

## 論文内容の要旨

申請者氏名 上村 美佳

脊椎動物や無脊椎動物を問わず、生物の発生過程において、bone morphogenetic proteins (BMPs) / Decapentaplegic (Dpp) シグナルが重要な役割を担っていることが知られている。ショウジョウバエにおける遺伝学的な解析から、*crossveinless 2 (cv-2)* という遺伝子が報告された。CV-2 は、アンタゴニストとして知られる Chordin の持つ cysteine-rich (CR) ドメインと相同性の高いドメインを持つにも関わらず、その表現型から dpp シグナルを増強する因子であることが示唆された。そこで、CV-2 を解析することで新しい BMP のシグナル伝達機構が見えてくるのではないかと考えた。

本研究では、ショウジョウバエ *cv-2* と相同性の高いニワトリ *CV-2 (cCV-2)* を単離した。cCV-2 タンパクは N 末側には疎水性のアミノ酸残基に富む領域があり、続いて Chordin タイプの CR ドメインが 5 つ並び、C 末側に vWF-D ドメインが存在しており、ショウジョウバエ CV-2 とほぼ同じドメイン構造をしていた。

cCV-2 タンパクの性質を明らかにするため、培養細胞に強制発現させ、ウェスタンブロットを行った。その結果、cCV-2 タンパク質は分泌タンパクであり、5 つの CR ドメイン領域と vWF-D ドメイン領域に切断され、CR ドメインは糖修飾を受けることが明らかとなった。

次に、CV-2 の BMP シグナルに対する働きを調べるために、培養細胞に *cCV-2* を強制発現させ、BMP シグナルの指標となるリン酸化 Smad1 をウェスタンブロットで検出した。*cCV-2* 単独の発現ではコントロールと比較してほぼ変化はないが、*BMP4* の存在下において、*BMP4* 単独の場合よりさらに増加した。さらに、*cCV-2* 発現細胞をニワトリ胚の limb に移植すると、BMP によって発現が制御されている *Msx1* の発現領域が広がった。これらのことから、分泌された *cCV-2* が細胞外で作用し、BMP シグナルを増強することが示唆された。

ニワトリ胚、マウス胚ともに *CV-2* は神経管や心臓、指間部などで発現しており、これらの組織では *BMPs* は *CV-2* の発現している領域と重複または隣接する領域で発現していた。特に、指間部での発現は *BMPs* と相補的な発現をしているが、リン酸化 Smad1/5/8 抗体で免疫染色すると、*CV-2* の発現と同じ領域が強く染色された。この領域は BMP シグナルによってアポトーシスが起こる領域であることが報告されている。従って、脊椎動物の *CV-2* が発生過程においても BMP シグナルと密接な関わりを持っていると考えられる。

本研究の結果から、脊椎動物の *CV-2* は分泌タンパクであり、細胞外で BMP シグナルを制御することで、発生過程において効率的に BMP シグナルの伝達を行っていることが示唆された。

## 論文審査結果の要旨

申請者氏名 上村 美佳

生物の胚発生は、シグナル分子を用いた細胞同士のクロストークによって制御されている。現在までの研究から、多くのシグナル分子が発見され、そのシグナル分子ネットワークは、脊椎動物や無脊椎動物を問わず種を超えてよく保存されていることが知られている。このようなシグナルのもっとも代表的なもの1つとして bone morphogenic proteins (BMPs) / Decapentaplegic (Dpp)シグナルがある。ショウジョウバエにおける遺伝学的な解析から、BMP/Dpp シグナルに関わる新しい因子の *crossveinless 2 (cv-2)* が報告された。CV-2 はアンタゴニストの Chordin の持つ cysteine-rich (CR)ドメインと相同性の高いドメインを持つにも関わらず、その表現型から dpp シグナルを増強する因子であることが示唆された。そこで、本論文では CV-2 を解析することで新しい BMP のシグナル伝達の制御機構の解明を目的としている。

本研究では、まず、ショウジョウバエ *cv-2* と相同性の高いニワトリ CV-2 (*cCV-2*) を単離し、*cCV-2* タンパク質はショウジョウバエ CV-2 とほぼ同じドメイン構造をしていることを示した。次に、ウェスタンブロット法により、*cCV-2* タンパク質は分泌タンパクであり、2つのドメインに切断され、さらに糖修飾も受けることを明らかにした。そして、培養細胞とニワトリ胚を用いた実験において、*cCV-2* は BMP 依存的に、BMP シグナルを増幅させることを示した。これらのことから、分泌された *cCV-2* が細胞外で作用し、BMP シグナルを増強することが示唆された。*cCV-2* は神経管の背側、心臓の心内膜クッション、指間部などで発現しており、マウス胚においても、*mCV-2* はニワトリ胚とほぼ同じ領域で発現をしていた。これらの組織では BMPs は CV-2 の発現している領域と重複または隣接する領域で発現していた。特に、指間部での発現は BMPs と相補的な発現をしているが、リン酸化 Smad1/5/8 抗体で免疫染色すると、CV-2 の発現と同じ領域が強く染色された。この領域は BMP シグナルによってアポトーシスが起こる領域であることが報告されている。本研究の結果から、脊椎動物 CV-2 は分泌タンパクであり、細胞外で BMP シグナルを制御することで、発生過程において効率的に BMP シグナルの伝達を行っていることが示唆された。

以上のように、本論文は脊椎動物における新しい BMP シグナルの制御機構の解明に重要な知見を加えるもので、学術上、応用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のあるものと認めた。