

## 学位論文題名

The role of bone morphogenetic proteins  
in early *Xenopus* embryo

(骨形成タンパク質のアフリカツメガエル初期胚での役割)

## 学位論文内容の要旨

## 1. 序論

脊椎動物の初期発生では、一つの受精卵から細胞分裂を繰り返して生じた細胞群が個々に分化し、それぞれ異なった形質を獲得していく。このような初期胚の細胞の分化は胚の部域化を生じ、将来の前後軸や背腹軸の形成へと引き継がれると考えられている。最近、成体から単離された種々の細胞増殖因子が遺伝子(mRNA)またはタンパク質として初期胚に存在することが明らかにされた。細胞増殖因子は、細胞膜上の特異的な受容体を介してそのシグナルを細胞内に伝達することにより細胞の増殖や分化を調節するタンパク質である。したがって、初期胚中に内在する細胞増殖因子も成体同様、その受容体を介して細胞増殖や分化を調節し、体の形づくり(形態形成)を行なっている可能性がある。現在までに、アフリカツメガエル胚を用いた実験からTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する細胞増殖因子が脊椎動物の初期発生課程で重要な役割を担っていることが示されている。このうち骨形成タンパク質(Bone Morphogenetic Protein, BMP)はツメガエル胚の将来背側の組織になる割球にそのmRNAを微量注入すると背側組織(神経、筋肉)を欠失して腹側組織(血球)を過剰に形成した胚(腹側化胚)を生じる。このことから、BMPは腹側組織の形成に役立っており、背側組織形成因子とBMPの相互作用によって初期胚の部域化すなわち背腹軸の形成が行われると考えられている。

本研究ではBMPの初期胚での役割を明らかにするために、BMPに特異的な受容体(BMP受容体)を単離した。また、遺伝子工学的手法によって作製した改変型BMP受容体をつメガエル初期胚中で過剰発現させて胚内のBMPシグナルを遮断することを試み、胚に内在するBMPの機能を明らかにした。

## 2. BMP受容体cDNAのクローニング

TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する細胞増殖因子は、セリン/スレオニンキナーゼ型受容体に結合して細胞内にシグナルを伝達することが知られている。そこで、これらの受容体間で良く保存されているセリン/スレオニンキナーゼドメインを利用した

reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法によって、BMP受容体を高発現しているマウスの骨芽細胞からBMP受容体cDNAのクローニングを試みた。RT-PCR法によって得られた遺伝子断片から新奇なセリン/スレオニンキナーゼをコードする遺伝子 (mTFR11) を選別し、これをプローブとして完全長cDNAを単離したところmTFR11はシステイン残基に富んだ細胞外ドメインと1つの膜貫通ドメインそして細胞内のセリン/スレオニンキナーゼドメインからなる受容体タンパク質をコードしていることが分かった。mTFR11受容体がBMP受容体であるかどうかを明らかにするために、mTFR11 cDNAの遺伝子導入によってCOS細胞上に過剰発現させたmTFR11受容体と放射性ヨウ素で標識したBMP-4 ( $[^{125}\text{I}]$ BMP-4)との結合特異性をリガンド結合法で複合体分子量をアフィニティークロスリンク法で調べた。その結果、mTFR11受容体は $[^{125}\text{I}]$ BMP-4と結合し、分子量70 kDaのクロスリンク複合体を生じた。この結合は未標識のBMP-2およびBMP-4で効率良く置換され、アクティビンやTGF- $\beta$ では置換されなかった。したがって、mTFR11受容体はBMP-2およびBMP-4に特異的な受容体であることが明らかになった。

### 3. 改変型BMP受容体によるBMPシグナルの遮断

遺伝子工学的手法によって細胞内ドメインを欠失した改変型BMP受容体を作製し、この受容体がBMPシグナルを遮断できるかどうかを調べた。BMP-4 mRNAをツメガエルの4細胞期の胚の背側割球に微量注入すると胚は腹側化するが、改変型BMP受容体 mRNAを同時に注入するとBMP-4による腹側化は抑制された。したがって、改変型BMP受容体はツメガエル胚中においてBMPシグナルを遮断する能力を持つことが分かった。

### 4. 改変型BMP受容体による初期胚に内在するBMPシグナルの遮断

初期発生におけるBMPの機能を明らかにすることを目的として、改変型BMP受容体によって初期胚の腹側割球に内在するBMPシグナルを遮断し、背腹軸形成に及ぼす影響を調べた。ツメガエルの4細胞期の胚の腹側割球に改変型BMP受容体 mRNAを微量注入して尾芽胚期まで発生させると神経管の重複が見られ、さらに発生が進むと本来の背側構造に加えて余分な背側軸構造を持った2次胚を生じた。この胚から組織切片を作製したところ、2次軸側には1次軸側と同様に神経や筋肉などの背側の組織構造が形成されていた。また、2次軸側における神経と筋肉の形成は神経特異的マーカーのN-CAMおよび筋肉特異的マーカーの $\alpha$ -adinをプローブにしたホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によっても確認された。さらに、初期原腸陥入期における背側および腹側特異的な発現を示す分子マーカーの発現変化をホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析した。分子マーカーとして背側中胚葉領域に発現する *gooseoid*、腹側および側面中胚葉領域に発現する *Xpo*、全ての中胚葉領域で発現する *Xbra* を用いた結果、BMPシグナルを遮断された予定腹側中胚葉領域では *Xbra* の発現を変化させることなしに *Xpo* の発現が消失したが、*gooseoid* の発現は検出できなかった。このことは、BMPシグナルを遮断された予定腹側中胚葉領域は初

期原腸胚の時点で中胚葉形成能を失うことなく腹側組織へ分化できなくなったことを示している。

## 5. まとめ

本研究ではBMP-2およびBMP-4に特異的な受容体をコードするcDNAを脊椎動物より初めてクローニングした。さらに遺伝子工学的手法によって細胞内ドメインを欠失させた改変型BMP受容体を作製し、この受容体がBMPシグナルを遮断できることを示した。初期胚に内在するBMPの役割を明らかにするために、改変型BMP受容体をツメガエル初期胚中で過剰発現させて内在のBMPシグナルを遮断することを試みたところ、BMPシグナルを遮断された胚は腹側組織の形成能を失い、腹側組織の代わりに新たな背側組織を形成した。したがって、脊椎動物の初期発生過程において内在のBMPは腹側組織の形成を促進していることが明らかになった。さらに、BMPシグナルの遮断によって腹側組織の代わりに背側組織が形成されたことは、腹側組織の形成が背側形成因子の支配からの逸脱ではなくBMPによる積極的な促進シグナルによるものであることを示している。また、BMPシグナルの遮断によって中胚葉の形成が阻害されなかったことから、BMPは中胚葉の誘導に必須ではなく中胚葉の背腹パターンの形成に働いていることが分かった。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 野 直 人  
副 査 教 授 横 澤 英 良  
副 査 助 教 授 澁 谷 浩 司  
副 査 助 教 授 澤 田 均

### 学 位 論 文 題 名

## The role of bone morphogenetic proteins in early *Xenopus* embryo

(骨形成タンパク質のアフリカツメガエル初期胚での役割)

申請者らは細胞増殖因子のひとつである骨形成タンパク質の初期発生における機能に関する研究を行ってきたが、今回以下のような結果を得た。

最近、成体から単離された種々の細胞増殖因子が遺伝子 (mRNA) またはタンパク質として初期胚に存在することが明らかにされている。細胞増殖因子は、細胞膜上の特異的な受容体を介してそのシグナルを細胞内に伝達することにより細胞の増殖や分化を調節するタンパク質である。したがって、初期胚中に内在する細胞増殖因子も成体同様、その受容体を介して細胞増殖や分化を調節し、体の形づくり (形態形成) のシグナル分子として機能している可能性がある。現在までに、アフリカツメガエル胚を用いた実験からTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する細胞増殖因子が脊椎動物の初期発生過程で重要な役割を担っていることが示されている。このうち骨形成タンパク質 (Bone Morphogenetic Protein, BMP) はツメガエル胚の将来背側の組織になる割球にそのmRNAを微量注入すると背側組織 (神経、筋肉) を欠失して腹側組織 (血球) を過剰に形成した胚 (腹側化胚) を生じる。このことから、BMPは腹側組織の形成に役立っており、背側組織形成因子とBMPの相互作用によって初期胚の部域化すなわち背腹軸の形成が行われると考えられている。

申請者はBMPの初期胚での役割を明らかにするために、BMPに特異的

な受容体 (BMP受容体) を単離した。また、遺伝子工学的手法によって作製した改変型BMP受容体をつメガエル初期胚中で過剰発現させて胚内のBMPシグナルを遮断することを試み、胚に内在するBMPの機能を検討した。

そのためにまず申請者はBMP受容体cDNAのクローニングを行った。TGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する細胞増殖因子は、セリン/スレオニンキナーゼ型受容体に結合して細胞内にシグナルを伝達することが知られている。そこで、これらの受容体間で良く保存されているセリン/スレオニンキナーゼドメインを利用したreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法によって、BMP受容体を高発現しているマウスの骨芽細胞からBMP受容体cDNAのクローニングを試みた。RT-PCR法によって得られた遺伝子断片から新奇なセリン/スレオニンキナーゼをコードする遺伝子 (mTFR11) を選別し、これをプローブとして完全長cDNAを単離したところmTFR11はシステイン残基に富んだ細胞外ドメインと1つの膜貫通ドメインそして細胞内のセリン/スレオニンキナーゼドメインからなる受容体タンパク質をコードしていることが分かった。mTFR11受容体がBMP受容体であるかどうかを明らかにするために、mTFR11 cDNAの遺伝子導入によってCOS細胞上に過剰発現させたmTFR11受容体と放射性ヨウ素で標識したBMP-4 ( $[^{125}\text{I}]$ BMP-4)との結合特異性をリガンド結合法で複合体分子量をアフィニティークロスリンク法で調べた。その結果、mTFR11受容体は $[^{125}\text{I}]$ BMP-4と結合し、分子量70 kDaのクロスリンク複合体を生じた。この結合は未標識のBMP-2およびBMP-4で効率良く置換され、アクティビンやTGF- $\beta$ では置換されないことを示し、mTFR11受容体がBMP-2およびBMP-4に特異的な受容体であることを明らかにした。

つぎに申請者は初期胚で改変型BMP受容体によるBMPシグナルを遮断し遺伝子工学的手法によって細胞内ドメインを欠失した改変型BMP受容体を作製し、この受容体がBMPシグナルを遮断できるかどうかを調べた。BMP-4 mRNAをつメガエルの4細胞期の胚の背側割球に微量注入すると胚は腹側化するが、改変型BMP受容体 mRNAを同時に注入するとBMP-4による腹側化は抑制された。したがって、改変型BMP受容体はつメガエル胚中においてBMPシグナルを遮断する能力を持つことを示した。次に改変型BMP受容体によって初期胚の腹側割球に内在するBMPシグナルを遮断し、背腹軸形成に及ぼす影響を調べた。つメガエルの4細胞期の胚の腹側割球に改変型BMP受容体 mRNAを微量注入し

て尾芽胚期まで発生させると神経管の重複が見られ、さらに発生が進むと本来の背側構造に加えて余分な背側軸構造を持った2次胚を生じた。この胚から組織切片を作製したところ、2次軸側には1次軸側と同様に神経や筋肉などの背側の組織構造が形成されていた。また、2次軸側における神経と筋肉の形成は神経特異的マーカーのN-CAMおよび筋肉特異的マーカーの $\alpha$ -actinをプローブにしたホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によっても確認された。さらに、初期原腸陥入期における背側および腹側特異的な発現を示す分子マーカーの発現変化をホルマウント *in situ* ハイブリダイゼーション法によって解析した。分子マーカーとして背側中胚葉領域に発現する *gooseoid*、腹側および側面中胚葉領域に発現する *Xpo*、全ての中胚葉領域で発現する *Xbra* を用いた結果、BMPシグナルを遮断された予定腹側中胚葉領域では *Xbra* の発現を変化させることなしに *Xpo* の発現が消失したが、*gooseoid* の発現は検出できなかった。このことは、BMPシグナルを遮断された予定腹側中胚葉領域は初期原腸胚の時点で中胚葉形成能を失うことなく腹側組織へ分化できなくなったことを示している。

申請者は本研究においてBMP-2およびBMP-4に特異的な受容体をコードするcDNAを脊椎動物より初めてクローニングし、さらに遺伝子工学的手法によって細胞内ドメインを欠失させた改変型BMP受容体を作製することによって、BMPが初期発生制御において重要な機能を担っていることを明らかにした。

よって、以上の研究は博士（薬学）の学位を受けるに充分値するものと認めた。