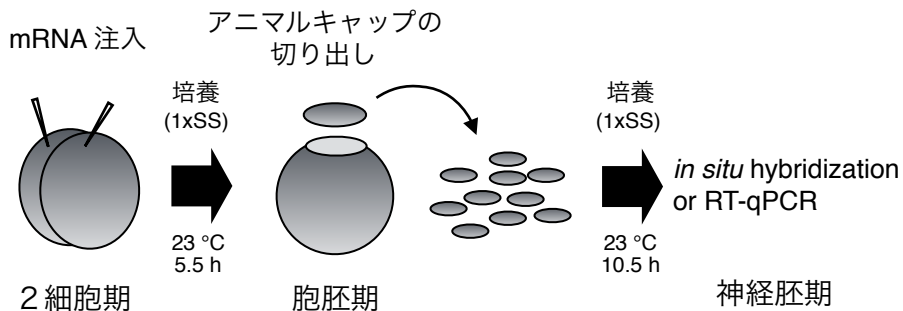
[図1] 予定プラコードは頭部の感覚神経関連器官に終分化する

神経胚期の胚の前方においては、神経板の周辺で予定プラコードと神経堤が形成される。その後、予定プラコード領域の細胞は増殖して遊走性を獲得し、尾芽胚期においては脳下垂体前葉、嗅上皮、水晶体、三叉神経、耳胞そして側線等の感覚神経関連器官に分化する。



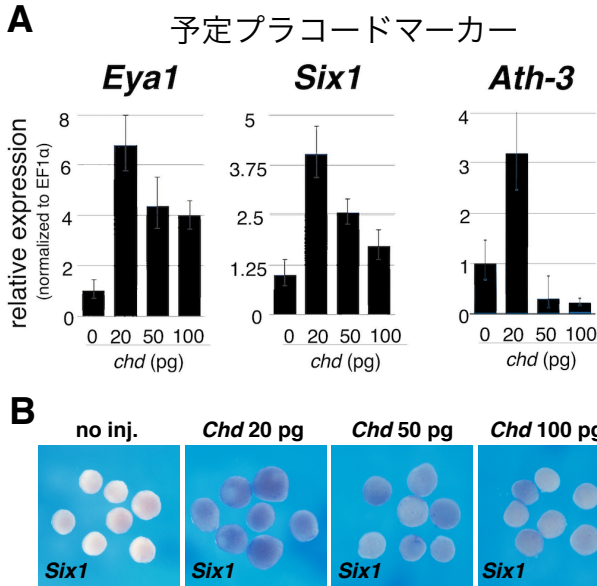
[図2] 外胚葉のプラコード形成に関わる分子機構

外胚葉領域における分化過程の概略図。原腸胚期に非神経外胚葉と神経外胚葉に分かれ、その間には神経板境界が形成される。神経板境界はその後神経胚期において、予定プラコードと神経堤に分かれる。同時期においては非神経外胚葉は表皮に、神経外胚葉は神経板へと分化する。予定プラコードはその後前方プラコード、側方プラコード、後方プラコードに部域化する。



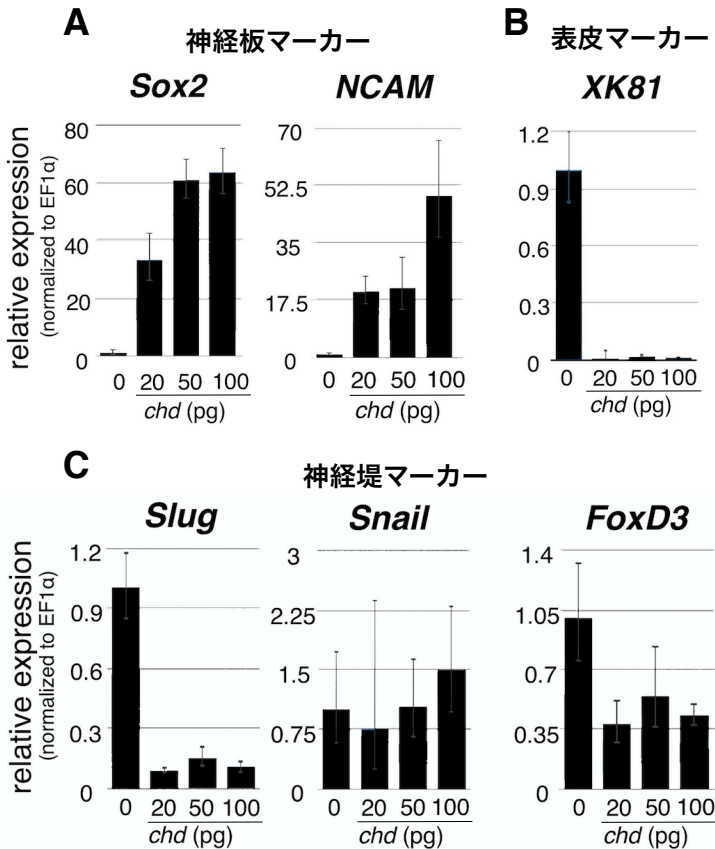
【図3】 アニマルキャップアッセイの概要

2細胞期の動物極側の両割球に mRNA を微量注入し、胞胚期にアニマルキャップ（外胚葉片）を切り出した。1× Steinburg's Solution (1xSS) において培養した後、予定ブラコードおよび神経堤の形成段階である神経胚期において回収し、*in situ* hybridizationあるいは RT-qPCR を行なった。



[図4] アニマルキャップを用いた予定プラコード様細胞誘導条件の検討

- (A) 2細胞期に様々な濃度の *Chd* mRNA を微量注入したアニマルキャップの神経胚期における予定プラコードマーカー遺伝子 *Eya1*, *Six1*, *Ath-3* のそれぞれの相対発現量を、qPCR 法により定量解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)
- (B) *Chd* mRNA 注入アニマルキャップにおける予定プラコードマーカー遺伝子 *Six1* mRNA の発現パターンを *in situ* hybridization 法により解析した。(n=7, エラーバーは標準偏差を示す。)

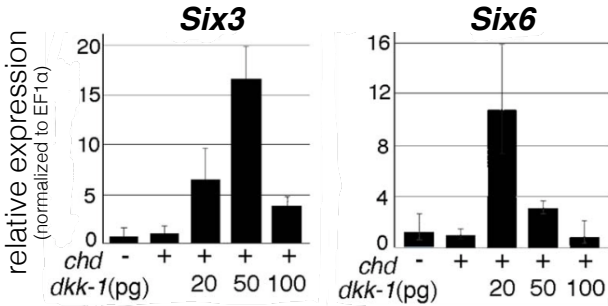


[図5] Chd mRNA 注入による他の外胚葉マーカー遺伝子発現変化

2細胞期に様々な濃度のChd mRNAを微量注入したアニマルキャップの神経胚における、(A) 神経板マーカー遺伝子 *Sox2*, *NCAM*、(B) 表皮マーカー遺伝子 *XK81*、(C) 神経堤マーカー遺伝子 *Slug*, *Snail*, *FoxD3* のそれぞれの相対発現量を、qPCR法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)

A Wntシグナル阻害条件

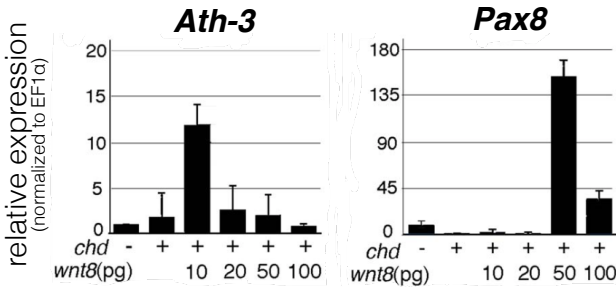
前方プラコード（鼻・レンズ）マーカー



B Wntシグナル促進条件

側方プラコード
（三叉神経）マーカー

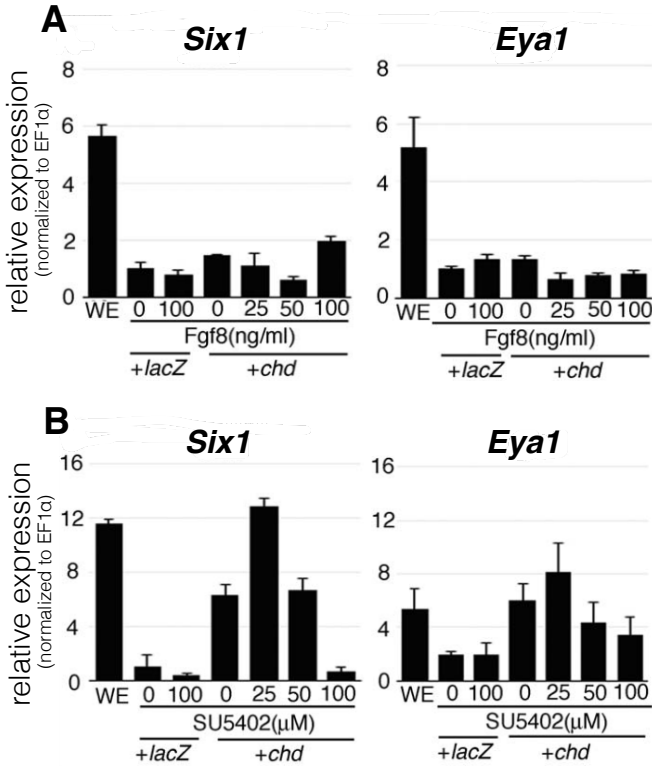
後方プラコード
（耳・鰓）マーカー



[図6] 前方・側方・後方の各プラコード様細胞の誘導条件の検討

(A) *Chd* mRNAおよび*dkk-1* mRNAを共注入したアニマルキャップの神経胚期における、前方プラコードマーカー遺伝子 *Six3* および *Six6* の相対発現量を、qPCR法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)

(B) *Chd* mRNAおよび*Wnt8* mRNAを共注入したアニマルキャップの神経胚期における、側方プラコードマーカー遺伝子 *Ath-3* および後方プラコードマーカー遺伝子 *Pax8* の相対発現量を、qPCR法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)



[図7] BMP, FGFシグナル調節による予定ブラコード遺伝子の発現量変化

BMPシグナルに加えてFGFシグナル調節を行なったアニマルキャップにおいて、神経胚期における *Six1*, *Eya1*の各予定ブラコードマーカー遺伝子の発現量変化をqPCR法により解析した。

(A) 2細胞期に *Chd* mRNAの微量注入を行い、原腸胚期から *Fgf8* proteinを添加した。神経胚期まで培養を行なったアニマルキャップにおいて、*Six1*, *Eya1*の発現量の変化を定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)

(B) 2細胞期に *Chd* mRNAの微量注入を行い、原腸胚期からFGFシグナル受容体阻害剤 *SU5402*を添加した。神経胚期まで培養を行なったアニマルキャップにおいて、*Six1*, *Eya1*の発現量の変化をqPCR法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)

ツメガエルの全遺伝子：約 45,000 遺伝子

外胚葉 4 条件でマイクロアレイ解析

sample 1	表皮	none
sample 2	予定プラコード	<i>Chordin</i> 20 pg
sample 3	神経堤	<i>Chordin</i> 100 pg+ <i>Wnt8</i> 50 pg
sample 4	神経板	<i>Chordin</i> 200 pg

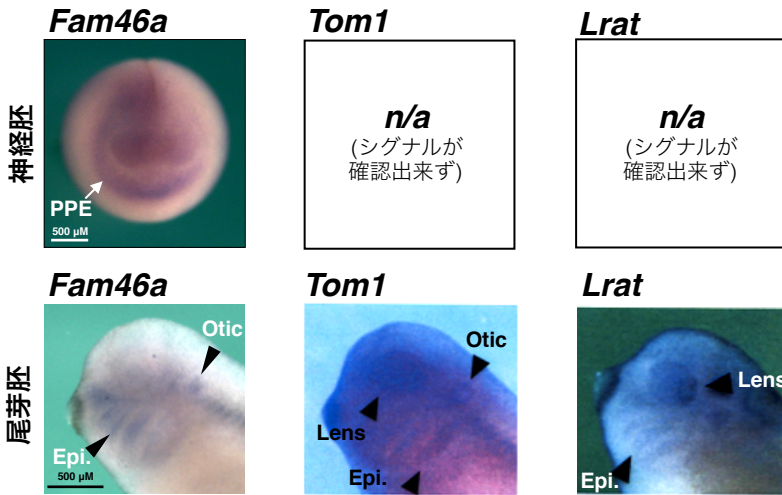
サンプル 2 で発現量の多い遺伝子 128 遺伝子

マーカー遺伝子 (*Six1*) と発現挙動の近い遺伝子 47 遺伝子

機能未知かつプラコードに発現が見られた遺伝子 3 遺伝子

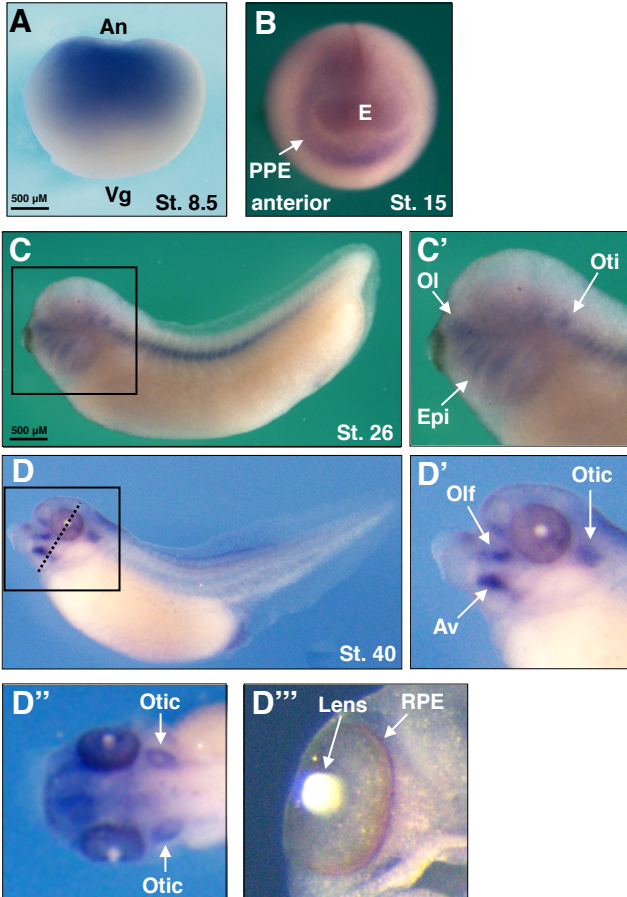
予定プラコードに発現する新規遺伝子 *Fam46a* を同定

[図8] 新規予定プラコード遺伝子の探索の概略



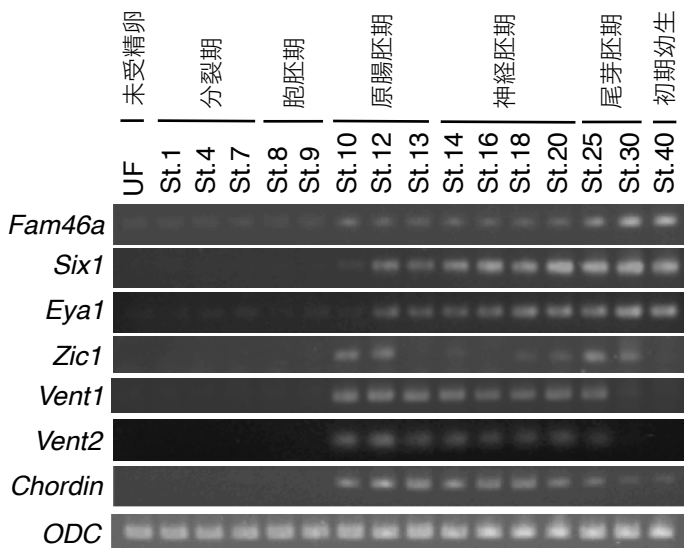
[図9] プラコード関連候補遺伝子の空間的発現パターン

最終的に選出された3つの遺伝子について *in situ* hybridizationスクリーニングを行なった。*Fam46a* は神経胚期における予定プラコード(PPE)において、そして尾芽胚期における鰓(Epi.)、耳(Otic)のプラコードにおいて発現が見られた。*Tom1* は尾芽胚期において鰓(Epi.)、水晶体(Lens)、耳(Otic)のプラコードにおいて発現が見られた。*Lrat* は鰓(Epi.)、水晶体(Lens)のプラコードにおいて発現が見られた。(n=20)



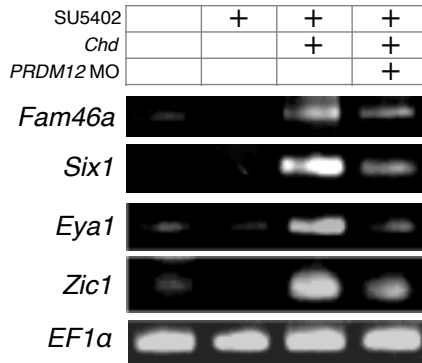
[図10] *Fam46a* のツメガエル胚における空間的発現パターンの解析

Fam46a mRNA の各発生ステージにおけるmRNAの発現領域を WISH 法により解析した。(A) Stage 8.5 (胞胚期) (lateral view)、(B) Stage 15 (初期神経胚期) (animal view)、(C) Stage 26 (尾芽胚期) (lateral view)、(D) Stage 40 (初期幼生期) (lateral view)、(D') (dorsal view)、(D'') (transverse section)。(An, Animal pole; Vg, Vegetal pole; PPE, Pre-placodal ectoderm; E, Eye-field; Ol, Olfactory placode, Epi, Epibranchial placode; Oti, Otic placode; Av, Anteroventral lateral line; Olf, Olfactory nerve; Otic, Otic vesicle; RPE, Retinal pigment epithelium)



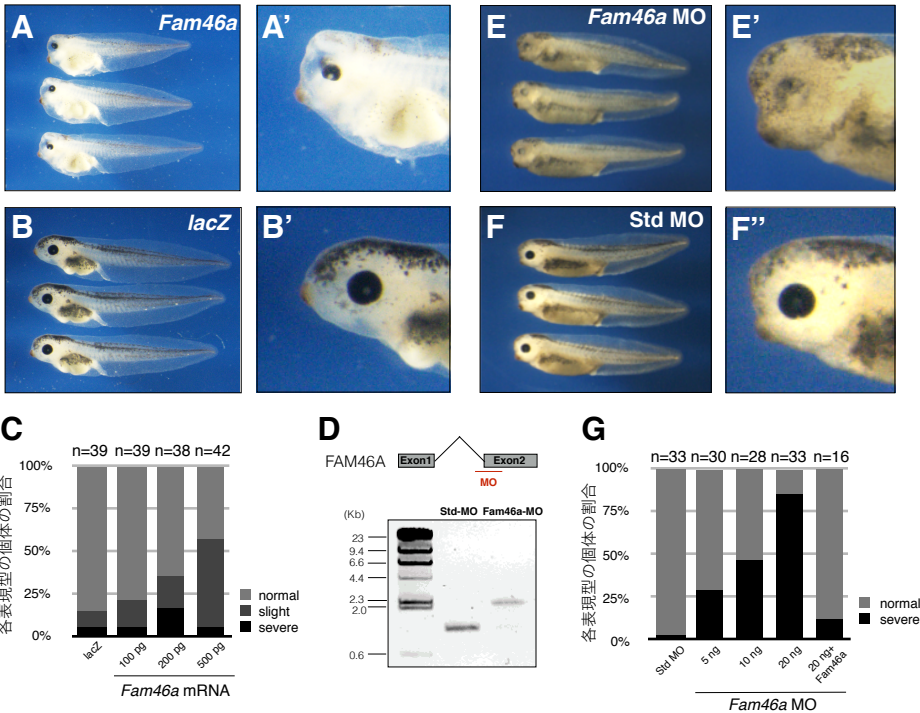
[図11] *Fam46a* の時間的発現パターンの解析

Fam46a と *Six1*, *Eya1* (予定ブラコードマーカー遺伝子), *Zic1* (神経板境界マーカー遺伝子), *Vent1*, *Vent2* (BMPシグナルターゲット遺伝子)の各遺伝子の発現時期をRT-PCR法により解析した。内在性コントロールとして *ODC* を用いた。



[図12] *PRDM12* ノックダウンによる発現変化の解析

予定プラコード様細胞において、予定プラコード分化に関わるエピゲノム因子 *PRDM12* をノックダウンした際の各遺伝子の発現変化を調べた。*Fam46a* と *Six1*, *Eya1* (予定プラコードマーカー遺伝子), *Zic1* (神経板境界マーカー遺伝子) の発現変化を RT-PCR 法により解析した。内在性コントロールとして *EF1a* を用いた。



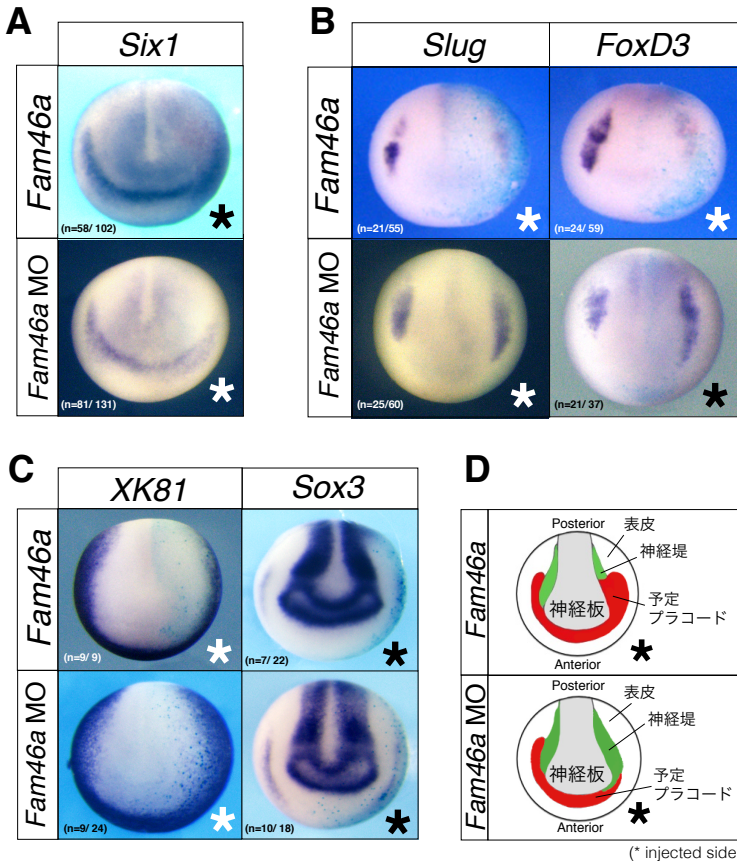
[図13] *Fam46a* の機能獲得胚および機能欠損胚の表現型観察

(A)(B) *Fam46a* mRNAを2細胞期に注入し、3日間培養したのちに表現型観察を行なった。胚を側方から見た図を示している。頭部欠損と目の縮小および体色の異常の表現型が見られた。

(C) 目の縮小、頭部の拡大および体色異常を示す表現型をsevere、体色異常のみを示す表現型をslightに分類し、mRNAの各注入量における表現型の割合を棒グラフで示した。

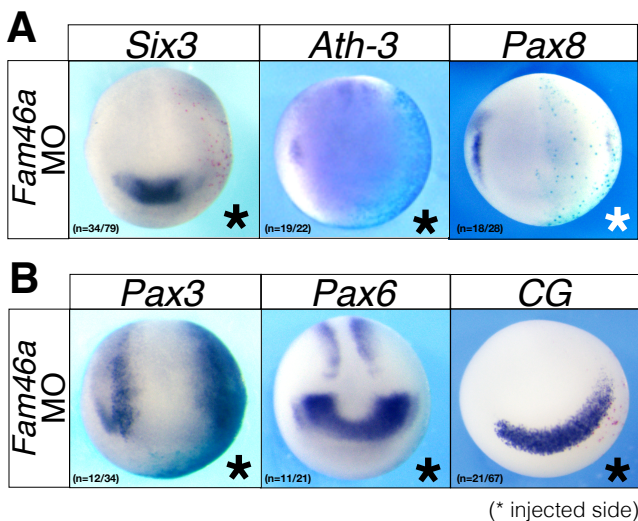
(D) *Fam46a* MOの設計図。スプライシング阻害のMOを設計し、実際にエキソン-イントロン間のスプライシングが阻害されていることを確認した。

(E)(F) *Fam46a* MOを2細胞期に注入し、3日間培養したのちに表現型観察を行なった。胚を側方から見た図を示している。網膜形成異常と色素沈着異常の表現型が得られた。(G) MOの各注入条件における表現型を示す個体の割合を棒グラフで示した。*Fam46a* mRNAは4細胞期に注入した。



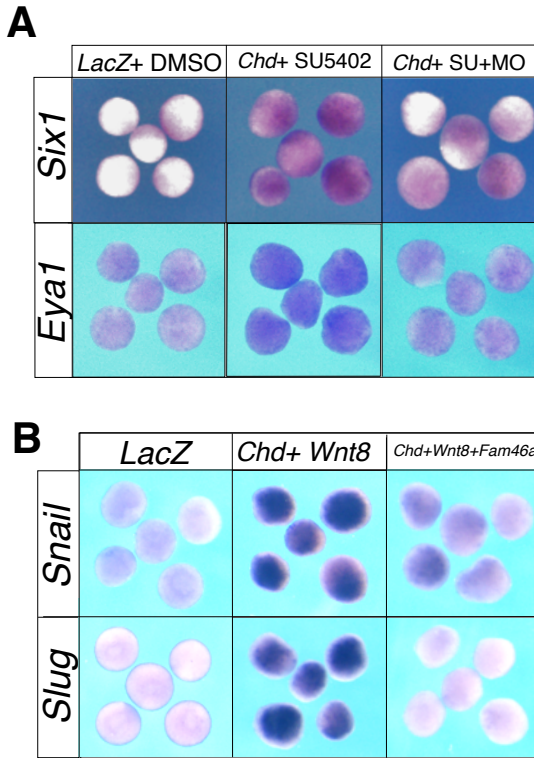
[図14] *Fam46a* 発現による各外胚葉マーカー遺伝子の発現変化

胚の片側において*Fam46a* を過剰発現 (*Fam46a* mRNA注入) あるいは機能阻害 (*Fam46a* MO注入) させた際の各外胚葉マーカー遺伝子の発現領域の変化を *in situ* hybridization法により解析した。それぞれ(A) 予定ブラコードマーカー遺伝子 *Six1*, (B) 神経堤マーカー遺伝子 *Slug*, *FoxD3*, (C) 表皮マーカー遺伝子 *XK81*, 神経板マーカー遺伝子 *Sox3* について調べた。(D) *in situ* hybridizationの結果から作成した、*Fam46a* 発現による外胚葉のパターニングの変化の模式図。



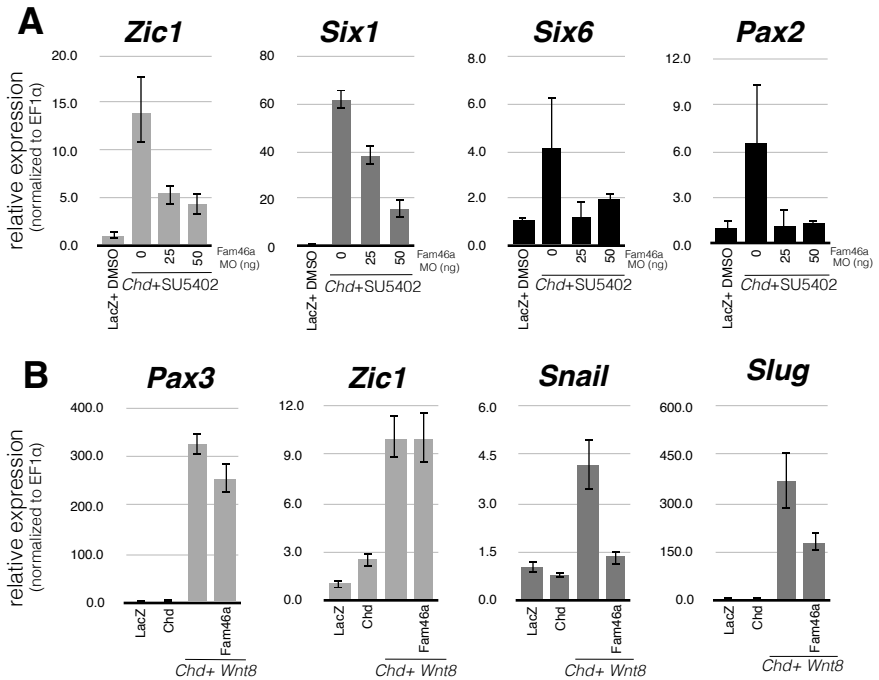
[図15] *Fam46a* 機能阻害による各プラコードマーカ遺伝子および他の外胚葉マーカ遺伝子の発現変化

胚の片側において*Fam46a* を機能阻害させた際の (A) 前方プラコードマーカ遺伝子 *Six3*, 側方プラコードマーカ遺伝子 *Ath-3*, 後方プラコードマーカ遺伝子 *Pax8*, (B) 神経板境界マーカ遺伝子 *Pax3*, 神経幹細胞マーカ遺伝子 *Pax6*, セメント腺マーカ遺伝子 *CG* の各マーカ遺伝子の発現パターンの変化についてin situ hybridization法で解析した。



[図16] 予定プラコード様細胞, 神経堤様細胞におけるFam46a 発現の影響

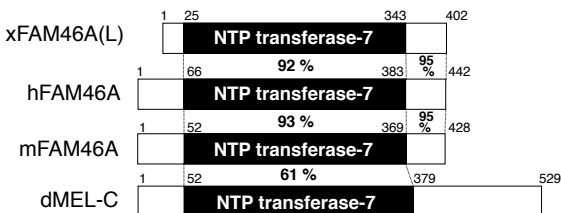
(A) *Chd* 20 pg 注入, および SU5402 処理をして誘導した予定プラコード様細胞において、*Fam46a* をノックダウンさせた際の各予定プラコードマーカー遺伝子の発現パターンの変化を *in situ* hybridization 法により解析した。(B) *Chd* 100 pg+ *Wnt8* 50 pg を注入して誘導した神経堤様細胞において、*Fam46a* を過剰発現させた際の各神経堤マーカー遺伝子の発現パターンの変化を *in situ* hybridization 法により解析した。



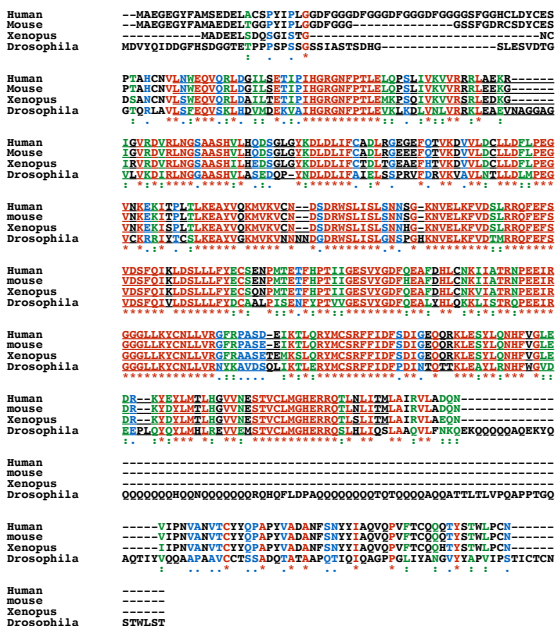
[図17] *Fam46a* 発現による各マーカー遺伝子の発現量変化

(A) 2細胞期において*Chd* mRNA 20 pg および *Fam46a* MO を注入し、原腸胚期において SU5402 を添加して培養したアニマルキャップの神経胚期における、神経板境界遺伝子 *Zic1*、予定ブラコード遺伝子 *Six1*、前方ブラコード遺伝子 *Six6*、後方ブラコード遺伝子 *Pax2* の各遺伝子の発現量変化を qPCR法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)(B) 2細胞期において*Chd* mRNA 100 pg, *Wnt8* mRNA 50 pg および *Fam46a* mRNA を注入したアニマルキャップの神経胚期における、神経板境界遺伝子 *Pax3*, *Zic1*、神経堤遺伝子 *Snail*, *Slug* の各遺伝子の発現量変化をqPCR 法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)

A

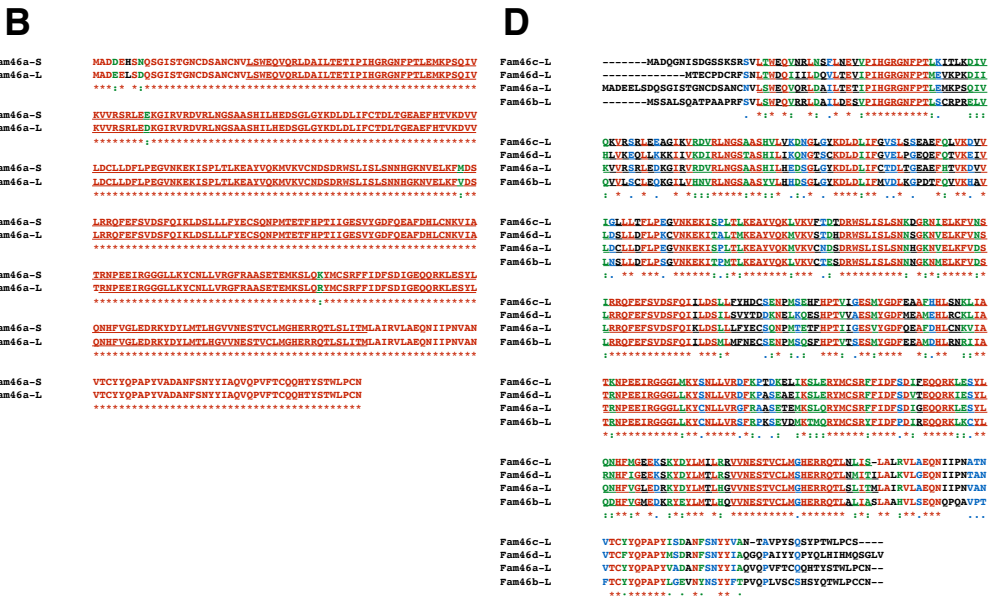
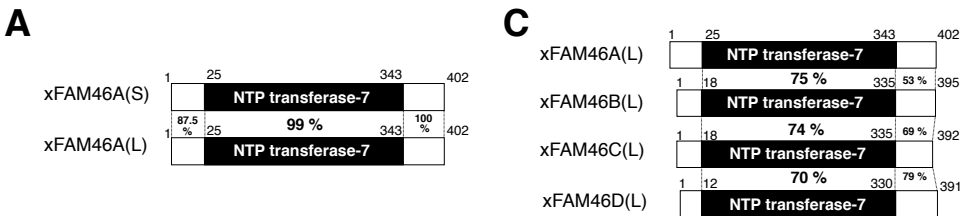


B



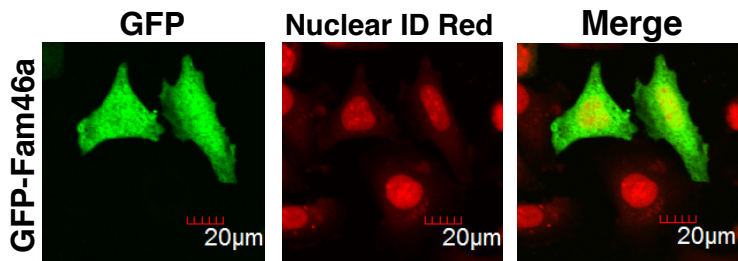
【図18】 FAM46A のアミノ酸配列のアライメント

(A) xFAM46A (Frog)とオーソログである hFAM46A (Human), mFAM46A (Mouse), dMEL-C (Fruit fly)のNTP-transferase 7ドメイン内およびC末端の配列を相同性比較した。(B) ClustalWによるアライメント結果。下線部は NTP transferase-7ドメインを示している。同一の amino acid および類似の amino acid は、それぞれアスタリスクと二重のドットで示している。



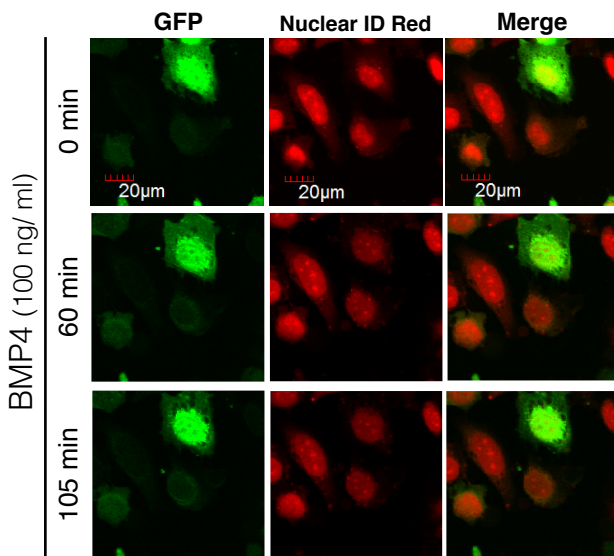
[図19] FAM46A-S, LおよびFAM46A, B, C, Dのアミノ酸配列のアライメント

(A) FAM46AのホメオログであるFAM46A-S,Lのアミノ酸配列を相同性比較した。(B) ClustalWによるアライメント結果。(C) FAM46のパラログであるFAM46A, B, C, Dのアミノ酸配列を相同性比較した。(D) ClustalWによるアライメント結果。下線部は NTP transferase-7ドメインを示している。同一のアミノ酸および類似のアミノ酸は、それぞれアスタリスクと二重のドットで示している。



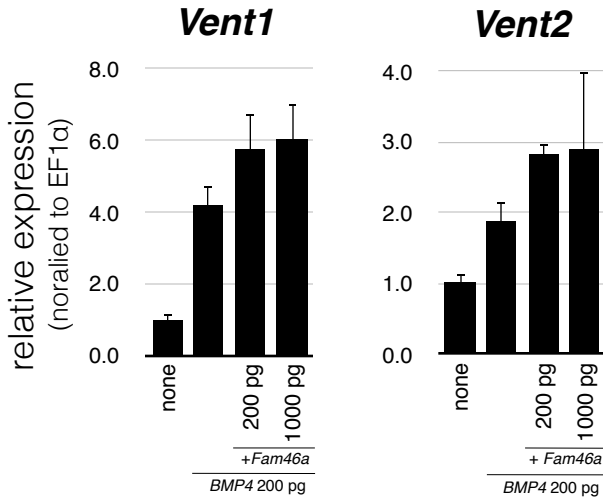
[図20] Fam46a は細胞内における核と細胞質に局在する

pCS2-GFP-Fam46a発現プラスミドを HeLa 細胞にトランスフェクションし、24時間培養した後に、細胞内局在観察を行なった。Nuclear ID Redにより核染色を行なった。



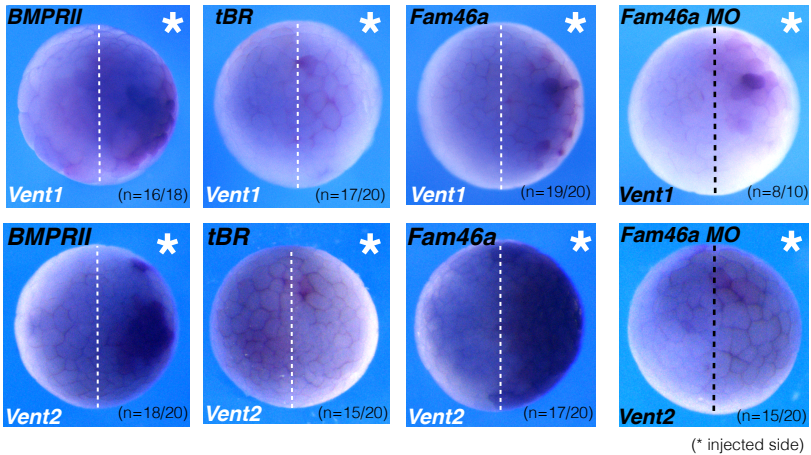
[図21] BMP4 添加によるFam46a の細胞内局在変化

pCS2-GFP-Fam46a コンストラクトをHeLa細胞にトランスフェクションし、24時間後にBMP4 proteinを100 ng/ mlの濃度で添加した。BMP4 添加から60分、105分後のFam46a の局在を示した。



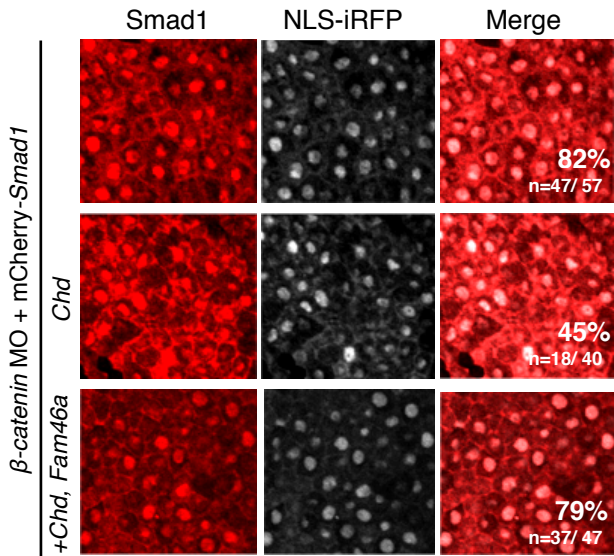
[図22] *Fam46a* 発現によるBMPシグナルターゲット遺伝子 *Vent1*, *Vent2* の発現量変化

2細胞期に*BMP4* mRNA および *Fam46a* mRNA を注入したアニマルキャップの神経胚期における BMPシグナルターゲット遺伝子 *Vent1*, *Vent2* の発現量を qPCR 法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)



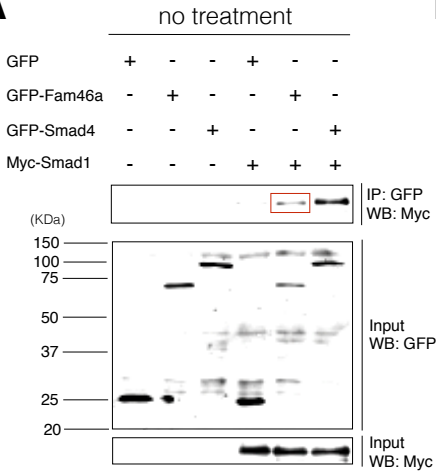
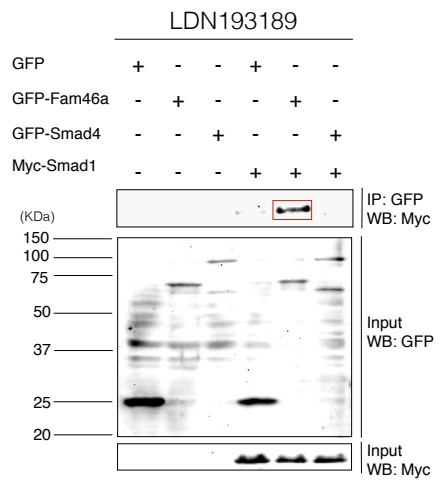
[図23] BMP シグナル関連因子および *Fam46a* 発現による BMP ターゲット遺伝子 *Vent1*, *Vent2* の発現パターンの変化

2細胞期の片側割球に *BMPRII*, *tBR*, *Fam46a* mRNA, *Fam46a* MO を注入した胚の胞胚期の動物極側の細胞群における BMP シグナルターゲット遺伝子 *Vent1*, *Vent2* の各空間的発現パターンを *in situ* hybridization 法により解析した。アスタリスクは mRNA, MO 注入側を示す。



[図24] *Fam46a* 発現によるSmad1の局在変化観察

2細胞期に*mCherry-Smad1*および β -catenin MOを注入して原腸陥入を阻害した胚の原腸胚期における動物極側の細胞群において、*Chd* mRNA, *Fam46a* mRNAを注入した際のSmad1の細胞内局在変化を蛍光観察した。NLS-iRFPを胚に共注入して核を標識した。全ての細胞のうち、Smad1が核に顕著に局在する細胞の割合を%で示している。(n=10)

A**B**

【図25】 Fam46a とSmad1の物理的結合の検証

GFP-*Fam46a* あるいはGFP-*Fam46a*と Myc-*Smad1* mRNAを共注入した胚を原腸胚期まで培養し、GFP プルダウンアッセイを行なった。GFP はネガティブコントロール、GFP-*Smad4* はポジティブコントロールとして用いた。(A) は無処理、(B) はLDN19-3189 添加培地において培養した胚を用いた。1 段目のウエスタンブロットの結果は Smad1 の発現のレベルを示している。(n=10, 3 biological replicates)

A**Myc-Smad1-WT****Myc-Smad1-MH1****Myc-Smad1-MH2**

MH1: DNA binding domain

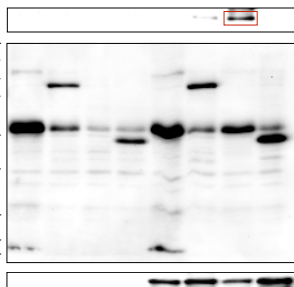
MH2: SSXS motif (phosphorylated by BMPRI)

B

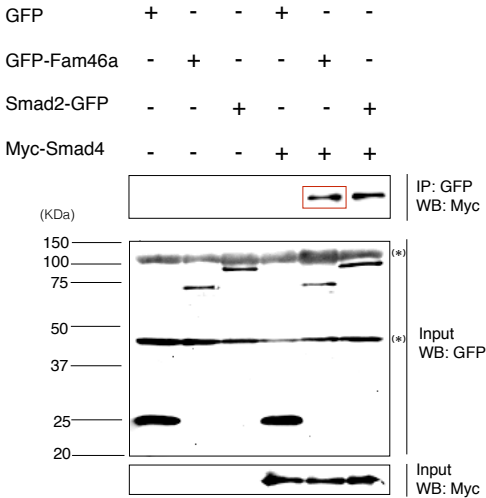
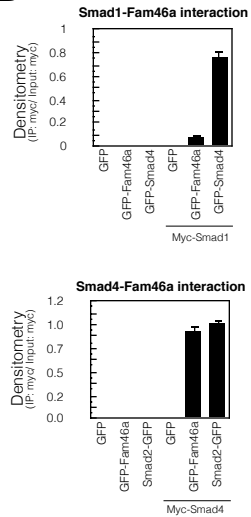
Myc	+	-	-	-	+	-	-	-
Myc-Smad1	-	+	-	-	-	+	-	-
Myc-Smad1-MH1	-	-	+	-	-	-	+	-
Myc-Smad1-MH2	-	-	-	+	-	-	-	+
GFP-Fam46a	-	-	-	-	+	+	+	+

(kDa)

150
100
75
50
37
25
20
15
10

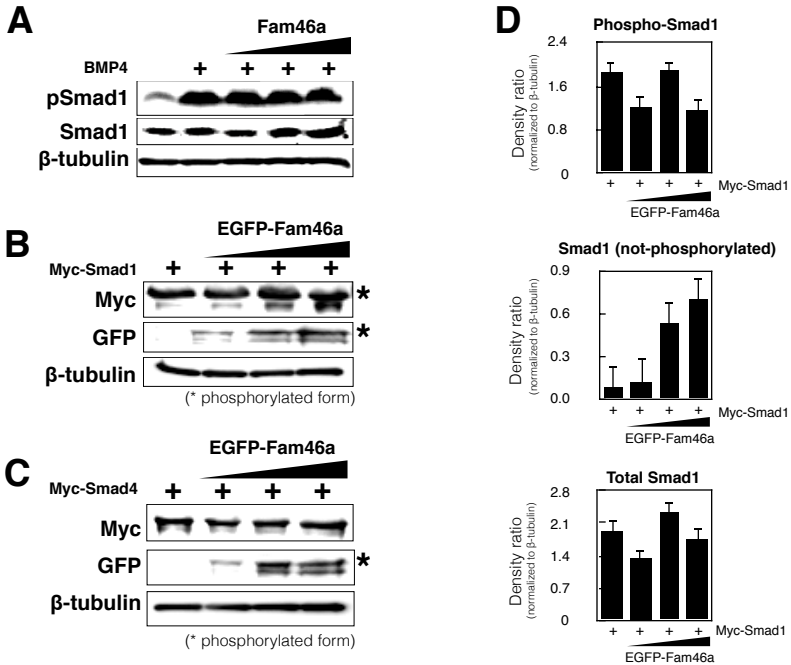
IP: Myc
WB: GFPInput
WB: MycInput
WB: GFP**[図26] Fam46aと Smad1の各ドメインとの物理的結合の検証**

Myc-Smad1, *Myc-Smad1-MH1*, *Myc-Smad1-MH2* と *GFP-Fam46a* を共注入した胚を原腸胚期まで培養して、Myc プルダウンアッセイを行なった。1 段目のウエスタンブロットの結果はFam46a の発現のレベルを示している。(n=10, 3 biological replicates)

A**B**

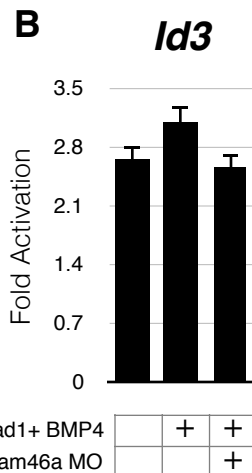
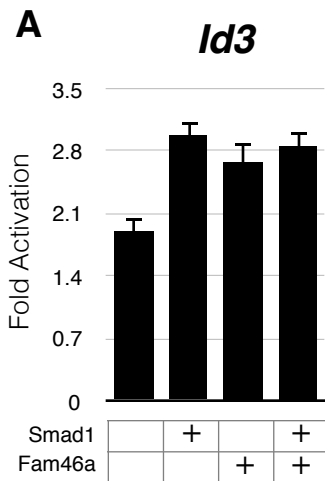
[図27] Fam46a は Smad4 と物理的に結合する

(A) *GFP-Fam46a* あるいは *GFP-Fam46a* と *Myc-Smad4* mRNAを共注入した胚を原腸胚期まで培養し、GFPプルダウンアッセイを行なった。*GFP* はネガティブコントロール、*Smad2-GFP* はポジティブコントロールとして用いた。(B) はそれぞれ図24、26のウエスタンブロットの結果における、Myc-Smad1, Myc-Smad4 の各タンパク質の発現のレベルを、ImageJ を用いて定量化した。(n=10, 3 biological replicates)



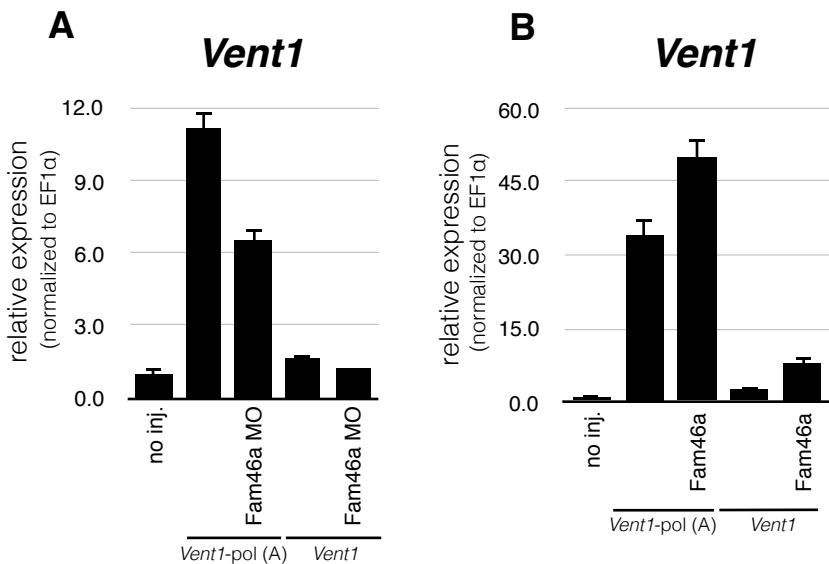
[図28] Fam46a 発現によるSmad1 の発現変化

(A) 2細胞期に *BMP4* mRNA および *Fam46a* mRNA を注入した胚を原腸胚期まで培養し、ウエスタンブロットを行なった。リン酸化 Smad1 (C末側のリン酸化) および Total の Smad1 の発現量変化を解析した。(n=10, 3 biological replicates) (B) *Myc-Smad1* mRNA および *EGFP-Fam46a* mRNA を注入した胚を原腸胚期まで培養し、ウエスタンブロットを行ない、Myc-Smad1 の発現量変化を解析した。(n=10, 3 biological replicates) (C) *Myc-Smad4* mRNA および *EGFP-Fam46a* mRNA を発現させた胚を原腸胚期まで培養してウエスタンブロットを行ない、Myc-Smad4 の発現量変化を解析した。(D) (B)におけるリン酸化 Smad1、非リン酸化 Smad1、Total Smad1 の発現量の変化をそれぞれ ImageJ を用いて定量解析した。(n=10, 3 biological replicates)



[図29] Smad1、BMP4 および Fam46a 発現による BMPシグナルターゲット遺伝子 *Id3* の転写活性化の有無の検証

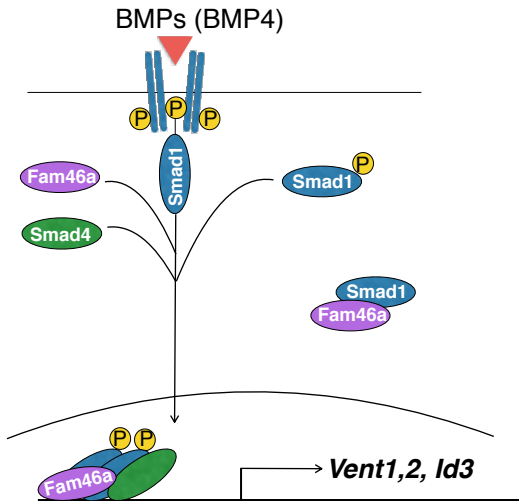
BMPシグナルターゲット遺伝子 *Id3* のプロモーター配列を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。(A) 2細胞期に *Smad1* mRNA, *Fam46a* mRNA, または *Smad1* mRNAと *Fam46a* mRNAを共注入した胚を原腸胚期まで培養したものをサンプルとして用いた。(n=10, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)(B) *Smad1* mRNAと *BMP4* mRNAあるいは *Smad1* mRNA, *BMP4* mRNA, *Fam46a* MOを注入した胚を原腸胚期まで培養したものをサンプルとして用いた。(n=10, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)



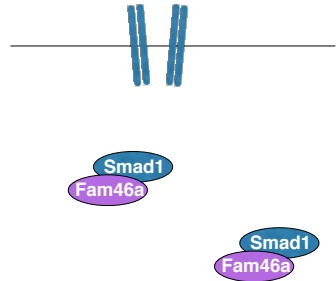
[図30] *Fam46a* 発現による *Vent1* mRNA 安定化への影響

(A) Poly (A) 付加シグナルを含むあるいは poly (A) 付加シグナルを含まない各 *Vent1* mRNA および *Fam46a* MO を 2 細胞期に注入したアニマルキャップを神経胚期まで培養し、*Vent1* mRNA の存在量を qPCR 法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。) (B) Poly (A) 付加シグナルを含むあるいは poly (A) 付加シグナルを含まない各 *Vent1* mRNA および *Fam46a* mRNA を 2 細胞期に注入したアニマルキャップを神経胚期まで培養し、*Vent1* mRNA の存在量を qPCR 法により定量的に解析した。(n=20, 3 biological replicates, エラーバーは標準偏差を示す。)

A ON-State



B OFF-State



[図31] BMPシグナル活性時/非活性時のFam46aによるBMPシグナリングターゲット遺伝子の発現制御機序のモデル図

- (A) BMPシグナル活性時には、Fam46aはシグナル構成因子であるSmad1およびSmad4と結合して複合体を形成し、Fam46a自身も核に移行してターゲット遺伝子の転写を促進する。
- (B) BMPシグナル非活性時においてもFam46aはSmad1と結合している。このことは、Fam46aがSmad1の分解を抑制している可能性があることを示している。

7. 謝辞

本研究の実施にあたり道上達男教授には指導教員として日々ご指導を頂き、本博士論文執筆においても多大なる助言を頂きました。心より感謝致します。また、産業技術総合研究所幹細胞工学研究グループの伊藤弓弦グループ長、小沼泰子博士には DNA マイクロアレイ解析の際にご協力およびご指導頂きました。深く感謝致します。最後に、本研究をサポートして下さいました道上研究室の皆様には感謝の意を込めて、謝辞とさせていただきます。