

氏 名 山 本 隆 正

学位（専攻分野） 博士(理学)

学 位 記 番 号 総研大乙第99号

学位授与の日付 平成14年3月22日

学位授与の要件 学位規則第4条第2項該当

学 位 論 文 題 目 Xmsx-1 homeobox protein as a downstream component of
BMP signal in the early development of *Xenopus laevis*

論 文 審 査 委 員	主 査 教授	諸橋 憲一郎
	教授	小林 悟
	教授	上野 直人
	教授	黒岩 厚 (名古屋大学)

論文内容の要旨

In vertebrate embryogenesis, the most crucial events are the determination of three dimensional body axes and the pattern formation along an individual axis. Consequently, the gastrula signaling centre, organizer, is formed and establishes the body plan. Therefore, the elucidation of the molecular mechanisms of these events is important for understanding early developmental processes.

In vertebrate, the pattern formation along dorsal/ventral (D/V) and anterior/posterior axis is well-known to be regulated by polypeptide growth factors belonging to the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily, bone morphogenetic protein (BMP) subfamily as ventralizing factors and nodal/activin subfamily as dorsalizing factors. BMPs are ubiquitously expressed in animal hemisphere and marginal zone of blastula embryo. Two classes of nodal genes begins to be activated in the dorsal endoderm region in the early blastula stage and the nodal activity activates the genes for other classes of nodal and BMP antagonists, chordin, noggin and follistatin, in the dorsal blastopore lip region, called Spemann's organizer, from late blastula to early gastrula stage. It is believed that by these stages the gradient of BMP activity, high ventrally and low dorsally, is formed by the BMP antagonists and several agonists and establishes the pattern formation along the D/V axis. How and what factors act as downstream components of the growth factors in this events? He was interested in the downstream mechanisms of BMP signaling regulating pattern formation along D/V axis. Several homeobox genes are known to be induced in response to BMP in early *Xenopus* development. In particular, *Xmsx-1*, an amphibian homologue of vertebrate *Msx-1* homeobox gene, is well characterized as a target gene of BMP. He focused on the role of *Xmsx-1* to understand the downstream events of BMP signaling.

In Part I, using a dominant-negative form of *Xmsx-1* (VP-*Xmsx-1*), which is a fusion protein made with the virus-derived VP16 activation domain, he has examined whether *Xmsx-1* activity is required in the endogenous ventralizing pathway. Overexpression of wild type *Xmsx-1* in dorsal side resulted in the ventralizing embryo as BMP did. VP-*Xmsx-1* induced a secondary body axis, complete with muscle and neural tissues, when overexpressed in ventral blastomeres, suggesting that *Xmsx-1* activity is necessary for both mesoderm and ectoderm to be ventralized. Supporting this, VP-*Xmsx-1* induced all dorsal markers tested, goosecoid, chordin and *Xmyf-5*, and repressed the ventrolateral markers, *Xwnt-8*, *Xvent-1* and *xGATA-2*, in the ventral marginal zone. Conversely, wild type *Xmsx-1* repressed the dorsal markers and induced the ventrolateral markers. He has also examined the epistatic relationship between *Xmsx-1* and another ventralizing homeobox protein *Xvent-1* and show that *Xmsx-1* is likely to be acting upstream of *Xvent-1* because *Xmsx-1* induced *Xvent-1* expression but *Xvent-1* did not *Xmsx-1*. Moreover, VP-*Xmsx-1*-induced dorsalized phenotypes were effectively rescued by coexpression of *Xvent-1*, while the ventralized *Xvent-1* phenotype was not rescued by VP-*Xmsx-1*. He proposes that *Xmsx-1* is required in the BMP-stimulated ventralization pathway that involves the downstream activation of *Xvent-1*.

In Part II, he used another inhibitory form of *Xmsx-1* to examine its role in head formation. Overexpression of any inhibitors of BMP signaling except cerberus, which is a triple

inhibitor of BMP, Wnt and Nodal, does not induce an ectopic head structure. Therefore, it is recent belief that inhibition of BMP signaling alone is insufficient and simultaneous inhibition of BMP and Wnt signaling in gastrula stage is required for head formation. Interestingly, ventral overexpression of a dominant Xmsx-1 inhibitor alone induced an ectopic head with eyes and a cement gland in the ventral side of the embryo, suggesting that Xmsx-1 is normally required to suppress head formation in the ventral side. Supporting this observation, he also found that wild-type Xmsx-1 suppresses head formation through the inhibition of nodal signaling, which is known to induce head organizer genes such as cerberus, Xhex, and Xdkk-1. Furthermore, extensive inhibition of BMP signaling by overexpression of multiple subtypes of dominant-negative BMP receptors or multiple extracellular BMP antagonists resulted in an ectopic head formation in the ventral side. He proposes that negative regulation of the BMP/Xmsx-1 signal is involved not only in neural induction and D/V patterning of mesoderm but also in head induction and formation. He further shows that Xmsx-1 physically interacts with Smad4 and the interaction can interrupt the Smad2/4/FAST-1 complex formation, which plays a key role in nodal signaling. He suggests that the inhibition of nodal signaling by Xmsx-1 may occur intracellularly, through the interaction with Smads, at the level of the transcriptional complex activating activin responsive element.

論文の審査結果の要旨

アフリカツメガエルの胚発生における体軸形成は、オーガナイザーと呼ばれる領域に依存している。オーガナイザーは背側中胚葉や神経形成に必須の領域であり、胚の腹側では細胞増殖因子 **BMP** の働きによってその作用が抑制されている。**BMP** による腹側化におけるシグナル伝達機構を明らかにするために、申請者は **BMP** の標的遺伝子としてホメオボックスタンパク質 **Xmsx-1** に着目し、その必要性について機能解析を行った。**VP16** タンパク質の転写活性化領域との融合による **Xmsx-1** の2種類の転写活性化型変異体(N末端領域を含む変異体と欠失した変異体)を作製し、**mRNA** の微量注入による過剰発現によってその働きを調べた。その結果、野生型 **Xmsx-1** の腹側化作用を阻害する N 末端領域欠失 **VP16-Xmsx-1** 融合タンパク質を腹側に単独で過剰発現すると、主に頭部を欠いた二次軸を形成することを見いだした。したがって、**Xmsx-1** は **BMP** による腹側化に必要な転写抑制因子であると結論付けた。

一方、N末端領域を含む変異体は強い阻害活性を示し、単独で初期胚腹側に過剰発現すると N 末端を含む **VP16-Xmsx-1** 変異体は、発現量に依存して高い頻度で眼やセメント腺を含む頭部を誘導した。申請者は次に **Xmsx-1** の頭部形成における役割について解析した。最近の研究からオーガナイザーは機能的に頭部オーガナイザーと胴部オーガナイザーの二つに分けられ、胴部オーガナイザーは **chordin**, **noggin**, **follistatin** 等によって **BMP** 活性のみを抑制する一方、頭部オーガナイザーは **Wnt** アンタゴニストである **cerberus**, **dkk**, **frzb** 等を分泌し、両オーガナイザーの作用によって **BMP** と **Wnt**, **nodal** シグナルが同時に阻害されることで頭部領域が誘導されると考えられている。申請者は、さらにこれらのオーガナイザー活性と **BMP** 活性との拮抗メカニズムを詳細に解析した。その結果、申請者は **Xmsx-1** は **TGF- β** family のひとつ **Xnr-1** の細胞内シグナルに必須の転写活性化複合体から **FAST** 因子を排除することによって、**Xnr-1** シグナルに拮抗することを明らかにした。また、申請者は **BMP** 標的遺伝子 **Xmsx-1** 機能の阻害により異所的に頭部が形成されたことから、**BMP** シグナルの遮断は頭部形成に必要十分であると考え、さまざまな **BMP** アンタゴニストによるより完全な **BMP** 活性の阻害を試み、同仮説が正しいことを示した。

これらの成果は、脊椎動物の初期胚発生におけるオーガナイザー活性と **BMP** シグナルの相互作用を分子レベルで詳細に明らかにしたものであり、頭部形成機構について既存のモデルの解釈に新たな知見を加えるなど、その成果は学位授与にふさわしいものであると判断した。

学位論文研究の口頭発表後内容について質疑を行ったところ、申請者の計画の立案、実験方法、結果の考察についての応答から、学位申請者山本隆正は博士号をうけるに十分な資格を有しているものと判断した。また、学位論文の骨格となる論文が数編国際専門誌に発表されていることから、英語能力も十分であり、また研究の学術的意義も高いと判断された。