

学 位 論 文 題 名

Xenopus laevis Macrophage Migration Inhibitory Factor
Is Essential for Axis Formation and Neural Development

(アフリカツメガエルの体軸形成及び

神経発生におけるマクロファージ遊走阻止因子の関与)

学位論文内容の要旨

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は、マクロファージの無秩序な運動を阻害するリンパ球由来の因子として発見されたサイトカインである。当初 MIF の主要な機能はマクロファージを感染部位に集積させることであると考えられたが、その後の研究により、MIF は多種の細胞によって産生され、T リンパ球の活性化、細菌感染によるエンドトキシンショックの増悪、異性化酵素活性、酸化還元酵素活性、細胞増殖の制御及び細胞死の抑制、自然免疫の調節等多くの機能を有するタンパク質であることが明らかにされた。この多機能性を考慮すると、哺乳類等脊椎動物の発生においても MIF が関与することが推測されたが、MIF のノックアウトマウスは予想に反して正常に発生することが示されている。ノックアウトマウスは多くの場合遺伝子産物の機能特定に有用であるが、その作成過程において目的遺伝子の欠失を補償する変化が発生する可能性がある。このため、MIF のノックアウトマウスが正常に発生することからは、発生における MIF の関与を否定できない。本研究では、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* の初期胚において MIF の産生を阻害することにより、発生過程における MIF の役割を示すことを目的とした。

阻害実験を行うには *Xenopus* MIF (XMIF) をコードする cDNA の配列が必要となる。このため、*Xenopus* 胚に由来し哺乳類 MIF に相同性を有する Expressed Sequence Tag (EST) の配列を用いてプライマーを合成し、*Xenopus* 肝 RNA から Rapid Amplification of cDNA Ends (RACE) 法により XMIF cDNA の全長をクローニングした。得られた cDNA によりコードされるアミノ酸配列は、哺乳類 MIF と約 70% 一致し、異性化酵素活性の中心である N 末端のプロリン残基、その周囲に存在する芳香族の残基群、及び酸化還元酵素活性の中心である 2 個のシステイン残基は、XMIF において保存されていた。XMIF、哺乳類 MIF、及び MIF に低い相同性を有するタンパク質である D-ドーパクロム異性化酵素 (DDT) のアミノ酸配列により作成した分子系統樹における XMIF の占める位置は、XMIF が哺乳類 MIF に相当する分子であるという仮定を支持した。p-ヒドロキシフェニルピルビン酸を基質として測定した異性化酵素活性はラット MIF と XMIF において同程度であった。X 線結晶構造解析により決定した XMIF の立体構造は、哺乳類 MIF の構造に極めて類似していた。さらに、成体における XMIF mRNA の発現は脳、腎で強く、これはラット MIF の発現パターンに類似していた。以上のことから、*Xenopus* において XMIF は哺乳類 MIF と同一の機能を担う分子であることが強く示唆された。

Xenopus 胚中の MIF mRNA を分析した結果、MIF は卵割期から胞胚期まで多量に検出され、囊胚期に減少した後、尾芽胚期に再び増加していた。胚中の MIF RNA を *in situ* ハイブリダイゼーションにより検出すると、胞胚期には動物極周辺に局在が認められた。囊胚期には背

側帯域に少量の mRNA が検出された。神経胚期には前方神経板に局在した発現が認められた。初期尾芽胚期には発現量が増加し、前部神経組織に最も強い発現が検出された。後期尾芽胚期には、MIF は眼胞及び脳で強く発現し、背部にも発現が認められた。切片の観察により、MIF は頭部間充織及び体節においても少量発現していることが示された。

MIF 産生の阻害（ノックダウン）は、MIF に特異的なモルホリノオリゴマー（MO）を初期胚に注入し、MIF mRNA の翻訳を阻害することにより行った。注入する MO としては、クローニングした cDNA の 5' 末端（-59）から翻訳開始点付近までの配列から標的部位を選択し、MO1（-1~24 に相補的）及び MO2（-28~-4 に相補的）を合成した。これらは無細胞翻訳系において MIF RNA の翻訳を阻害し、MO1 が MO2 より高い阻害効率を示した。MIF mRNA は尾芽胚中の神経組織において多量に発現していたことから、4 細胞期胚の背側の 2 割球に MO を注入した。MO1 注入胚の発生には囊胚期まで異常が認められなかったが、神経胚期への移行が阻害され、神経板は形成されなかった。尾芽胚期に相当する時期（stage 32）での観察において頭部及び尾部の構造に顕著な形成不全が見られ、体長が短縮した。これらの胚では神経組織が発生せず、脳、脊髄、眼胞、耳胞が欠損していた。また、神経マーカーである *zic-2* 及び *nrp-1* の発現が *in situ* ハイブリダイゼーションにより検出されなかった。さらに脊索、体節等の中胚葉組織も発生しなかった。この効果が MIF のノックダウンによる特異的なものであることを確認するため、MIF RNA を用いた回復実験を行った。この目的に用いる MIF RNA は、MIF 由来の 5' 非翻訳領域を含まないものとし、翻訳の阻害には、5' 非翻訳領域の一部に相補的である MO2 を用いた。MO2 を単独で注入した場合、その効果は MO1 注入の効果より弱かったが、注入量を増加することにより、MO1 注入胚と同様の表現型が得られた。MO2 と MIF RNA を共注入することにより、頭部及び尾部の構造が部分的に回復し、神経管が形成され、体長も部分的に回復した。一方、共注入により脊索等の中胚葉組織は形成されなかった。この結果から、MO 注入により生じた変化のうち、少なくとも中胚葉組織の欠損以外は MIF のノックダウンによる特異的な効果であることが強く示唆された。MIF RNA の共注入による回復が部分的であった原因は不明であるが、RNA の注入により産生された MIF が必要量より少なかった可能性、及び正常胚においては多量の MIF を産生しない細胞中で注入 RNA から MIF が産生されたことが周囲の細胞の正常な分化を阻害した可能性が考えられる。

MIF が神経発生に関与する可能性は、正常胚における MIF mRNA の発現パターンから予想されたが、MO の注入により中胚葉組織の形成が阻害されたことは予想外であった。*Xenopus* において、後期囊胚期の背側中胚葉に脊索が形成され、これが神経組織を誘導することから、MO 注入による神経発生の阻害の一部は、脊索の形成阻害による間接的なものであった可能性がある。この点については今後確認を要するが、今回の結果は、*Xenopus* において MIF が前後軸の形成と神経発生に必要であり、背腹軸の形成は少なくとも部分的に MIF に依存することを示すものである。

本研究は、MIF が *Xenopus* の発生に必要な因子であることを明らかにした。この結果は、哺乳類の発生においても MIF が重要な役割を有することを示唆している。今後 *Xenopus* の発生における MIF の関与を分子レベルで解明することが、哺乳類の発生を理解する上でも有用であると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 田 中 一 馬

学 位 論 文 題 名

Xenopus laevis Macrophage Migration Inhibitory Factor Is Essential for Axis Formation and Neural Development

(アフリカツメガエルの体軸形成及び

神経発生におけるマクロファージ遊走阻止因子の関与)

マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) は細胞内外の多様な現象に関与する調節分子であり、特に細胞増殖と細胞死の制御等の普遍的かつ基本的機能を有することから、発生においても重要な役割を有することが推測されるが、ノックアウトマウスを用いた実験では MIF が発生に関与する証拠が得られていなかった。本研究では発生過程における MIF の役割を示すため、アフリカツメガエル *Xenopus laevis* の初期胚において MIF の産生を阻害し、その効果を検討した。

Xenopus MIF をコードする cDNA の全長をクローニングし、それを用いて *Xenopus* MIF の性質を哺乳類 MIF との間で比較した結果、異性化酵素活性、立体構造、臓器での発現量が類似していた。胚における MIF mRNA の量は、卵割期から胞胚期まで及び尾芽胚期で多かった。神経胚期以降の主要な発現部位は、神経組織であった。MIF に特異的なアンチセンスモルホリノオリゴマー (MO) を 4 細胞期胚に注入して MIF の産生を阻害した結果、囊胚期まで発生は正常に進行したが、神経胚期への以降が完全に停止し、神経板が形成されなかった。尾芽胚期に相当する時期において、MO 注入胚の頭部及び尾部に重度の形成不全が発生し、体調が短縮した。また脳、脊髄、眼胞、耳胞、脊索、体節が消失した。これらの効果のうち、少なくとも中胚葉由来組織 (脊索及び体節) への影響以外は MIF の産生阻害による特異的なものであることが、MO と MIF RNA を共注入した胚の表現型の回復により確認された。従って、本研究では MIF が *Xenopus* の発生において体軸形成及び神経発生に必要な因子であることが明らかとなった。

公開発表にあたって、副査の田中教授から線虫、植物で MIF が形態形成に関与する可能性、*Xenopus* で MIF が分泌されているか、異性化酵素活性の活性部位変異体を用いた実験の必要性について質問があった。これに対し申請者は線虫でも形態形成に関与しているであろうが 4 種のホモログあって解析が難しいと推測され、植物でも関与している可能性はあるがそれを示す実験結果はないこと、*Xenopus* で分泌されるかは確かめていないが哺乳類同様に全身的及び局所的分泌の可能性があること、活性部位変異体を用いた実験は必要だが現在その途上であり結果は得られていないことを説明した。副査の長嶋教授から実験系として *Xenopus* を選んだのは MIF を補償する因子がないことによるものか、MIF の産生阻害により神経発生のどの段階で停止するか、異性化酵素活性部位変異体を用いる実験で

予測される結果について質問があった。これに対し申請者は *Xenopus* 胚中の MIF 産生阻害においては時間的な因子により補償が起きなかったか、*Xenopus* では哺乳類より補償が起こりにくいためと思われること、原腸陥入は正常に起こるが神経板は形成されず、その間で脊索の形成される領域に変化が発生していると推測されること、酵素活性と生物活性の関係は哺乳類 MIF でも複雑であり、変異体を用いた実験の結果は予測できないことを説明した。主査の浅香教授から MIF の抗原性について、MO の効果及び MO を選択した理由について、ノックアウトマウスにおける補償の問題と従来の研究に対する再評価の必要性について、MO 注入胚の生存に対する影響について質問があった。これに対し申請者は、哺乳類 MIF は非常に相同性が高く抗体の作成が難しいこと、MO による阻害は 100%には達しないがそれに近い場合もあり、多くの場合高い阻害効率が得られるので標準的方法となっていること、従来の研究の再評価が必要になる可能性もあり、新規の研究では目的遺伝子に類似する遺伝子の挙動に注意すべきこと、尾芽胚期以降において致死的となることを説明した。

本研究により *Xenopus* の体軸形成及び神経発生における MIF の必要性を示したことは、今後哺乳類の発生課程における体軸形成及び神経発生の分子機構の解明につながると考えられ、そこで得られる知見は神経疾患、癌等病態の理解にも寄与することが期待できる。審査員一同はこれらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。