

Title	両生類胚へのmRNAの顕微注入法を活用したVent2-SKLとxR-Ras2の機能評価
Sub Title	
Author	佐藤, 友香
Publisher	慶應義塾大学湘南藤沢学会
Publication year	2013
Jtitle	生命と情報 No.20-2 (2013.) ,p.1- 13
JaLC DOI	
Abstract	<p>両生類胚へのmRNAの顕微注入は特定の遺伝子の発生現象に対する機能評価を迅速且つ正確に行える最良の手法の一つである。本研究室では、二量体形成型転写因子の核移行を阻害する手法として、C末端にペルオキシソーム移行シグナルであるSKL配列を追加することが考案されていたが、その十分な評価が行われていなかった。また、胚の収斂伸長運動(CE : convergent extension)に関わる遺伝子のスクリーニングにおいて、伸長に関わることを期待される遺伝子としてR-Ras2が得られていたが、その評価は行われていなかった。そこで私は、これらの評価研究に取り組むことにした。SKL配列付加の有効性については、原腸胚期の腹側領域において発現するVent2遺伝子を対象とした。まず、Vent2のC末端にSKLを付加したVent2-SKLをコードする遺伝子の全長を委託合成し、そこからSKL配列を取り除いたものも作成して、それぞれをmRNA合成に適したpCS2プラスミドにサブクローニングした。そして、そのmRNAを合成し顕微注入をしたところ、Vent2-SKLは本来のVentの働きを失っているだけでなく、微弱ながらも背側化させることが判明した。R-Ras2の機能評価については、予め作成されていたR-Ras2と dominant negative型となるR-Ras2のそれぞれをコードする遺伝子が含まれたプラスミドからmRNAを合成し、それぞれをツメガエル胚に顕微注入した。その結果、どちらの場合においても、胚の伸長に対して顕著な阻害を引き起こすことが確認された。以上の結果より、SKL付加による二量体転写因子の核移行阻害についてはその有効性が示唆された。そしてR-Ras2についてはCEに関わる新しい遺伝子であることが示されたと言える。</p>
Notes	慶應義塾大学湘南藤沢キャンパス先端生命科学研究会 2013年度学生論文集 卒業論文ダイジェスト
Genre	Technical Report
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KO92001004-00000020-0240

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the Keio Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

両生類胚へのmRNAの顕微注入法を活用した Vent2-SKLとxR-Ras2の機能評価

慶應義塾大学 環境情報学部4年

佐藤 友香

要旨

両生類胚へのmRNAの顕微注入は特定の遺伝子の発現現象に対する機能評価を迅速且つ正確に行える最良の手法の一つである。本研究室では、二量体形成型転写因子の核移行を阻害する手法として、C末端にペルオキシソーム移行シグナルであるSKL配列を追加することが考案されていたが、その十分な評価が行われていなかった。また、胚の収斂伸長運動(CE: convergent extension)に関わる遺伝子のスクリーニングにおいて、伸長に関わることが期待される遺伝子として*R-Ras2*が得られていたが、その評価は行われていなかった。そこで私は、これらの評価研究に取り組むことにした。

SKL配列付加の有効性については、原腸胚期の腹側領域において発現する*Vent2*遺伝子を対象とした。まず、*Vent2*のC末端にSKLを付加した*Vent2-SKL*をコードする遺伝子の全長を委託合成し、そこからSKL配列を取り除いたものも作成して、それぞれをmRNA合成に適したpCS2プラスミドにサブクローニングした。そして、そのmRNAを合成し顕微注入をしたところ、*Vent2-SKL*は本来の*Vent*の働きを失っているだけでなく、微弱ながらも背側化させることが判明した。

*R-Ras2*の機能評価については、予め作成されていた*R-Ras2*とdominant negative型となる*R-Ras2*のそれぞれをコードする遺伝子が含まれたプラスミドからmRNAを合成し、それぞれをツメガエル胚に顕微注入した。その結果、どちらの場合においても、胚の伸長に対して顕著な阻害を引き起こすことが確認された。

以上の結果より、SKL付加による二量体転写因子の核移行阻害についてはその有効性が示唆された、そして*R-Ras2*についてはCEに関わる新しい遺伝子であることが示されたと言える。

Keywords: SKL, *Vent*, 顕微注入, *R-Ras2*, convergent extension

第1章 序論

1.1. ツメガエル胚への顕微注入を用いた研究について

顕微注入とはガラスの針を用いて、生物の細胞の細胞質中や細胞核の中に直接物質を打ち込む技術である。この技術は生物学の世界では20世紀の前半から使われ始めていたという話もあるが、文献としての記録ではウニへの顕微注入が最も古いものになる(Hiramoto, 1962)。続けてマウス卵への顕微注入も行われている(Lin, 1966)。本格的に用いられるようになったのは1970年代になってからだ。そして1990年代になってからは飛躍的に生物研究において使用頻度が増加した。そのブレイクスルーとなった発見は*Wnt8* mRNAを用いたアフリカツメガエル胚における二次軸の誘導実験であろう(McMahon and Moon, 1989)。Wnt8は分泌タンパク質であり、受容体においてWnt8が受け取られると、細胞核への β -Cateninタンパク質の局在が生じる(Huber *et al.*, 1996)。これが引き金となって、背側化シグナルが活性化されることが、その後の研究において明らかにされている(De Robertis and Kuroda, 2004)。アフリカツメガエル胚は、発生速度が速く、取り扱いも容易であり、遺伝的知見も多いことから、初期発生のメカニズムを調べる上では、最も適した生物と言える。現在も、ツメガエル胚への顕微注入は盛んに行われており、本研究においても、顕微注入を活用して、次に述べる内容について調べていくことになる。

1.2. Vent2-SKLについて

本研究室では、タンパク質上に存在するアミノ酸配列であり、そのタンパク質の移動先を指定するものである、シグナル配列を応用することによって、胚に内在するタンパク質の挙動を変化させる手法の開発に取り組んでいる。既に成功しているものが、C末端に小胞体・ゴルジ体リテンションシグナル(小胞体とゴルジ体の間を行ったり来たりするシグナル)であるアミノ酸を追加する手法だ。具体的にはリシン(K)、アスパラギン酸(D)、グルタミン酸(E)、ロイシン(L)の4つのアミノ酸を、二量体形成をする分泌タンパク質のC末端に追加したKDEL付加型の人工タンパク質が、内在性の分泌タンパク質とヘテロ二量体を形成することによって、内在性タンパク質の細胞外への分泌量を大幅に抑えることの実現に成功している。例えば、中胚葉誘導分子であるタンパク質Xnrs (*Xenopus nodal related proteins*)には、Xnr1, Xnr2, Xnr4, Xnr5, そしてXnr6の5種類のタンパク質が存在する(Takahashi *et al.*, 2000)。さらにXnr5には同義遺伝子が複数個存在するため(Takahashi *et al.*, 2006)、その阻害は極めて困難であるとされている。しかし、Xnr5にKDEL配列を付加した人工タンパク質を加えてやることによって、これまで発生生物学において報告されたどの手法よりも効率よく中胚葉を阻害することが可能であることが示されている(Matsukawa *et al.*, 2012)。この技術は既に確立されていると言えるが、同様のアイデアは他の二量体タンパク質にも当てはめることが可能かもしれない。たとえば、ホメオボックスタンパク質などの二量体形成型転写因子がそれにあたる。本研究室では、二量体形成型転写因子のC末端領域にペルオキシソーム移行シグナルであるセリン(S)、リシン(K)、ロイシン(L)の3つのアミノ酸を追加するだけで、内在性のタンパク質とヘテロ二量体形成をして、核移行を阻害できるのではないかと考えている。幸い、両生類の初期発生においては、背側領域にも腹側領域にも、その運

命決定の中核を成すホメオボックス遺伝子がいくつか存在しており、今回のアイデアを評価する上では相応しい系と言える。最初に標的としたものは、背側に発現し、強い背側化能を有するホメオボックスタンパク質であるSiamoisである(Lemaire *et al.*, 1995; Ishibashi *et al.*, 2008)。そして、SiamoisにSKLを付加させたSiamois-SKLは、頭部構造の形成を微弱ながら阻害することが確認されている(伊東美波の卒業論文, 2011)。しかし、Siamois分子については、Siamoisのみをノックダウンした表現型においても大きな効果は得られておらず、SKL付加の効果を調べる上では、必ずしも最良の選択肢ではなかったと判断している。そこで、次に腹側領域において腹側化を引き起こす分子であるVent2に注目している(Onichtchouk *et al.*, 1996)。もし、Vent2の働きをSKL付加によって阻害することができたならば、明確な背側化の表現型が得られることが期待されるからだ。本研究において、私はVent2-SKLをデザインして、発現ベクターへのサブクローニングならびにSKL除去型のプラスミドの作成を行う。そこから得られたmRNAをツメガエル胚に顕微注入し、どのような表現型が得られるのかを調べていく。

1.3. R-Ras2について

脊椎動物の初期発生において、球体の卵を観察していく上で、素人の目でも明確に分かる最初の変化は、胚自体の伸長運動ではないだろうか。これは、中軸中胚葉や背側中胚葉の領域の細胞群が正中線領域に集まってきて、その物理的スペースの限界と細胞の機械的な変化によって、前後方向に急速に伸びる領域が現れる現象である。この現象は、収斂伸長運動という日本語の名称が存在するが余り一般的ではなく、殆どの科学者はコンバージェント・エクステンション(以下CE: convergent extension)という名称を用いている。本研究室では、この脊椎動物などのダイナミックなボディプランの原動力となるCEについて、その引き金となる遺伝子を探索している。そのためには良いスクリーニングの系が必要であることは言うまでもない。最も参考となる培養系は前方中軸中胚葉と後方中軸中胚葉を混ぜた際に生じる伸長現象ではないだろうか(Ninomiya *et al.*, 2004)。アフリカツメガエルの予定外胚葉領域であるアニマルキャップ(AC)細胞をカルシウムイオンとマグネシウムイオンが存在しない条件下で解離し、中胚葉誘導物質であるアクチビンで処理すると濃度によって前方中軸中胚葉と後方中軸中胚葉を独立して誘導することが可能である(Green *et al.*, 1997)。それぞれ単独では伸長することができないが、両者を接着させた状態で培養すると接着している領域が伸長するのだ(Ninomiya *et al.*, 2004)。つまり、単独培養と接着培養のそれぞれに発現する遺伝子を比較すれば、CEを引き起こす原因遺伝子を得ることが可能かもしれない。このスクリーニングは既に行っており、いくつかの候補遺伝子が得られている。その中でも特にR-Ras2 (TC21とも呼ばれる)という遺伝子に注目している(Graham *et al.*, 1994)。これは伸長条件(接着培養)において単独培養時の約10倍の発現比を示しており、且つ細胞の増殖や成長に関わっている可能性が高いからだ。ガン化した組織で発現量が高いという報告もある(Clark *et al.*, 1996; Gutierrez-Erlandsson *et al.*, 2013)。本研究室では、既にツメガエルにおけるR-Ras2 (xR-Ras2)のクローニングならびにその活性に必要なSwitch-1領域を取り除いたdominant negative型のxR-Ras2 (以下, xR-Ras2-ΔSW1)の作成も終わっている。しかし、これらの機能評価は成され

ていなかった。本研究において、私はこれらからmRNAを合成し、ツメガエル胚に顕微注入する。そして、実際にxR-Ras2がツメガエルの伸長運動を調節することができることを紹介する。

第2章 実験の手法

2.1. mRNAの合成

mRNA合成はいずれの場合もpCS2プラスミドに目的のDNA断片が挿入されているものに対して行った。pCS2プラスミド約5 µg分を制限酵素NotIが30 U存在する状態で100 µLスケールにてovernight処理して一本鎖化し、カラムを用いて精製させ、最終的に15 µLの水に溶解した。その内の6 µLをmRNA合成に用い、SP6 mMessage mMachine Kit (#AM1340, Ambion)を用いて合成反応を行った。反応時間は37 °Cにおいて2時間、DNase処理は37 °Cにおいて15分、精製はフェノール・クロロホルム処理にて行った。合成反応の詳細についてはAmbion社のプロトコルを参照。合成されたRNAは20 µLの水にDNase-RNase-freeの水に溶解させてから、濃度測定をし、最終的に500 ng/mLの濃度になるように分注したaliquotを作成した。

2.2. R-Ras2のアミノ酸配列の相同性比較の系統樹作成

多くの種におけるR-Ras2のアミノ酸情報の中から、脊椎動物のR-Ras2のアミノ酸比較はMicrosoft Word上で目視にて行った。動物門を越えたR-Ras2の系統樹作成には、Rasドメインを用いた。xR-Ras2においては11番目のアルギニン(R)から172番目のリシン(K)までのRasドメイン領域を対象とした。CLUSTALWサイト(<http://www.genome.jp/tools/clustalw>)において相同性比較を行い、alnファイルを作成した。Jalview (Download: http://www.jalview.org/Web_Installers/install.htm)を系統樹作成ソフトとして用いた。FileタグからAdd Sequence>From Fileにて作成したclustalw.alnファイルを指定し、CalculateタグからCalculate Tree>Average Distance Using %identityを選んだ。

2.3. Vent2-SKLのpUC57からpCS2プラスミドへのサブクローニングならびにSKL配列の除去

全1034塩基対から成るVent2-SKL配列の合成をGeneScript社に委託したところ、pUC57プラスミドのマルチクローニングサイトに挿入された状態で届いた。そこで、届いたpUC57-Vent2-SKLをEcoRIとXhoIにて切断し、長さが約1000 bpとなるDNA断片を回収した。pCS2プラスミドをEcoRIとXhoIで切断し、酵素Antarctic Phosphatase (#M0289L, NEB)にてアルカリフォスファターゼ処理をした。それらをTaKaRa Ligation Kit Ver. 2 (#6022, TaKaRa)を用いてつなぎあわせた。pCS2-Vent2-SKLに対して、KOD plus NEO DNAポリメラーゼ(#KOD-401, 東洋紡)を用いてプラスミド全体を増幅するPCRを行った。平滑末端部位にATPを用いてリン酸を付加させた後に、TaKaRa Ligation Kit Ver. 2 (#6022, TaKaRa)を用いてSelf-ligationさせた。増幅に用いたプライマーの配列は以下の通り。下線部分は終止コドンを表す。FW-primer: 5'-TAGCTCGAGCCTCTAGAACTATAG-3'。RV-primer: 5'-ATAGGCCAGAGGTTGCCCAAG-3'。

第3章 結果と議論

3.1.1. pCS2-Vent2-SKLとpCS2-Vent2の作成

二量体形成型転写因子の核移行を阻害するために、我々はSKLをC末端に付加させた人工タンパク質を用いることを考えている。SKLの持つペルオキシソーム移行能がヘテロ二量体化の標的となった内在性の転写因子の核移行を阻害することになるからだ。それ故、第一に行わなくてはならないことは、内在性のタンパク質と同じアミノ酸配列を持つタンパク質のC末端にSKL配列を付加させることになる。通常、このような実験を行う際には、内在性タンパク質のアミノ酸領域をコードした遺伝子配列をPCRによって生体から分離し、後からSKL配列を付加させるのが常套手段である。しかし、今回は、非常に時間が限られていたこと、且つVent2のORFが1000塩基対に満たない比較的小さなものであったことを考慮して、業者に直接Vent2にSKLが付加された遺伝子の合成を依頼した。業者から届いた合成遺伝子はmRNA合成に用いることができないプラスミドpUC57の中に挿入されていた。そこで、mRNAの合成に適したプラスミドpCS2にサブクローニングし、念のため、塩基配列を解読した。その結果、目的の配列がpCS2内に保存されていることが確認できた。これをpCS2-Vent2-SKLと呼ぶ。次に、比較実験に用いる内在性のVent2のタンパク質をコードした遺伝子を含むものの作成に取り組んだ。これはpCS2-Vent2-SKLに対して、SKL配列が含まれないようにプラスミド全体をPCRによって増幅させて、環状化させた。これを解読したところ、確かにSKL配列が抜けた内在性のVent2と同じ配列をもつプラスミドが形成されていることが分かった。これをpCS2-Vent2と呼ぶ。続いて、今回作成したpCS2-Vent2-SKLとpCS2-Vent2を鋳型にしてSP6 RNAポリメラーゼを用いてmRNAを合成した。これにより、二量体を形成して核に移行する転写因子で、腹側化を引き起こす主要な因子でもあるVent2の機能をVent2-SKLを用いて阻害することができるか否かを評価する準備が整った。

3.1.2. Vent2-SKLはVent2としての機能を失っている(背側への顕微注入)

ツメガエルにおいては、Vent1, 2が報告されており、どちらも腹側に発現し、腹側化に関わる因子である(Onichtchiuk *et al.*, 1998)。Ventが減少すると胚が背側化することもわかっており、逆にVentが強く誘発されると、背側化を引き起こす転写因子であるGoosecoidの欠乏が生じ、それが原因となって頭部構造が欠損することが報告されている(Sander *et al.*, 2007)。

まず、Vent2-SKLが本来のVent2が持つ働きを失っていることを示すことが必要である。そこで、私はVent2-SKLは背側への強制発現において、Vent2として機能せず頭部欠損を誘導しないことを確かめるため、内在性のVent2 mRNAが発現しない4細胞期背側の2割球にVent2またはVent2-SKL mRNAを顕微注入し、表現型の観察による機能解析を行った(図1A)。その結果、Vent2のmRNAを注入した胚は濃度依存的に頭部欠損が起きることが確認された(図1A, C-E)。これは、本来Vent2の発現しない背側に強制発現させることで、胚が腹側化し、頭部欠損が誘導された結果と言える。一方、Vent2-SKLのmRNAを注入した胚では、いずれもコントロール胚(図1A)と同

様の表現型が得られた(図1F-H). これらの結果から, 少なくともVent2-SKLはVent2としての機能を有していないということが明らかになった.

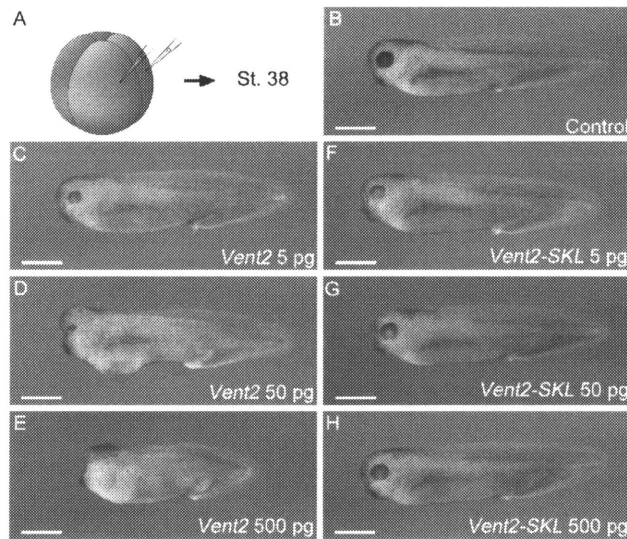


図1 *Vent2-SKL* mRNAは本来の腹側化効果を示さない

(A) 表現型観察に用いた顕微注入位置. 4細胞期の背側の2割球にmRNAを注入し, St. 38まで培養した. (B-H) St. 38まで培養した胚. (B) C-Hに対するコントロール胚. (C-H) *Vent2*もしくは*Vent2-SKL*のmRNAを注入した胚. 注入量は図中に示した. 腹側化の表現型が現れた割合は, (C) 12/17, (D) 16/18, (E) 19/19, そして, (F) 2/15, (G) 0/21, (H) 4/17であった. なお, スケールバーの長さは1 mmである.

3.1.3. *Vent2-SKL*は微弱な背側誘導能を有している(腹側への顕微注入)

次に私は*Vent2*が発現する8細胞期腹側植物極側の1割球に*Vent2*と*Vent2-SKL* mRNAの顕微注入を行い, *Vent2-SKL*の機能を評価する実験に取り組むことにした(図2A). まず, *Vent2* mRNAを注入した胚では, いずれもコントロール胚(図2B)と同様の表現型が観察された(図2C-E). これは腹側領域には大量の*Vent2*の発現が認められているので, そこに追加で*Vent2*が加わったとしても, 有効な量差を生じる状態ではなかったためと思われる. 一方, *Vent2-SKL*のmRNAを腹側に注入した胚では, 5 pgでは全く効果は得られなかったが(図2F), 50 pg, 500 pg注入した胚では, St. 38においてコントロール胚に比べやや背側化した胚が観察された(図2G, H). これは, 背側化という意味では, 決して強い効果ではなかったが, 本来は腹側化させるタンパク質が, C末端にたった3個のアミノ酸配列を付加しただけで, これまでの働きを少なくともゼロ以下の状態にしたことを意味している. 非常に将来性のある結果と言えるのではないだろうか.

しかし, *Vent2*にSKLを付加した場合に, なぜ, 強力な背側化能まで導くことができなかったかについては, 議論しておきたい. 同じ事は既に背側化させるホメオボックス遺伝子である*Siamois*に対して行われた予備研究においても報告されている(伊東美波の卒業論文, 2011). SKLの付加が機能阻害という面では強い効果を持つものではなかった理由としてまず第一に挙げられるのは, SKLを付加したことによって, 二量体形成自体が阻害された可能性である. SKLの付加がタンパク質全体の立体構造にどれほどの影響を与えるかは定かではないが, 特定のタンパク質にエピトープタグを付加させた際に機能を欠失することもあるので, 十分に考えられるだろう. また, SKLによるペルオキシソーム移行が合成直後に迅速に行われて, 二量体形成のタイミングに間に合わない場合も同じことが生じると言えるであろう. 第二の可能性として, 核移行シグナル(NLS: nuclear localization signal)との競争が生じている点が挙げられる. KDEL付加の際には,

小胞体に入った後の分子がKDEL以外にその行き先を指定されるような要素は何ひとつなかったわけであるが、SKL付加されたホメオボックスタンパク質には依然としてNLSがタンパク質内に存在している状態になっている。つまり、同一分子内に、核行きのラベルとペルオキシソーム行きのラベルが共存する関係にあると言える。少なくとも核行きのラベルが優先的に働いたとすれば、背側に注入した胚において腹側化が認められたはずである。しかし、実際には一切認められなかった(図2)。それ故、NLSよりSKLの方が優先的に働いたのではないかと信じたいところである。

いずれにせよ、SKLの付加の有効性については、未だいくつかのホメオボックス遺伝子を調べた価値があると言えるであろう。第一の候補は、背側において、背側化を誘導する遺伝子である *Gooseoid* である(Cho *et al.*, 1991)。また、腹側において腹側化を誘導する *Msx* (Maeda *et al.*, 1997) も有効な対象ではないだろうか。また、内胚葉領域には、内胚葉化に必要なホメオボックス遺伝子として、*Mix* (Rosa 1989), *Mixer* (Henry and Melton, 1998), *Milk* (Ecochard *et al.*, 1998), そして *Sox17 α* (Hudson *et al.*, 1997) などが存在する。また、前方内胚葉領域に発現しており、心臓形成などに重要な役割を持つ *Nkx2.5* (Cleaver *et al.*, 1996) も対象にすると面白いかもしれない。さらに、肝臓原基において発現し、肝臓形成のマスター遺伝子的な役割をもつ *Hex* (Newman *et al.*, 1997) も非常に魅力的な対象と言えるであろう。そして、もちろん *Vent1* (Sander *et al.*, 2007) についてもSKL付加を行う必要があるだろう。我々は *Vent1* が *Vent2* と全く同じ表現型を誘導すること、そして、同じ発現領域に存在しており、上流となる遺伝子も同じ事から、*Vent2* が *Vent1* とヘテロ二量体を形成するであろうという背景の上で、研究を進めているが、実際に *Vent1-Vent1*, *Vent1-Vent2*, そして *Vent2-Vent2* のそれぞれのアフィニティを調べた研究は存在しない。全く違うものである可能性も十分に考えられる。*Vent1* と *Vent2* のアミノ酸数はそれぞれ264個と328個であり、かなり違いがある。57アミノ酸から成るホメオボックス領域だけを比較しても、両者の Identities は75.4% (43/57), Positives は47/57 (82.5%) と決して高い値とは言えない。それ故、*Vent2-SKL* が *Vent1* とヘテロ二量体を形成する可能性は低いかもしれない。*Vent1-SKL* と *Vent2-SKL* の共注入は今後、真っ先に行うべき発展的研究と言えるだろう。

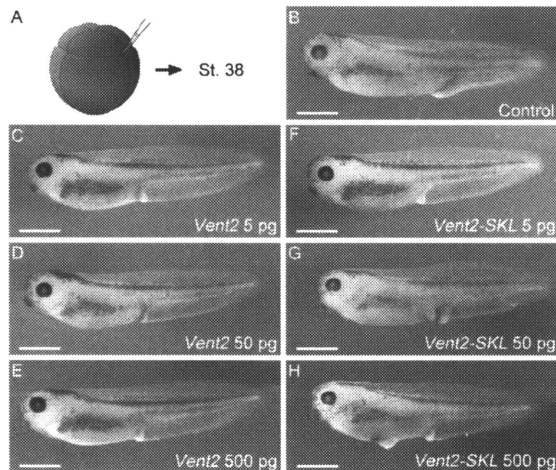


図2 *Vent2-SKL* mRNAの腹側への顕微注入は微弱ながら背側構造を誘導する
(A) 表現型観察に用いた顕微注入位置。8細胞期腹側植物極側の1割球にmRNAを注入した。(B-H) St. 38まで培養した胚。(B) C-Hに対するコントロール胚。(C-H) mRNAを注入した胚。*Vent2*もしくは *Vent2-SKL* をコードしたmRNAを注入した。注入量は図中に示した。何らかの背側化を示す表現型が現れた割合は、(C) 0/26, (D) 0/28, (E) 0/27, (F) 0/29, (G) 14/25, (H) 16/28であった。なお、スケールバーの長さは1 mmである。

3.2.1. xR-Ras2とxR-Ras2-ΔSW1の配列

xR-Ras2は199個のアミノ酸から成る、比較的小さめのタンパク質であるが、分子内にはRasサブファミリーに特有のドメインが多く存在している。これらのうちのSwitch 1 regionはxR-Ras2が不活性型から活性型へ切り替えをする時のスイッチ機能を果たすことで知られている。つまり、Rasタンパク質にSosが結合するとRasのヌクレオチド結合サイトが開き、結果としてSwitch 1 regionの構造が変化し、GTPが結合しやすくなる。また、Rasタンパク質にはSwitch 1 regionと同様にSwitch 2 regionが存在する。RasとSosの複合体の時にSwitch 2 regionはSwitch 1 regionより強く結合することが知られているが、コンフォメーションが安定しないことが多いと考えられている(Boriack-Sjodin *et al.*, 1998; Ma *et al.*, 2008)。そこで、本研究ではxR-Ras2に加えて、それをGTP型からGDP型に変換させるのに最も重要であると考えられるSwitch 1 regionを欠損させたdominant negative xR-Ras2 mRNAも準備し、それらを顕微注入して機能評価を行うことにした。

3.2.2. xR-Ras2とその他の脊椎動物におけるR-Ras2との相同性

Rasスーパーファミリーは真核生物に広く存在する遺伝子群であるため、R-Ras2についても節足動物から脊椎動物に至るまで多くの動物においてその存在が確認されている。異種間の相同性を知ることは、機能ドメインの確認はもちろん、その遺伝子が有する重要性の確認にもつながる。そこで、私は各動物間におけるR-Ras2の相同性を比較することにした。まず、脊椎動物だけに限定し、そのアミノ酸配列を比較してみた(図3A)。アフリカツメガエルのR-Ras2 (xR-Ras2)とマウスのR-Ras2のアミノ酸配列を比較すると、Identitiesが187/195 (95.9%)、Positivesが192/195 (98.5%)であった。Identitiesは同一のアミノ酸の割合であり、Positivesは同様の性質を示すアミノ酸(例: グルタミン酸とアスパラギン酸など)も含めた割合のことを示している。同様に、ニワトリのR-Ras2と比較すると、Identitiesが185/195 (94.9%)、Positivesが191/195 (97.9%)、ゼブラフィッシュのR-Ras2と比較すると、Identitiesが184/195 (94.4%)、Positivesが188/195 (96.4%)、ヒトのR-Ras2と比較すると、Identitiesが187/195 (95.9%)、Positivesが192/195 (98.5%)、アリゲーターのR-Ras2と比較すると、Identitiesが183/192 (95.3%)、Positivesが189/192 (98.4%)、サメのR-Ras2と比較すると、Identitiesが178/195 (91.3%)、Positivesが188/195 (96.4%)であった。これらの生物間の全アミノ酸配列の比較表は図3Aに示す。

次に、動物門を越えたR-Ras2の相同性の比較を行うことにした。その際には、全長で比較するよりも、重要なドメインであるRasドメイン領域のみを対象にした方が生物間の差を測る上で適切であると考え、xR-Ras2の11番目のアルギニン(R)から172番目のリシン(K)までのRasドメイン領域を対象とした相同性調査を行った。その結果、哺乳類とキイロシヨウジョウバエのR-Ras2のRasドメインの相同性が哺乳類と同じ脊索動物門のカタユレイボヤのR-Ras2よりも近い位置に来るという不思議な結果が得られたが、それ以外については、分類学上で用いられる系統樹とほぼ同じ方向性のものが描かれた(図3B)。

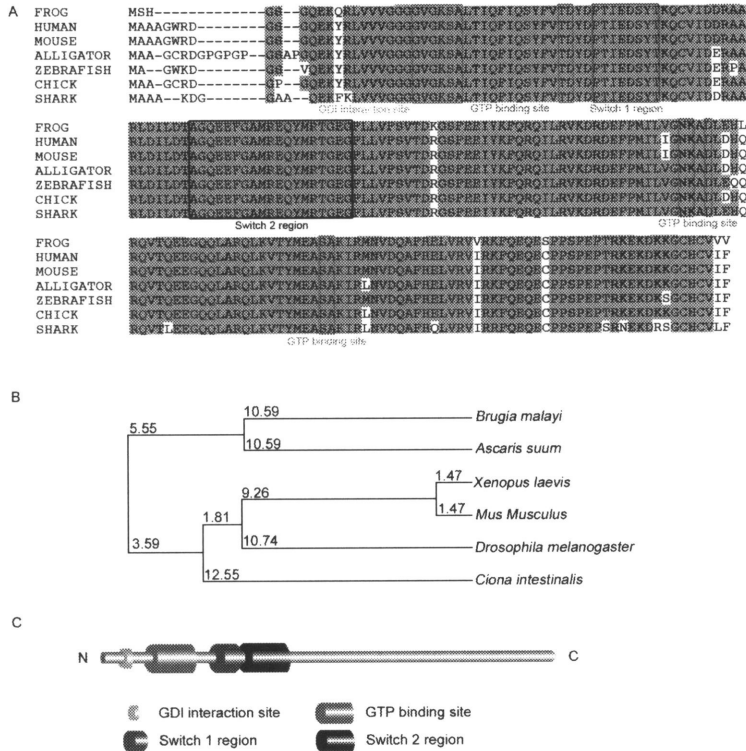


図3 アミノ酸レベルにおける R-Ras2の相同性比較

(A) 脊椎動物の持つR-Ras2のアミノ酸配列の比較。ツメガエルのxR-Ras2と同じアミノ酸をもつ場合を青で示した。上から順に、FROG: *Xenopus laevis*, HUMAN: *Homo Sapiens*, MOUSE: *Mus musculus*, ALLIGATOR: *Alligator mississippiensis*, ZEBRAFISH: *Danio rerio*, CHICK: *Gallus gallus domesticus*, そしてSHARK: *Callorhynchus milii*を表す。(B)

R-Ras2のRasドメインを比較した分子系統樹。 *Brugia malayi*はフィラリア(線形動物門), *Ascaris suum*はブタ回虫(線形動物門), *Mus Musculus*はハツカネズミ(脊椎動物門哺乳綱), *Xenopus laevis*はアフリカツメガエル(脊椎動物門両生類綱), *Drosophila melanogaster*はキイロシヨウジョウバエ(節足動物門), *Clona intestinalis*はカタユレイボヤ(脊索動物門)。(C) xR-Ras2タンパク質の構造図。N末端側からGDI interaction site, GTP binding site, Switch 1 region, そしてSwitch 2 regionが存在する。

3.2.3. xR-Ras2は胚の伸長に関わっている

xR-Ras2はCEが生じる条件において高い発現が確認されている分子であるため、胚全体に作用させることによって、伸長運動に何らかの影響が生じることが期待される。そこで、私はxR-Ras2, xR-Ras2- Δ SW1それぞれのmRNAを作成し、2細胞期の胚の両割球の動物極側に顕微注入した(図4A)。

まず、xR-Ras2のmRNAを顕微注入した場合、注入した濃度に対して依存的に胚の伸長が阻害されることが確認された(図4B-E)。コントロール胚の頭部先端から尾部の後端までの長さ(体長)が約5 mmであるのに対して(図4B), xR-Ras2 mRNAを400 pg顕微注入した胚では平均3.5 mm程度の長さまで短縮していることが判明した。これは胚の中で生じている伸長現象が有意に阻害されたと考えることができるであろう。次にdominant negative型となるxR-Ras2- Δ SW1 mRNAを顕微注入した場合、xR-Ras2 mRNAの時と同じく濃度依存的な伸長の阻害が確認された。特に200 pgの場合にはその阻害は顕著なものであり、平均の体長は3 mm程度であった。また、xR-Ras2 mRNAの時とは異なり、xR-Ras2- Δ SW1 mRNAの場合では、腹部における水疱構造が形成されるなどの追加的な影響も確認された。尚、どちらの場合も、さらに濃度を増加させた場合には、胚発生の初期段階において重篤な影響が現れ、特に原腸陥入を完了することができずに死亡したものが多く見られた。これは、CEに関わる遺伝子の過剰な発現時には非常によく現れる特徴でもある。

以上の内容から、xR-Ras2はCEに強く関わっている分子であると言えることができるであろう。実は、これらの胚の内部構造がどうなっているのかについて、組織切片の作成を行っている。技術的に未熟なため、美しい切片がつかれずに掲載は叶わなかったが、少なくとも伸長が阻害された胚では脊索領域が肥大していることが判明した。つまり、中軸中胚葉は集合はしているが、伸長能力を失っていると考えられるであろう。

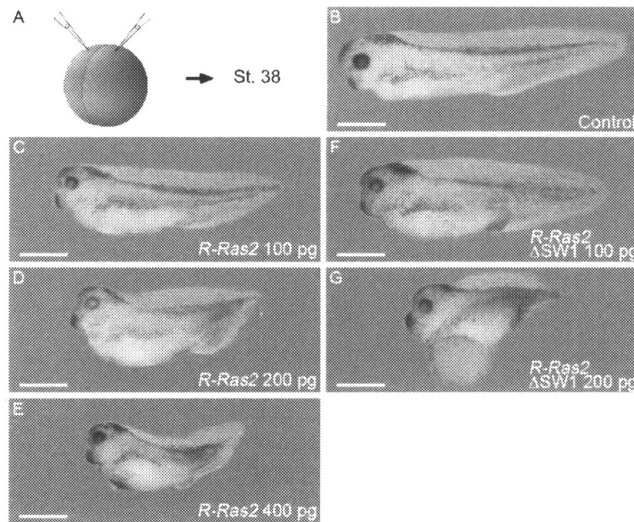


図4 xR-Ras2は胚の伸長を阻害する
 (A) 表現型観察に用いた顕微注入位置. 2細胞期の2割球にmRNAを注入した. (B) C-Gのコントロール胚. (C) *xR-Ras2* mRNAを100 pg顕微注入した胚. 一部の胚で体長が短くなった(33/73). (D) *xR-Ras2* mRNAを200 pg顕微注入した胚. ほぼ全ての胚で体長の短縮が観察された(52/68). (E) *xR-Ras2* mRNAを400 pg顕微注入した胚. ほぼ全ての胚で体長の短縮が観察された(57/59). その短縮度合は200 pg顕微注入した場合よりも強かった. (F) *xR-Ras2-ΔSW1* mRNAを100 pg顕微注入した胚. 一部の胚で体長が短くなった(23/68). (G) *xR-Ras2-ΔSW1* mRNAを200 pg顕微注入した胚. ほとんどの胚で体長が短くなり、また一部の胚で腹部が膨らんだ表現型が多く見られた(29/41). なお、スケールバーの長さは1 mmである.

第4章 結論

今回の研究において、私はアフリカツメガエル胚へのmRNAの顕微注入法を用いて、Vent2-SKLとxR-Ras2の機能評価を行った。そして、それぞれにおいて、その活性がどのようなものであるのかについて、一定の評価ができたと考えている。具体的には以下に述べていく。

Vent2-SKLについては、KDEL配列を用いた二量体形成型分泌タンパク質に対して確認されたような劇的な効果(Matsukawa *et al.*, 2012)を得ることはできなかった。しかし、3つのアミノ酸を加えるだけで、Vent2はその機能を完全に失い、微弱ながら本来のVent2の持つ活性と逆の方向の活性が確認できたことは、特筆すべき点だと言えるだろう。今後、他の分子を対象として、調べていく価値は十分に残されていると考えられる。Ventという分子については、昨今の幹細胞テクノロジーの観点からも、非常に価値のある研究対象であったのではないかと考えている。分化万能性を持つ細胞であるiPS細胞やES細胞において、それらの未分化維持に必要不可欠な分子としてNanogが挙げられる。実は、ツメガエルにおいてはNanogにあたる遺伝子の存在は確認されおらず、最も高い相同性を示す遺伝子がVent1/2にあたる。ゼブラフィッシュのNanogとツメガエルのVent1/2が同義の働きを有することも報告されており(Schuff *et al.*, 2012)、ツメガエルのVentはNanogであるという理解が広がりつつある。Ventは腹側化因子であると認識されていたが、実は未分化能を保つことによって、劇的な運命変化と言える背側化に抵抗していると考えられる。それ故に、Ventの場合のSKLの付加は、未分化化を阻害したという可能性も考慮に入れ

ておく必要があるだろう。同時に、今回作成したVent2-SKLについても今後の分化万能性の研究に応用していくことが可能であろう。

xR-Ras2については、本来の配列をもつものと、**dominant negative**型となるxR-Ras2-ΔSW1との両方の場合において、伸長が阻害される表現型が確認された。一見、プラスの方向性に働くものとマイナスの方向性に働くものが同じ表現型を導くということについて、非常に不可解な印象を受けるものである。しかし、これはCEに関わるとされる分子の多くにおいて確認される現象である(Wallingford *et al.*, 2001)。さらにxR-Ras2-ΔSW1の表現型の方がxR-Ras2の表現型よりも伸長阻害度は大きく、かつ腹部に水疱が生じるなどの追加の影響も確認された。これは伸長について関わっているだけでなく、両者が異なる性質を持つことを示していると言えるであろう。今後はよりピンポイントに伸長現象に関わっているか否かを調べる必要があるが、実は同研究室内で平行して行われている研究の中で、ツメガエルのAC細胞に対して中胚葉誘導物質であるアクチビンが引き起こす伸長運動をxR-Ras2が阻害することが判明している。xR-Ras2がCEに関わる原因物質である可能性は極めて高いと言えるだろう。

謝辞

私にとって大学4年間は、とても密度が濃く、様々な経験が得られるものでした。たくさんの方々に支えられて、ここまで来ることができたと思います。その感謝の念を、ここで述べさせていただきます。まず、本研究を進めるにあたり、4年秋学期からアドバイザーを引き受けて下さった黒田裕樹准教授には大変お世話になりました。大学4年秋にケロラボで卒業プロジェクトを一から始めさせて頂きたいという無理なお願いにも関わらず、全ての時間を研究に捧げるという条件のもとで快く引き受けて下さいました。卒業論文の作成には朝から夜まで全面的に面倒を見て下さり、研究面だけでなく様々な面でも助けて頂きました。私は黒田先生のごことが大好きです。ケロラボの皆さんには、研究でも私生活でも大変お世話になりました。特に、古川知世さんには、実験を一から丁寧に教えて頂き、あらゆることでサポートして頂きました。始めはカエルを触ることすらできなかった私ですが、温かい目で見守って下さり、カエルの卵の産ませ方やホルモン注射、胚へのインジェクション方法など、いつも付き添って親身になって教えて頂きました。古川さんなしでは実験結果を出すことができなかったと思います。また、大畑佳久さんには、実験が失敗した時の原因究明に毎回アドバイスをして下さいるとともに、実験室の場を和ませて頂きました。久保友理恵さん、渋谷真梨奈さん、森本健太さん、辛承宰さん、藤川昂さん、国武岳さんは同じケロラボのメンバーとして、女子スイーツ会やハロウィンパーティー、鍋パーティーやクリスマス忘年会など、たくさんの方々の行事を皆で一緒にお祝いし、とても楽しい大学生活を送ることができました。最初は人見知りの私でしたので、ケロラボの皆が私に気さくに話しかけてくれたことや、一緒に学食に行ってくれたことは、本当に嬉しかったです。そして、自分のやりたいことに対して温かく見守ってくれた家族に心から感謝しております。最後になりますが、このような素晴らしい環境を与えて下さり、4年に上がる前に自分の理解能力がなさすぎて富田研究室を辞めるか続けるか真剣に悩んでいた私に、「挫折は人生、誰にだってある。周りの視線は気にせず、次の

学期で見返してやるという意気込みでいけばいい。」と学生一人に対しても大切にすることをかけて下さった富田勝教授に心より感謝申し上げます。本当にありがとうございました。

参考文献

- Boriack-Sjodin, P. A., Margarit, S. M., Bar, Sagi, D., Kuriyan, J. (1998) The structural basis of the activation of Ras by Sos. *Nature*, **394**, p.337-43.
- Cho, K. W., Blumberg, B., Steinbeisser, H., De, Robertis, E. M. (1991) Molecular nature of Spemann's organizer: the role of the *Xenopus* homeobox gene goosecoid. *Cell*, **67**, p.1111-1120.
- Clark, G. J., Kinch, M. S., Gilmer, T. M., Burridge, K., Der, C. J. (1996) Overexpression of the Ras-related TC21/R-Ras2 protein may contribute to the development of human breast cancers. *Oncogene*, **12**, p.169-176.
- Cleaver, O. B., Patterson, K. D., Krieg, P. A. Land, H. R. (1996) Overexpression of the tinman-related genes XNkx-2.5 and XNkx-2.3 in *Xenopus* embryos results in myocardial hyperplasia. *Development*, **122**, p.3549-3556.
- De Robertis, E. M., Kuroda, H. (2004) Dorsal-ventral patterning and neural induction in *Xenopus* embryos. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **20**, p.285-308.
- Ecochard, V., Cayrol, C., Rey, S., Foulquier, F., Caillol, D., Lemaire, P., Duprat, A. M. (1998) A novel *Xenopus* mix-like gene milk involved in the control of the endomesodermal fates. *Development*, **125**, p.2577-2585.
- Graham, S. M., Cox, A. D., Drivas, G., Rush, M. G., D'Eustachio, P., Der, C. J. (1994) Aberrant function of the Ras-related protein TC21/R-Ras2 triggers malignant transformation. *Mol. Cell Biol.*, **14**, p.4108-4115.
- Green, J. B., Cook, T. L., Smith, J. C., Grainger, R. M. (1997) Anteroposterior neural tissue specification by activin-induced mesoderm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** p.8596-8601.
- Gutierrez-Erlandsson, S., Herrero-Vidal, P., Fernandez-Alfara, M., Hernandez-Garcia, S., Gonzalo-Flores, S., Mudarra-Rubio, A., Fresno, M., Cubelos, B. (2013) R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. *Mol. Cancer*, **12**, p.127.
- Henry, G. L., Melton, D. A. (1998) Mixer, a homeobox gene required for endoderm development. *Science*, **281**, p.91-96.
- Hiramoto, Y. (1962) An analysis of the mechanism of fertilation by means of enucleation of sea urchin eggs. *Exp. Cell Res.*, **28**, p.323-334.
- Huber, O., Korn, R., McLaughlin, J., Ohsugi, M., Herrmann, B. G., Kemler, R. (1996) Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech. Dev.*, **59**, p.3-10.
- Hudson, C., Clements, D., Friday, R. V., Stott, D., Woodland, H. R. (1997) Xsox17alpha and -beta mediate endoderm formation in *Xenopus*. *Cell*, **91**, p.397-405.
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hanafusa, H., Matsumoto, K., De Robertis, E. M., Kuroda, H. Expression of Siamois and Twin in the blastula Chordin/Noggin signaling center is required for brain formation in *Xenopus laevis* embryos. (2008) *Mech. Dev.*, **125**, p.58-66.
- Lamonica, K., Grabel, L. (2012) The planar cell polarity pathway and parietal endoderm cell migration. *Methods Mol. Biol.*, **839**, p.187-200.

- Lemaire, P., Garrett, N., Gurdon, J. B. (1995) Expression cloning of Siamois, a *Xenopus* homeobox gene expressed in dorsal-vegetal cells of blastulae and able to induce a complete secondary axis. *Cell*, **81**, p.85-94.
- Lin, T. P. (1966) Microinjection of mouse eggs. *Science*, **151**, p.333-337.
- Ma, D., Bai, X., Guo, S., Jiang, Y. (2008) The switch I region of Rheb is critical for its interaction with FKBP38. *J. Biol. Chem.*, **283**, p.25963-25970.
- Maeda, R., Kobayashi, A., Sekine, R., Lin, J. J., Kung, H., Maeno, M. (1997) Xmsx-1 modifies mesodermal tissue pattern along dorsoventral axis in *Xenopus laevis* embryo. *Development*, **124**, p.2553-2560.
- Matsukawa, S., Moriyama, Y., Hayata, T., Sasaki, H., Ito, Y., Asashima, M., Kuroda, H. (2012) KDEL tagging: a method for generating dominant-negative inhibitors of the secretion of TGF-beta superfamily proteins. *Int. J. Dev. Biol.*, **56**, p.351-356.
- McMahon, A. P., Moon, R. T. (1989) Ectopic expression of the proto-oncogene int-1 in *Xenopus* embryos leads to duplication of the embryonic axis. *Cell*, **58**, p.1075-1084.
- Newman, C. S., Chia, F., Krieg, P. A. (1997) The XHex homeobox gene is expressed during development of the vascular endothelium: overexpression leads to an increase in vascular endothelial cell number. *Mech. Dev.*, **66**, p.83-93.
- Ninomiya, H., Elinson, R. P., Winklbauer, R. (2004) Antero-posterior tissue polarity links mesoderm convergent extension to axial patterning. *Nature*, **430**, p.364-367.
- Onichtchouk, D., Gawantka, V., Dosch, R., Delius, H., Hirschfeld, K., Blumenstock, C., Niehrs, C. (1996) The Xvent-2 homeobox gene is part of the BMP-4 signalling pathway controlling [correction of controlling] dorsoventral patterning of *Xenopus* mesoderm. *Development*, **122**, p.3045-3053.
- Onichtchouk, D., Glinka, A., Niehrs, C. (1998) Requirement for Xvent-1 and Xvent-2 gene function in dorsoventral patterning of *Xenopus* mesoderm. *Development*, **125**, p.1447-1456.
- Reuther, G. W., Der, C. J. (2000) The Ras branch of small GTPases: Ras family members don't fall far from the tree. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, p.157-165.
- Rosa, F. M. (1989) Mix.1, a homeobox mRNA inducible by mesoderm inducers, is expressed mostly in the presumptive endodermal cells of *Xenopus* embryos. *Cell*, **57**, p.965-974.
- Sander, V., Reversade, B., De, Robertis, E. M. (2007) The opposing homeobox genes Goosecoid and Vent1/2 self-regulate *Xenopus* patterning. *EMBO J.*, **26**, p.2955-2965.
- Schuff, M., Siegel, D., Philipp, M., Bundschu, K., Heymann, N., Donow, C., Knöchel, W. (2012) Characterization of *Danio rerio* Nanog and functional comparison to *Xenopus* Vents. *Stem Cells Dev.*, **21**, p.1225-1238.
- Takahashi, S., Onuma, Y., Yokota, C., Westmoreland, J. J., Asashima, M., Wright, C. V. (2006) Nodal-related gene Xnr5 is amplified in the *Xenopus* genome. *Genesis*, **44**, p.309-321.
- Takahashi, S., Yokota, C., Takano, K., Tanegashima K, Onuma Y, Goto J, Asashima M. (2000) Two novel nodal-related genes initiate early inductive events in *Xenopus* Nieuwkoop center. *Development*, **127**, p.5319-5329.
- Wallingford, J. B., Vogeli, K. M., Harland, R. M. (2001) Regulation of convergent extension in *Xenopus* by Wnt5a and Frizzled-8 is independent of the canonical Wnt pathway. *Int. J. Dev. Biol.*, **45**, p.225-227.