

論文内容の要旨

申請者氏名 仲矢 由紀子

脊椎動物では、初期発生過程において体の前後軸に沿った繰り返し構造が認められるが、これらは、すべて体節中胚葉の分節パターンを基盤としている。この分節構造は、前体節中胚葉と呼ばれる組織の前方側から、体節が順にくびれ切れることにより形成される。その際、間充織細胞から成る一続きの組織の中で次の分節境界の前側に位置する細胞が、間充織から上皮細胞へと形態変化 (MET) を起こし、その結果として球状の体節ができあがる。本研究は、この体節分節が 3 次元の器官形成に関わる MET を理解するための優れた組織であると考え、ニワトリ初期胚の体節中胚葉の分節化を利用して、*in vivo* における細胞の間充織→上皮転換 (MET) 機構を解明することを目的としている。MET が、代表的な細胞骨格タンパク質であるアクチンの動的な再構築を伴うことから、MET の制御メカニズムは、アクチン細胞骨格の再構築を介して細胞形態を制御する低分子量 G タンパク質 Rho ファミリー (RhoRac, Cdc42) が関係する可能性が考えられた。本研究ではこれら分子に着目し、分節化への役割について検討している。

申請者はまず、*in ovo* エレクトロポレーション法に改良を加え、ニワトリ胚の体節中胚葉に特異的かつ、効率のよい遺伝子導入を可能にした。この方法を用い、RhoA, Rac1, Cdc42 の野生型 (WT-)、恒常的活性型 (CA-)、不活性型 (DN-) の合計 9 種類の遺伝子を体節中胚葉に GFP 遺伝子と共導入した。GFP のみを導入した場合、GFP は体節構成細胞の 30~60% の細胞にモザイク状に発現した。分節化を遂げた正常体節は、表面が上皮細胞に覆われた球状を呈し、内部には間充織細胞が存在している。モザイク状の GFP 発現細胞は、体節の表面を覆う上皮細胞領域と内部の間充織領域の両方に均一に分布した。WT-Cdc42 を体節に導入した場合、遺伝子を発現した細胞は、コントロール実験と同様に体節の上皮および間充織領域の両方にランダムに存在していた。CA-Cdc42 を強制発現させた細胞は、間充織領域にのみ認められ、逆に Cdc42 を阻害すると細胞はほぼすべて上皮化した。Rac1 について同様に解析した結果、CA-Rac1 および DN-Rac1 発現細胞のいくつかは、上皮領域において認められたが、主として体節内部の間充織領域に優先的に存在した。さらに CA-Rac1 発現細胞においては N カドヘリンの発現量の増加や細胞内分布が異常になり、DN-Rac1 発現細胞においては F アクチンの重合が異常であった。次に分節化過程における Rac1 の活性化を検出するために GST 融合タンパク質沈降法を試みた結果、体節板を含む組織から活性型 Rac1 が検出された。bHLH 型転写因子 Paraxis は、上皮化に必要であることがノックアウトマウスを用いた研究から報告されている。本研究において、Paraxis をトリの体節細胞に過剰発現させると上皮化を促進させることが明らかになった。さらにこの上皮化作用は、Paraxis と DN-Rac1 を共導入することにより中和されることから、Paraxis の上皮化作用は、Rac1 シグナルを必要とすることを見いだした。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 仲矢 由紀子

発生初期において組織や器官が形成される際には、個々の細胞が増殖や遊走、さらに凝集といった過程を通じて、その位置や形態をダイナミックに変化させ、近隣の細胞と相互作用する。特に、細胞が上皮と間充織という形態的に異なった2つの状態を移行する現象、上皮-間充織相互転換 (EMT/MET) は、形態形成あるいは器官形成過程において重要なプロセスであり、これらは時間的・空間的な秩序のもとで制御されていると考えられているが、その形態変化を制御するメカニズムについては不明である。

申請者は、*in vivo* における細胞の間充織-上皮転換 (MET) 機構を解明するために、体節形成過程における間充織細胞から上皮細胞への周期性過程を、細胞骨格タンパク質であるアクチンの動的な再構築を伴うと考え、アクチン細胞骨格の再構築を介して細胞形態を制御する低分子量Gタンパク質 Rho ファミリー(Rho, Rac, Cdc42)群の機能解析をニワトリ胚を用いて行った。

まず、きわめて難しかった体節中胚葉組織への外来遺伝子の導入を、*in ovo* エレクトロポレーション法に改良を加えることにより、効率のよい遺伝子導入を可能にした。この方法を用いて、種々の低分子量Gタンパク質遺伝子を導入し、正常な分節化過程において、Cdc42 の活性化レベルが低い場合は上皮化、高い場合は間充織形態の維持、Cdc42 の活性化レベルに応じて細胞形態が制御されることを明らかにした。また Rac1 についての解析結果から、Rac1 は細胞骨格やカドヘリンの分布を制御して上皮化に関与し、Rac1 の活性化レベルが厳密に調節されることが必要であることを明らかにした。bHLH 型転写因子 Paraxis は、上皮化に必要な Paraxis をトリの体節細胞に過剰発現させると上皮化を促進させることが明らかになった。さらにこの上皮化作用は、Paraxis と DN-Rac1 を共導入することにより中和されることから、Paraxis の上皮化作用は、Rac1 シグナルを必要とすることを見いだした。

体節分節をモデルとして得られたこれら Cdc42 と Rac1 の特異的な機能は、形態形成過程でみられる細胞の上皮-間充織相互転換 (EMT/MET) を理解する糸口となり、器官形成における役割が未だ明らかにされていない Rho ファミリー分子の機能解明を新しい局面を開拓したと言える。

以上のように、本論文は個体レベルにおける上皮-間充織相互転換の機構を Rho ファミリー分子を中心に明らかにしたもので、学術上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。