

氏 名 大河原 美 静

学位（専攻分野） 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第610号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 生命科学研究科 分子生物機構論専攻

学位規則第4条第1項該当

学位論文題目 RESTRICTION MECHANISM OF BONE MORPHOGENETIC PROTEIN
IN THE EARLY DEVELOPMENT OF *XENOPUS LAEVIS*

論文審査委員	主査教授	長濱 嘉孝
	教授	上野 直人
	教授	大隅 良典
	教授	高田 慎治 (京都大学)

論文内容の要旨

During early development, cells receive positional information from neighboring cells that direct how they should differentiate to form tissue patterns from initially uniform germ layers. Ligands of the transforming growth factor (TGF- β) superfamily are known to participate in this pattern formation. In particular, activin has been shown to act as a long-range signal to establish a concentration gradient in *Xenopus* ectoderm. In contrast, the action of BMP-2 and BMP-4, both of which also belong to this superfamily, appears to be restricted to the ventral ectoderm where they induce the epidermal fate in a tightly localized manner. This raises a question as to how the action of BMP is tightly restricted to within and around the cells that produce it.

To investigate this question, she noticed that some of the BMP subfamily ligands contain a unique core of basic amino acids in their N-terminus. Then cDNA encoding BMP-4 variants, lacking basic amino acids core in their N-terminal region, were constructed. To analyze their action ranges in *Xenopus* embryo, the experiments using presumptive ectoderm and whole embryo were performed. Results are, first, that a basic core of only three amino acids in the N-terminal region of BMP-4 is required not for its biological activity but for its restriction to the non-neural ectoderm and to the ventral tissue. Second, she demonstrated that heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) bind to this basic core and WT BMP-4 could act as long-range signal molecules where HSPGs are absent *in vivo*.

These observations suggest that the basic amino acids in the N-terminal region of BMP-4 and particularly the basic core play an essential role in conferring to BMP-4 a short-range action *in vivo*. And she demonstrated that at least one of the molecules trapping WT BMP-4 on the surface of animal cap cells is HSPGs *in vivo*. The present work first identifies the critical domain of BMP for the restriction of its diffusion through the interaction with extracellular environments *in vivo*.

論文の審査結果の要旨

個体発生の過程では均一な細胞集団が細胞分化によって徐々に異なる性質をもった細胞集団に区画化されていく。この「パターン形成」には細胞間相互作用が必須であり、細胞増殖因子が中心的な役割を担っていることが明らかにされてきた。とくにBMP、アクチビン、ノーダルに代表されるTGF- β スーパーファミリーに属する細胞増殖因子は初期発生における体軸形成といった基本的なボディープランの確立から器官形成までパターン形成に必須の役割を担っていることが知られている。しかしながら、細胞増殖因子がその産生細胞から分泌された後どのように標的細胞に作用を及ぼし、パターンを形成するのかについては不明な点が多い。学位申請者は、BMPの発現パターンを*in situ* hybridizationで観察するとBMP発現領域は予定神経領域と相補的であり、BMPが長距離にまで拡散して神経分化を抑制するlong range signalというより、むしろ近距離でのみ作用するshort range signalとして作用し、産生細胞の近傍にのみ作用するという知見に基づき、BMPとは対照的に様々な実験系において拡散性が高いことが認められているアクチビンとの作用範囲の差異について解析した。申請者はlong range signalであることがよく知られているアクチビンとBMPの拡散効率の差はBMPのアミノ末端側に存在する塩基性アミノ酸によるものであると予想し、この領域を欠損、あるいはアラニンに置換した改変体を用いて構造と作用範囲について解析を行った。BMPの作用範囲を検定するために、申請者はBMPによってリン酸化をうけるSmad1のリン酸化型を特異的に認識する特異抗体を用いた抗体染色によってBMPシグナルに応答して核移行したSmad1を検出するというユニークな方法を用いた。その結果、変異BMPは生物活性や受容体への親和性は変わらないものの、拡散性が著しく高くなっていることを明らかにした。また、この変異体が欠失した塩基性アミノ酸はヘパリンとの相互作用に関わっているという結果を得ており、BMPの拡散がヘパラン硫酸プロテオグリカンとの相互作用によって制御されていることを示した。

本研究は胚葉形成、とくに神経・非神経の運命決定を司るBMPの作用範囲が一次構造に依存したプロテオグリカンとの相互作用によって決定されていることを示した重要な研究であり、学位授与にふさわしいものであると判断した。学位論文作成に関して、研究の背景をより詳細に記載することや、関連分野の知見を加え討論を深めるべきとの指摘を受け、それらは加筆することとした。

本研究は液性因子によるパターン形成メカニズムの本質的な問題に迫る研究であり、BMPの拡散制御メカニズムを明らかにした点は高く評価される。また、これらの研究成果は国際専門誌にすでに印刷中であることから学術的な意義が大きいと判断される。さらに、審査会での質疑に対して申請者は的確に応答したことから関連分野についても十分な知識を有しているものと判断し、学位授与にふさわしいと判断した。