

氏 名 高橋 潤

学位（専攻分野） 博士（理学）

学位記番号 総研大甲第 1391 号

学位授与の日付 平成 22 年 9 月 30 日

学位授与の要件 生命科学研究科 基礎生物学専攻  
学位規則第 6 条第 1 項該当

学位論文題目 Ripply1 と Ripply2 は Tbx6 の安定性を制御することにより体節の分節境界と rostro-caudal 領域を決定する

論文審査委員 主 査 教授 小林 悟  
教授 高田 慎治  
教授 藤森 俊彦  
准教授 越田 澄人 （東京大学）

## 論文内容の要旨

脊椎動物の体節は、発生初期の尾芽前方に位置する未分節中胚葉 (presomitic mesoderm, PSM) と呼ばれる領域が、前後軸に沿って規則正しくくびれ切れることによって形成される。分化した体節からは、脊椎骨や肋骨、骨格筋などが形成される。従って、成体組織で見られる脊椎骨などの分節性は、発生過程で形成された体節に由来する。

体節形成は、(1)尾芽から PSM にかけて起こる遺伝子の発現振動 (オシレーション)、(2) オシレーション (時間情報) を空間パターン (体節) に変換、という連続的な過程を経て行われる。(1)の過程において、マウスでは、bHLH 型転写因子 *Hes7* などの Notch シグナル系を構成する因子が、約 120 分毎にオシレーションを繰り返しており、この時間周期が前方 PSM で起こる分節化のタイミングを決める。(2)の過程で、前方 PSM まで到達した Notch シグナルは、体節の基になる空間的な遺伝子の発現パターンへと変換される。その際に重要な因子として、尾芽から前方 PSM にかけて発現する T-box 型転写因子 *Tbx6* と前方 PSM で特異的に発現する bHLH 型転写因子 *Mesp2* が知られている。PSM の分節化は、*Tbx6* 発現領域の前端で行われる。この時、*Mesp2* 発現領域では、*Tbx6* タンパク質の分解が行われる。*Mesp2* の発現は、尾芽から前方 PSM に向かって濃度勾配を形成する FGF シグナルによって抑制されている。一方で、*Mesp2* プロモーター領域には、Notch エフェクター因子と *Tbx* の結合配列を有しているため、FGF シグナルの濃度が閾値以下になり、*Tbx6* と Notch シグナルが重複する前方 PSM で、*Mesp2* は発現する。従って、*Mesp2* と重複した一体節分の *Tbx6* が分解されて、新たに *Tbx6* 発現領域の前端が形成され、次の分節境界となる。このような PSM の分節化に伴って、体節内では頭部 (rostral) 側と尾部 (caudal) 側がそれぞれ特異的に領域化する。これまでに、*Mesp2* と Delta-Notch シグナル系が体節内の rostro-caudal 領域形成に重要な役割を担うことが報告されてきた。しかしながら、どのように rostral 領域と caudal 領域が決定されるかに関しては十分に理解されていない。

体節の分節境界と rostro-caudal 領域が形成される過程で、*Mesp2* は初めに一体節分の幅で発現して、時間経過と共に体節内の rostral 側半体節分の領域に局在化し、その後、消失する。一方で、Notch シグナルのオシレーションは前方 PSM に到達すると、caudal 側の半体節分の領域に局在化し、その後、消失する。これまで、*Mesp2* と Notch シグナルがそれぞれ半体節分の幅に局在化することが、rostro-caudal 領域の形成に重要であると考えられてきた。しかしながら、これらの因子の発現は周期的に変化しているため、*Mesp2* と Notch シグナルがどのように局在を変化させるのか、その分子機構は十分に理解されていない。さらに、*Mesp2* 変異胚や *Notch* 変異胚は、rostro-caudal 領域の異常に加えて分節境界も消失する。このことから、*Tbx6* による分節境界の決定と rostro-caudal 領域の形成について相関関係が示唆されるが、その分子機構の理解は不十分である。

近年、申請者らの研究室では、ゼブラフィッシュの体節形成に必須の因子として、*rippy1* を同定した。また、マウスにおいても同様の因子として *Ripply2* が同定されている。*Ripply* は脊椎動物間で保存されており、それぞれの種で構造的に類似した因子が少なくとも 3 種 (*Ripply1*, *Ripply2*, *Ripply3*) 存在する。*Ripply* は約 150 アミノ酸から成る因子で、N 末端側に転写共抑制因子 *Groucho* の結合モチーフを持ち、C 末端側は *Tbx* と結合する。*Ripply* と結合した *Tbx* は、*Groucho* 依存的にその機能が活性型から抑止型に変換される。ゼブラフィッシュ *rippy1* 機能阻害胚では、PSM で発現を終了させるはずの *mesp-b/Mesp2* などの遺伝子が、前方領域に広範囲に拡がる。また、体節内の領域形成に異常が生じて、rostral 領域と caudal 領域がランダムに混ざり合ってしまうことが報告

された。ゼブラフィッシュとは異なり、マウス *Ripply2* 変異胚の体節は rostral 化する。マウス *Ripply2* は、*Mesp2* の下流因子で、かつ *Mesp2* の抑制因子として報告された。しかしながら、なぜ *Ripply2* 変異胚の体節が rostral 化するのか、十分な理解は得られていない。一方で、PSM では、*Ripply2* の他に *Ripply1* が発現することが知られているが、マウス *Ripply1* の機能は全くの不明である。本研究では、まず、*Ripply1* の体節形成への関与を明らかにするために、*Ripply1* 変異マウスの作製を行なった。さらに、*Ripply* による *Mesp2* の制御と rostro-caudal 領域形成における役割を調べるために、*Ripply1* と *Ripply2* の機能を完全に欠損させた、*Ripply1/Ripply2* (*Ripply1/2*) 二重変異マウスの作製を行なった。

初めに、*Ripply1* と *Mesp2* の関係は不明であったため、*Mesp2* 変異胚における *Ripply1* の発現を調べた。*Mesp2* 変異胚において *Ripply1* の発現が完全に消失したことから、*Ripply1* は *Mesp2* の下流因子であることが明らかになった。次に、*Ripply1* 変異マウスの作製を行なった。*Ripply1* 変異マウスでは脊椎骨の分節性に異常は見られず、体節の rostral 領域と caudal 領域のマーカ遺伝子の発現にも異常は認められなかった。これに対して、*Ripply1/2* 二重変異マウスでは、*Ripply2* 変異マウスの表現型が重篤化しており、体節領域がより rostral 化した。これらの結果から、*Ripply2* と同様に *Ripply1* も rostro-caudal 領域形成に重要な因子であることが明らかになった。

次に *Ripply1/2* 二重変異胚の体節が rostral 化した原因を調べるために、*Mesp2* と Notch シグナルの局在を詳細に解析した。この過程で、野生型胚の *Mesp2* と Notch シグナルの局在化様式に関して、これまでに明確には示されていない新たな観察結果が得られた。まず、Notch シグナルの停止位置について、Notch シグナルは、*Mesp2* 発現領域の後端で停止することが示唆された。これは、*Mesp2* 変異胚では、Notch シグナルが PSM 領域よりも前方方向に大幅に拡大することからも示唆される。*Mesp2* 発現領域の後端で Notch シグナルが停止すると、Notch シグナル依存的に新たに *Mesp2* の発現が開始して、*Mesp2* は 2 本バンドになる。前方の *Mesp2* が Notch シグナルを停止し、後方の *Mesp2* が Notch シグナルを抑制することによって、Notch シグナルは caudal 側に限局すると考えられる。これらの観察結果から、rostro-caudal 領域の形成過程では、2 つの前後する分節周期から生じた *Mesp2* が Notch シグナルを挟み込むことによって、最終的に caudal 領域に局在化する Notch シグナルの幅を決定することが示唆された。一方で、*Ripply1/2* 二重変異胚では、*Mesp2* の発現領域が拡大して、rostral 側への局在化が起らない個体が多数観察された。さらに、*Ripply1/2* 二重変異胚では、前方 PSM において Notch シグナルが消失していた。これらの結果から、*Ripply1/2* 二重変異胚では、*Mesp2* 発現領域が広がり、過剰な領域で Notch シグナルが抑制されたことにより、体節が rostral 化したことが強く示された。

本研究では、*Ripply* が *Mesp2* の発現を、転写抑制だけでなく別の方法によっても抑制していることを明らかにした。ゼブラフィッシュでは、*Ripply* は Tbx 依存的に *mesp-b / Mesp2* の転写を抑制すると考えられている。興味深いことに、*Ripply1/2* 二重変異胚では、Tbx6 タンパク質は PSM よりも大幅に前方領域に広がった。これまでは、*Mesp2* が Tbx6 タンパク質の分解に関与して、*Mesp2* 自身の発現を抑制すると報告されていた。しかしながら、*Ripply1/2* 二重変異胚では *Mesp2* 発現が増強していることから、Tbx6 分解において *Ripply1/2* は *Mesp2* よりも直接的なエフェクター因子であることが明らかになった。即ち、*Ripply1/2* は Tbx6 分解を制御することによって、Tbx6 によって規定される *Mesp2* 発現領域を制御していることが分かった。

本研究により、*Ripply1/2* は Tbx6 タンパク質の分解を介して、*Mesp2* の発現を rostral 側半体節分の領域に局在化させることが強く示唆された。また、*Ripply1/2* が *Mesp2* の発現領域を制御する

ことにより、Notch シグナルは caudal 側の半体節分の領域に局在することができると考えられる。本研究により、Ripply1/2 は Tbx6 タンパク質の分解を制御して、体節の分節境界を決定し、rostro-caudal 領域の形成を行なう重要な因子であることが強く示唆された。

申請者は、脊椎動物の体に見られる繰り返し構造のもととなる体節に着目し、その分節化に関わる主要な因子の一つである Ripply の作用機構を明らかにするとともに、Ripply と相互作用する一連の因子の時空間的発現パターンの解析から、体節の空間パターンの形成の分子機構を説明するモデルを提示した。

Ripply は分子量 120 から 140KD の比較的低分子量の核内タンパク質であり、脊椎動物には少なくとも 3 つの相同な遺伝子が存在する。Ripply は DNA 結合型転写制御因子の Tbx ファミリータンパク質ならびに転写共抑制因子である Groucho/TLE の各々と結合すること、そしてこの結合を介して Tbx ファミリータンパク質が転写の抑制を行うことが明らかになっている。脊椎動物の体節形成過程では、体節の前駆体細胞である未分節中胚葉において、Ripply1 と Ripply2 が発現することが示されており、先行研究からは Ripply2 は体節内の領域化に必要であることがわかっていた。すなわち、一つの体節内には前半部と後半部の各領域が存在することが遺伝子の発現パターンや移植実験から示されており、Ripply2 変異体マウス胚では体節が前方化する。しかしながら、Ripply2 が体節の前後の領域化に関わる他の因子群と協調してどのように体節内の領域を形成するのかということについては、申請者の研究以前には十分な理解が得られていなかった。

そこで、申請者は Ripply1 と Ripply2 の二重変異体を作成することによって未分節中胚葉における Ripply の機能を欠落させた胚を作成し、体節の領域化における Ripply の役割、ならびに体節内の領域化の分子機構を明らかにすることを試みた。Ripply1 ノックアウトマウスは体節形成に大きな異常は認められなかったのに対し、Ripply1 と Ripply2 の二重変異体では Ripply2 変異体で観察された体節の前方化がさらに強まっていた。一方、Ripply2 と同様に Ripply1 の発現には、体節の分節化に関わる転写制御因子である Mesp2 が必要であった。したがって、Ripply1 は Ripply2 と同様に Mesp2 によって発現が誘導され、体節の前後パターン形成に関わることがわかった。次に、体節内の前後パターン形成の仕組みの詳細を理解するため、Mesp2 ならびに Mesp2 とともに体節内の領域化に関わる Notch シグナルや Tbx6 の発現を体節内の領域化の時間経過に沿って詳細に調べた。その結果、前後する体節形成周期で形成される 2 つの Mesp2 発現領域の動的変化の結果、Notch 活性が予定体節の後方半分に限局化すること、Ripply1/2 二重変異体では Mesp2 領域の拡大が起こりその結果として Notch 活性化領域が消失すること、Mesp2 領域の拡大は Mesp2 の発現に関わる Tbx6 の発現領域の拡大によるものであり、Tbx6 の発現領域の制御には Ripply による Tbx6 タンパク質の分解が関与しているという結論を導くに至った。ここで提示された Notch 活性化領域の時空間的制御モデルは、体節内の領域形成を理解する上で大きな影響を与えるものであると思われる。また、本研究から、Ripply による Tbx の機能制御には、転写共抑制因子 Groucho/TLE を介する従来示されていた機構の他に、Tbx タンパク質の分解を介するという機構が存在することが示されたことは、Tbx 型転写調節因子の新たな制御機構を明らかにしたという点で大きな意味がある。

以上のことから、申請者の研究は、Ripply1 が Ripply2 とともに体節の領域

化に働くこと、そしてその過程では Tbx6 タンパク質の分解を引き起こすことを示すとともに、領域形成の分子機構を説明する新たなモデルを提唱し得たという点において博士論文に十分値するものであるものと審査員全員一致で判断した。